

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



TESIS DOCTORAL

**Chlamydia psittaci : un estudio serológico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**María del Carmen García Lerín**

Madrid, 2015

BIBLIOTECA UCM



5306702960

GAT  
chp

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CHLAMYDIA PSITTACI: UN ESTUDIO SEROLÓGICO

Dirigida por:

M<sup>a</sup> Isabel Cour Bóveda



M<sup>a</sup> del Carmen García Lerín

Madrid 1986

17. 23. 372

A mis padres y hermana

Quiero expresar mi agradecimiento a

- D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Isabel Cour Bóveda, Profesora Titular -- de la Catedra de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, por su dirección, ayuda y entusiasmo en la realización de esta Tesina.

- D. Dimás Fernández Galiano, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, por el entusiasmo con que ha acogido este trabajo.

- Dr Mingallón y personal del Matadero de Villaviciosa de Odón por las facilidades dadas para obtener los sueros de los animales.

- Mis compañeros de Laboratorio por la ayuda -- prestada en la elaboración de esta Tesina.

- A mi familia y amigos por el ánimo y apoyo durante la realización de este trabajo.

# I N D I C E

		<u>PAGINA</u>
I	<u>INTRODUCCION</u> .....	1
II	<u>RESEÑA HISTORICA</u> .....	5
III	<u>TAXONOMIA</u> .....	12
IV	<u>FILOGENIA</u> .....	17
V	<u>CARACTERES GENERALES</u> .....	22
	a.- Morfología .....	23
	b.- Envuelta celular .....	27
	c.- Antígenos de la envuelta .....	32
	d.- Acidos nucléicos .....	37
	e.- Tinción .....	40
VI	<u>MULTIPLICACION</u> .....	43
	a.- Ciclo biológico .....	44
	b.- Factores de virulencia de los CE y CR ...	50
VII	<u>CRECIMIENTO Y NUTRICION</u> .....	59
VIII	<u>METABOLISMO</u> .....	63
IX	<u>EPIDEMIOLOGIA</u> .....	70
X	<u>PATOGENIA</u> .....	78
XI	<u>CLINICA</u> .....	81
	a.- Clínica en el hombre .....	82
	b.- Clínica en animales .....	86
XII	<u>INMUNIDAD</u> .....	90
	a.- Respuesta inmune humoral .....	91
	b.- Respuesta inmune celular .....	92
	c.- Infecciones latentes y persistentes .....	93

XIII	<u>DIAGNOSTICO DE LABORATORIO</u> .....	98
	a.- Animales de laboratorio .....	99
	b.- Huevo embrionado .....	100
	c.- Cultivos celulares .....	101
	d.- Fijacion del Complemento .....	103
	e.- Inmunofluorescencia Indirecta .....	103
	f.- Enzimoimmunoanálisis .....	106
	g.- Radioimmunoensayo .....	106
XIV	<u>TRATAMIENTO</u> .....	107
XV	<u>PROFILAXIS</u> .....	111

APORTACION PERSONAL

XVI	<u>OBJETIVOS</u> .....	116
XVII	<u>MATERIAL Y METODOS</u> .....	118
	a.- Material .....	119
	1.- Población sana .....	119
	2.- Población patológica.....	120
	3.- Sueros de ganado .....	120
	b.- Métodos.....	121
	1.- Método serológico .....	122
	11.- Fijación del Complemento .....	122
	12.- Inmunofluorescencia Indirecta .....	137
	2.- Método estadístico .....	144
	21.- Comparación de porcentaje .....	144
	22.- Criterio del $\chi^2$ .....	147

XVIII	<u>RESULTADOS</u> .....	150
	1.- Comparación de técnicas .....	151
	2.- Estudio de <u>C.psittaci</u> en dos poblaciones.	160
	3.- Estudio de <u>C.psittaci</u> y <u>C.trachomatis</u> ..	174
	4.- Estudio de <u>C.psittaci</u> con otros microor- ganismos .....	188
	5.- Estudio en el ganado .....	188
XIX	<u>DISCUSION</u> .....	192
XX	<u>CONCLUSIONES</u> .....	207
XXI	<u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	209.

I N T R O D U C C I O N

## INTRODUCCION

*Chlamydia psittaci* es un microorganismo intracelular obligado, agente causal de la psitacosis u ornitosis, que se encuentra ampliamente distribuido en el reino animal ( aves y mamíferos ).

Algunas aves son portadoras sanas y constituyen un importante reservorio natural del microorganismo. En las aves infectadas, *C. psittaci* se encuentra en las secreciones nasales, excretas, tejidos y plumas. Las cepas aisladas de mamíferos son menos patógenas para el hombre que las de procedencia aviar, constituyendo estas últimas la principal fuente de contagio para el hombre.

La transmisión al hombre se realiza casi siempre por vía respiratoria, siendo rara la adquisición de la enfermedad por picadura de ave. No es necesario un contacto prolongado con el animal infectado; bastan unos cuantos minutos transcurridos en un ambiente previamente ocupado por éste

Recientemente, se ha demostrado la posibilidad de contagio interhumano, lo cual ha hecho necesaria una re

visión de las ideas tradicionales sobre la epidemiología de esta infección.

La enfermedad tiene distribución universal, pudiendo presentarse con un carácter epidémico o esporádico y no existen datos que sugieran una disminución de su incidencia.

La psitacosis (neumonía atípica) produce un cuadro clínico sistémico, de gravedad muy variable, caracterizado por fiebre, cefaleas, mialgias, y alteraciones respiratorias.

El diagnóstico de la psitacosis se basa en el aislamiento de C. psittaci a partir de sangre, secreciones bronquiales o tejidos parasitados, en el estudio serológico y en la clínica. El primero de estos procedimientos resulta difícil y sólo está al alcance de unos pocos laboratorios, mientras que el segundo, mucho más sencillo, es el más empleado en la práctica. La técnica más utilizada hoy en día es la reacción de fijación del complemento; su sensibilidad, sin embargo, no parece muy elevada, ya que, como se ha comprobado en brotes epidémicos, resulta negativa en casi el 50% de los pacientes con psitacosis.

En la bibliografía revisada, es de señalar la -  
escasez de estudios realizados sobre las infecciones pro-  
ducidas por C. psittaci.

En España no se conoce la prevalencia de anti--  
cuerpos frente a C. psittaci en población sana debido, tal  
vez, a la falta de seguimiento serológico, así como a la  
poca sensibilidad de las técnicas utilizadas.

Debido a esto y a la posibilidad de que existan  
nuevas formas de contagio de origen no aviar, como la --  
transmisión interhumana, se ha realizado éste trabajo, u-  
tilizando una técnica mucho más sensible, la inmunofluores-  
cencia indirecta, para determinar el porcentaje de anti--  
cuerpos frente a C. psittaci en población sana. También -  
se determinará su relación con la edad y con el sexo.

La infección por C. psittaci de origen ovino y  
bovino es conocida desde hace tiempo y aunque las cepas -  
de ésta procedencia son menos virulentas para el hombre -  
que las de origen aviar, se quiere determinar que porcen-  
taje de anticuerpos presentan dichos animales, para poder  
ver que repercusiones, directas o indirectas, pueden tener  
sobre el personal que trabaja en los mataderos.

R E S E Ñ A   H I S T O R I C A

## RESEÑA HISTORICA

Se ha considerado a la psitacosis como una enfermedad humana durante más de un siglo.

Inicialmente, se pensó que era una infección generalizada en las psitácidas, con una difusión ocasional hacia el hombre a través de un contacto estrecho con las aves.

En 1879, J. Ritter, médico-precitante de un pequeño pueblo próximo a Zurich cuenta la historia de un brote severo de una enfermedad respiratoria acaecido en su propia familia. Dichas alteraciones se produjeron tres semanas después de la llegada a su casa de loros y colibrís expedidos por un importador de Hamburgo. Ritter no pensó que dicha enfermedad fuese transmitida por las aves enfermas y creyó que se trataba de una infección cuya fuente estaba en las jaulas contaminadas. Dicha infección presentaba algunos síntomas clínicos similares a los del tifus exantemático, lo que le llevó a designar a este nuevo síndrome como "neumotifus".

Por su parte, Eberth llevó a cabo la autopsia de tres de los casos mortales producidos por esta rara en

fermedad, sin conseguir ningún resultado esclarecedor.

En Marzo de 1893 apareció un brote similar en París, detectado y publicado posteriormente por higienicistas y clínicos franceses. La epidemia mortal de neumonia infecciosa coincidía con la reciente adquisición de papagayos procedentes de Buenos Aires, de los cuales, la mitad había muerto durante la travesía y un tercio de los restantes estaban enfermos. De estos trabajos realizados por los higienicistas franceses, se admite sin reserva que el origen y contagio de la enfermedad se encuentra en los psitacidos, de aquí el nombre de psitacosis. ( psitacus= loro )

En 1925, Nocard aisla de la muda de un loro un bacilo intermedio entre el colibacilo y el bacilo tífico, que culyiva e inocula en loros con un éxito aparente. El microorganismo fué posteriormente identificado como Salmónella typhi

El agente causal de la psitacosis parecía identificado, y durante cuarenta años, cada nuevo caso de una infección, de la que reaparecían algunos focos aquí y allá, son objeto de las mismas investigaciones ( hemocultivo,

seroaglutinaciones ) y tratados de igual forma que si la enfermedad fuese producida por Salmonella typhi.

El año 1929 está marcado por la eclosión de una nueva pandemia. Al igual que en la primera, el foco de infección se localizó en la República Argentina. Los numerosos casos de neumonía grave ocurridos en Córdoba alertaron a un profesor de la Facultad, Barros, que diez años antes, había estudiado en Suiza el fenómeno de la psitacosis. Barros, en 1929, identifica los síntomas e informa a las autoridades. Alarmados, los criadores de papagayos se apresuran a desalojar sus existencias a bajo precio. La exportación de pájaros exóticos aumenta y, por ello, la enfermedad alcanza a EEUU, Europa y Norte de Africa, produciendo 800 víctimas, de las cuales mueren la tercera parte.

La ayuda de los laboratorios es solicitada de nuevo. Puesto en duda que la enfermedad sea provocada por el bacilo de Nocard, Hutchinson propone en Londres la hipótesis de que se debe a un "virus filtrante". Esta teoría sería confirmada por Bedson y cols. en 1930 y posteriormente por Sacquepés y Ferrabonc. Más tarde, y dentro del mismo año, Levinthal en Alemania, Coles en Inglaterra y Lillie en EEUU, descubren casi simultáneamente el agen-

te patógeno de la psitacosis, bajo la forma de corpúsculo elemental esférico ( LCL bodies ). Prowazek y cols. habían descrito, ya en 1907 unos pequeños gránulos en el interior de las células conjuntivales tracomatosas, Estos cuerpos elementales parecían envueltos en un "manto". Prowazek los denominó Chlamydozoa (Χλαμύδης=casaca, ζωον= agente vivo), por su semejanza con los protozoos.

Estas formas fueron cultivadas en huevo embriionado, dando lugar a la formación de antígenos, requeridos para posteriores investigaciones serológicas.

Poco después de su identificación en loros, el microorganismo se encontró también en periquitos y canarios.

En 1935 se produjo un brote estacional de neumonía en las islas Faroe que daría a la psitacosis dimensiones inesperadas.

R. K. Rasmussen-Ejde sospecha del origen aviar de esta infección cuando compara la semejanza de los casos que observa con las descripciones de la enfermedad en los papagayos. Además, dicha enfermedad afectaba a mujeres de mediana edad que estaban relacionadas con la prepa

ración y almacenamiento de petreles como alimento para el invierno. Tres años más tarde, en 1933, Maagen y Mauver - afirman, tras numerosas investigaciones bacteriológicas, que el microorganismo encontrado en los pájaros y en el - hombre es en realidad el mismo.

Así, por primera vez, un ave no perteneciente a la familia de las psitácidas se muestra sensible y apto - para contaminar al hombre. Desde entonces , las muestras epidemiológicas se multiplican y se extienden a numero-- sas especies. El rango natural de huésped incluye aves de corral como pollos, pavos y patos. En 1958, Mayer confec- ciona una lista de más de 130 especies aviares divididas en 7 órdenes y 20 familias, en las que se ha demostrado - que existe una susceptibilidad natural a la infección.

Posteriormente, Moulder establece en 1964 que - el agente productor de la psitacosis no era un virus, si- no una bacteria de pequeño tamaño, que presentaba dos ti- pos de ácidos nucleicos, se dividía por fisión binaria, - etc.

Inicialmente, estos microorganismos recibieron la denominación de Bedsonia, en honor a Bedson, que había estudiado a fondo la epidemia de psitacosis de 1930. Tam-

bién se las llamó Miyagawanella a consecuencia de los estudios morfológicos de Miyagawa en el LGV, y Giraud propuso el nombre de Neorickettsia por tener características intermedias entre rickettsias y virus.

Por fin, en 1973, y en razón a su ciclo biológico, diferente del resto de las bacterias, estos microorganismos fueron denominados clamidias ( género Chlamydia ), término ya propuesto en 1945 por Jones y Rake.

El término " ornitosis" ( ornis= pájaro ) se utiliza para designar las enfermedades producidas por aves - no psitácidas, mientras que el término "psitacosis" ( psitacus= loro ) se emplea para la enfermedad transmitida por loros y periquitos.



T A X O N O M I A

## TAXONOMIA

Hasta 1964 las clamidias habían sido consideradas como "virus basófilos", o bién, como "el grupo de virus productores de la psitacosis- linfogranuloma-tracoma" ( PLT ). Posteriormente fueron consideradas como un grupo intermedio entre las rickettsias y los virus animales. -- Hoy en dia se acepta la tésis de Moulder, Weiss y Page, que consideran que los agentes descritos como "virus basófilos" son en realidad bacterias de pequeño tamaño que crecen en el interior de las células, y no agentes intermedios.

Desde 1945 se han hecho numerosos intentos de ofrecer una descripción taxonómica de las clamidias. Así, en la séptima edición del Bergey's Manual, Rake presenta el siguiente esquema:

ORDEN I: Rickettsiales

FAMILIA I: Rickettsiaceae (transmitida por  
artrópodos )

TRIBU I: Rickettsieae

GENERO: Rickettsia

FAMILIA II: Chlamydiaceae (no transmitidas -  
por artrópodos )

GENERO I: Chlamydia

GENERO V: Miyagawanella

En este sistema, dentro del género Chlamydia se incluían los agentes productores del tracoma y la conjuntivitis de inclusión, quedando el género Miyagawanella reservado para aquellas bacterias productoras de la psitacosis, ornitosis, linfogranuloma, etc.

Meyer pensó que se debía conmemorar el trabajo de Bedson sobre el estudio de los organismos productores de la psitacosis, mediante el establecimiento del género Bedsonia. Este término fué utilizado durante bastante -- tiempo, hasta que, en 1966, Page realizó una revisión de la nomenclatura bacteriana, excluyendo el término Bedso--nia; argumenta que las reglas de dicha nomenclatura rechazan el empleo continuado de dicho término y, además, los agentes de la psitacosis-linfogranuloma-tracoma pueden englobarse dentro de un único género, Chlamydia, descrito - originalmente por Jones, Rake, y Stearns en 1945.

En la última edición del Bergey's Manual (1984) la clasificación de las clamidias es la siguiente:

ORDEN I: Rickettsiales  
FAMILIA I: Rickettsiaceae  
TRIBU I: Rickettsieae  
GENENERO: Rickettsia

ORDEN II: Chlamydiales  
FAMILIA II: Chlamydiaceae  
GENERO: Chlamydia

Estudios realizados sobre composición antigénica de las clamidias, virulencia, huespedes sensibles y -- efectos patógenos, han evidenciado que existen diferentes cepas de clamidias. Sin embargo, pueden ser clasificadas en dos especies, dependiendo del tipo de inclusión cito-- plasmática producida en el interior de la célula huésped, así como su sensibilidad a las sulfamidas. Estas dos espe-- cies serían: C. trachomatis, perteneciente al grupo A, y C. psittaci, del grupo B ( Tabla I )

C. trachomatis presenta tres biovariedades:

- Ratón (agente de la neumonitis del ratón)
- Linfogranuloma venéreo ( LGV )
- Tracoma ( agente de enfermedades oculares y -  
genitales humanas diferente del LGV)

Se sabe que C. psittaci es una especie muy hete-- rogénea, pero todavía no se ha intentado subdividirla.

<u>PROPIEDAD</u>	<u>GRUPO A</u>	<u>GRUPO B</u>
Sensibilidad a las sulfamidas	Sensible	Resistente
Tipo de inclusión producido	Rígida	No rígida
Presencia de glucógeno en inclusión	Sí	No
Especie	<u>C. trachomatis</u>	<u>C. psittaci</u>
Enfermedades producidas	Tracoma Conjuntivitis de inclusiones LGV Neumonitis del ratón	Ornitosis Meningoneumonitis Numerosos procesos clínicos del hombre y otros mamíferos
% G + C	≈ 44%	≈ 41%
Huéspedes	Hombre	Aves y mamíferos

TABLA I: CARACTERISTICAS DIFERENCIALES DE LAS DOS ESPECIES DEL GENERO CHLAMYDIA.

F I L O G E N I A

## FILOGENIA =====

Tanto *C. trachomatis* como *C. psittaci* presentan rasgos similares, y se cree que pueden haberse originado a partir de una forma ancestral común, por asociación y adaptación a diferentes especies de huéspedes. Moulder propone que el organismo ancestral de las clamidias son los cocos Gram-negativos, habiendo dos líneas diferentes de evolución: ( Esquema I ):

- Una daría origen al grupo A ( *C. trachomatis* ) caracterizado por su virulencia, limitación del número de huéspedes, y capacidad de síntesis
- Otra daría lugar al grupo B ( *C. psittaci* ), caracterizado por un aumento de la virulencia, gran número de huéspedes y pérdida de la capacidad de síntesis

Los estudios del genoma de las clamidias ponen de manifiesto que el DNA tiene un contenido de G+C que varía desde el 41% al 44%, estando las cepas de *C. psittaci* en el extremo inferior de un espectro continuo de valores, y la biovariedad tracoma de *C. trachomatis* se en---

cuentra en el extremo superior. Esto coincide aceptable - mente con lo que se esperaba para los miembros de un mismo género. Sin embargo, los estudios realizados mediante hibridación de ácidos nucleicos, señalan que el grado de homología del DNA entre las cepas de C. psittaci y C. trachomatis es sólo del 10%, bastante por debajo del punto - límite del 20% sugerido para los miembros de un mismo género. La rotura con endonucleasas de restricción del -- DNA de C. psittaci y de las biovariedades de LGV y tracomma de C. trachomatis pone de manifiesto mapas genéticos - muy similares.

Los resultados de estos trabajos apoyan la hipótesis de Moulder sobre la existencia de diferentes líneas evolutivas.

Utilizando las nuevas técnicas de Genética molecular podrán establecerse las verdaderas relaciones filogenéticas existentes entre las clamidias. Actualmente --- C. psittaci y C. trachomatis son los únicos representantes del orden Chlamydiales, pero se están descubriendo -- "parientes " de éstas con tanta frecuencia que debe encontrarse un lugar para ellos en la taxonomía de las clamidias. Así, por ejemplo, se han encontrado en determinadas arañas ( Coelotus luctuosus ) unos microorganismos que se parecen a las clamidias más que a cualquier otro taxón.

También se han encontrado en almejas ( *Mercenaria mercenaria* ), y en celenterados de agua dulce ( *Hydra viridis* ). Estos organismos crecen, al igual que las clamidias, en vacuolas citoplasmáticas cuyo tamaño y estructura se corresponden con los cuerpos reticulados y cuerpos elementales. Los cuerpos reticulados se dividen por fisión binaria y los cuerpos elementales tienen nucleoides densos. Los microorganismos encontrados en las almejas reaccionan con el antígeno específico de género de las clamidias, no ocurriendo lo mismo con los encontrados en la hidra. Las bacterias encontradas en las almejas, según J. W. Moulder, pueden representar una nueva especie de *Chlamydia*, y las encontradas en la hidra, un nuevo género de la familia - *Chlamydiaceae*. Ninguno de estos microorganismos ha crecido fuera de la célula huésped natural.



C A R A C T E R I S T I C A S   G E N E R A L E S

## MORFOLOGIA

*Chlamydia psittaci*, agente etiológico de la psitacosis, presenta muchas características morfológicas y bioquímicas que la relacionan íntimamente con las bacterias:

- 1.- Presencia de DNA y RNA.
- 2.- División por fisión binaria.
- 3.- Ribosomas de tamaño similar a los de las bacterias.
- 4.- Pared celular parecida a la de las bacterias Gram negativas.
- 5.- Resistencia y susceptibilidad a los antibióticos.
- 6.- Ausencia de membrana nuclear.

Los estudios realizados por Bedson pusieron de manifiesto que las clamidias presentan una morfología esférica u ovalada, cuyas dimensiones varían entre 200 y 1.500 nm, son inmóviles y al microscopio óptico aparecen como cocos Gram-negativos.

En el curso de su desarrollo biológico pasan por formas celulares sensiblemente diferentes: el corpúsculo elemental (CE) y el corpusculo reticulado o inicial (CR). (Tabla II).

El corpúsculo elemental presenta una forma perfectamente esférica, cuyo tamaño varia entre 200 y 400 nm de diámetro. Al microscopio óptico se observa como un coco Gram-negativo que se tiñe de rojo púrpura con el método de Giemsa; al microscopio electrónico con sombreado metálico, el CE presenta una forma de guisante arrugado, es decir, una forma esférica con la parte central densa a los electrones. El nucleóide central contiene el DNA, cuyo peso molecular es de  $660 \times 10^6$  d. En el citoplasma se encuentran estructuras ribosomales 30S (que contienen RNA 16S) y 52S (que contienen RNA 21S), también se observan pequeños nucleóides excéntricos sin membrana que representan de un tercio a un quinto del genoma bacteriano. Presenta un 35% de proteínas y de un 40 a un 50% de lípidos.

Los CE se encuentran incluidos dentro de un par de membranas del tipo membrana unitaria de  $100 \overset{0}{\text{Å}}$  de espesor. La membrana externa está constituida por la pared celular, rígida y con escasa permeabilidad; la membrana interna es la membrana citoplasmática.

Los CE son estables en el medio extracelular, presentando cierta resistencia a diferentes agentes (ondas osmóticas, tripsina, etc.). Está dotado de propiedades tóxicas, pero metabólicamente es una forma intacta capaz de replicarse por fisión binaria.

Los cuerpos reticulados o iniciales presentan -

un diámetro de 0,55 a 1  $\mu\text{m}$  (a veces 1,6  $\mu\text{m}$ ), con forma --  
irregular, pudiendo presentar un estrangulamiento central.  
Al microscopio óptico y teñidos de azul por el método de  
Giemsa, los CR aparecen de forma difusa. El DNA no se en-  
cuentra condensado como en el CE, sino formando una espe-  
cie de red difusa en el citoplasma de aspecto homogéneo.  
En la periferia del citoplasma aparecen unas granulacio-  
nes de 150  $\text{Å}$  que corresponden a los ribosomas 70S. La --  
cantidad de RNA que presenta el CR es cuatro veces supe-  
rior a la concentración de DNA. La pared celular de los  
CR es más fina, representando el 5% del peso seco de la -  
bacteria, y la capa interna ha desaparecido dividida en -  
subunidades.

	CE	CR
TAMAÑO	350 nm.	850 nm.
PARED	Rígida	Flexible
SUPERVIVENCIA EXTRACELULAR	Sí	No. Intracelular estricta.
METABOLISMO	Muy reducido	Activo
MULTIPLICACION	No	Sí

TABLA II: CARACTERISRICAS DIFERENCIALES ENTRE EL CE Y EL CR.

## ENVUELTA CELULAR

Las envueltas del corpúsculo elemental y reticular son del tipo Gram-negativo, ya que están constituidas por una membrana citoplasmática interna y por una membrana externa que puede romperse con Polimixina B y EDTA. Las membranas externas de las clamidias se parecen a la de las bacterias Gram-negativas, puesto que contienen una proteina principal de membrana externa denominada MOMP, cuyo pieso molecular es de 40.000 d., y que constituye aproximadla mente la mitad de las proteínas de la membrana externa.

Sin embargo, la envuelta de las clamidias difiere de la envuelta típica de los organismos Gram-negativos en un aspecto muy importante: no presentan capa de peptidoglucano. En las micrografías electrónicas no puede observarse dicha capa entre la membrana interna y externa, así como tampoco por análisis químicos se ha podido encontrar ácido murámico o cualquier otro aminoazucar que pueda sustituirlo.

Los trabajos realizados por J. W. Moulder en 1984 a este respecto, mediante la utilización de penicilina como agente inhibitorio del crecimiento y división del corpúsculo reticular, así como su reorganización para formar el corpúsculo elemental, han puesto de manifiesto que la

membrana interna de las clamidias presenta unos recepto-- res cuyo tamaño y afinidad por el antibiótico son simila-- res a los de las bacterias independientes del huesped. Puesto que se sabe que la penicilina impide el crecimien-- to bacteriano al bloquear la unión entre los tetrapépti-- dos de las cadenas laterales de las moléculas de peptido-- glucano, Moulder sugiere, que la envuelta de las clamidias puede tener tetrapéptidos entrecruzados comparables a los del peptidoglucano, que estarían unidos covalentemente a una estructura que no es peptidoglucano, cuya naturaleza se desconoce hoy en día.

La envuelta del corpúsculo elemental presenta - aminoácidos azufrados con formación de puentes disulfuro, que serían los responsables de la rigidez y de la escasa permeabilidad. Estos CE son exactamente igual de rígidos y resistentes a los choques osmóticos y mecánicos que las bacterias en las que se cree que el peptidoglucano es el principal constituyente para la fuerza y la rigidez. Por el contrario, la envuelta de los CR contiene menos fosfo-- lípidos y presenta pocos aminoácidos azufrados y, en con-- secuencia, es menos rígida y permeable para el ATP, nu-- trientes y productos finales del metabolismo.

La mayor o menor concentración de aminoácidos - azufrados que contienen las membranas del CR y CE puede - explicar por qué los CE son fuertes y rígidos, mientras -

que los CR son frágiles y nada rígidos, y como se reorganizan estos dos tipos morfológicos para convertirse uno - en otro en el momento oportuno del ciclo de desarrollo de las clamidias. Schachter en 1978 sugirió que los puentes disulfuro podían contribuir a la rigidez del corpúsculo elemental, puesto que la envuelta de éste en C. psittaci contiene mucha menos cisteína que la del corpúsculo reticulado. Esta sugerencia se ha basado en la observación de que las otras proteínas de membrana del corpúsculo elemental, a diferencia de las otras bacterias Gram-negativas, requieren agentes reductores como el mercaptoetanol para su solubilización en dodecil-sulfato-sódico ( SDS ). El corpúsculo elemental de C. psittaci contiene cuatro proteínas en la membrana externa que presentan un alto contenido en puentes disulfuro, la MOMP y tres proteínas menores, ricas en cisteína, de 12, 59 y 62 Kd. Poco después - de que los corpúsculos elementales penetran en la célula huésped, la MOMP es reducida a una forma monomérica y es sintetizada durante todo el ciclo de desarrollo, de manera que los corpúsculos reticulados contienen casi tanta MOMP como el corpúsculo elemental. Los puentes disulfuro de las proteínas menores ricas en cisteína también se reducen tras la penetración del CE en la célula huésped, -- hasta que los CR comienzan a reorganizarse para dar lugar a los CE. Finalmente, justo cuando se lisa la célula huésped, la MOMP y las proteínas menores quedan unidas mediante puentes disulfuro en toda la longitud de los CE extracelulares.

Es posible que el grado de unión mediante puentes disulfuro entre las proteínas de la membrana externa pueda también contribuir a las diferencias en el modo en que las especies y biovariedades de clamidias interactúan con la célula huésped.

La estructura de la envuelta se ha estudiado mediante la observación al microscopio electrónico de muestras sombreadas con metales. Estos estudios han revelado que la membrana externa está compuesta por estructuras dispuestas hexagonalmente, con una distancia de 18 nm. aproximadamente de centro a centro. Todavía no se sabe si esto sólo se verifica en el corpúsculo elemental, o bien acontece tanto en el corpúsculo elemental como en el reticular. Se ha sugerido que estas subunidades regularmente espaciadas son equivalentes a la de la capa S de las bacterias ordinarias.

La membrana externa de las clamidias también -- presenta una estructura nueva, que no tiene contrapartida obvia en otras bacterias: las proyecciones superficiales que aparecen en los corpúsculos elementales y reticulares. Sólo hay una parte de esas proyecciones en cada célula -- clamidial. Por término medio, cada una está constituida por dieciocho proyecciones cilíndricas dispuestas hexagonalmente, con una distancia de centro a centro de 40 a --

70 nm. Cada proyección emerge del centro de una estructura semejante a una flor de aproximadamente 30 nm. de diámetro, que está constituida por siete hojas dispuestas radialmente. La proyección parece extenderse a través de la membrana externa y a través de una roseta similar de subunidades localizadas en la superficie interna. Se ha sugerido que las proyecciones pueden ser tipos inusuales de poros transmembranales que conectan el citoplasma de la clamidia con el medio externo, pero sin que haya una función probada para estas estructuras.

## ANTIGENOS DE LA ENVUELTA

Los antígenos utilizados para la identificación serológica y para la diferenciación de las clamidias están todos localizados en la envuelta celular. Se piensa que estos antígenos juegan un papel principal en la virulencia de las clamidias y en la inmunidad del huésped.

Desde los primeros estudios ( Bedson, 1937-59 ) sobre clamidias se sabe que estos microorganismos poseen un antígeno liposoluble fijador de complemento, que está presente durante todo el ciclo de desarrollo, y se encuentra tanto en *C. psittaci* como en *C. trachomatis* ( las 3 - biovariedades ). A este antígeno se le ha venido denominando antígeno de grupo clamidial pero es más apropiado - referirse a él como antígeno específico de grupo.

El antígeno específico de grupo se parece mucho a los lipopolisacáridos ( LPS ) de las bacterias gram negativas, independientes del huésped, tanto en su actividad biológica como en su estructura química. Este antígeno es activo en la prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* y en la prueba del pirógeno del conejo, dos pruebas para la identificación de la porción del lípido del core más íntima del LPS. La localización de este antígeno en la membrana externa viene apoyada por la presencia de un polisacárido sensible al peryodato, que se tiñe con mete-

namina de plata en la periferia del cuerpo elemental.

El antígeno específico de grupo es termoestable y liposoluble. De este antígeno puede obtenerse un polisacárido hidrosoluble que después de ser hidrolizado da lugar a una sustancia muy relacionada, el ácido 2-ceto-3--desoxi-octanoico, constituyente del core interno de LPS de las bacterias Gram-negativas. También hay una fuerte reacción inmunológica cruzada entre el antígeno específico de género y el core más interno del LPS de una especie mutante de Salmonella en la cual se da esta estructura.

La utilización de anticuerpos monoclonales ha revelado la existencia de al menos tres dominios antigénicos. Dos de ellos los comparten con el LPS de algunos organismos Gram-negativos, pero el tercero es exclusivo del LPS de las especies del género Chlamydia. Está aún por determinar qué papel desempeña, si es que lo hace, este antígeno de las clamidias en la patogénesis de las enfermedades que producen.

Además del antígeno con especificidad de género, las clamidias también poseen otros dos tipos de antígenos:

- Antígenos específicos de especie, que distinguen entre C. psittaci y C. trachomatis

- Antígenos específicos de subespecie y serovariedad, que diferencian entre las 15 serovariedades de las biovariedades LGV y tracoma de C. trachomatis

Generalmente, los antígenos de especie, subespecie y serovariedad se detectan por inmunofluorescencia. Parece que estas actividades inmunológicas residen principalmente, pero no en exclusiva, en la proteína MOMP de la membrana externa de las clamidias. El antígeno de especie es termolábil, El análisis antigénico de la proteína MOMP purificada a partir de una cepa de C. psittaci y cinco cepas de C. trachomatis demostró que la MOMP de ambas especies son antigénicamente diferentes. Las proteínas MOMP de las cinco cepas de C. trachomatis están relacionadas inmunológicamente, pero pueden separarse en dos subgrupos, los serogrupos B y C. Las MOMP de C. psittaci son claramente diferentes de las MOMP de C. trachomatis, pero existen muchas semejanzas estructurales entre las MOMP de diferentes serovariedades de C. trachomatis.

Los estudios realizados utilizando anticuerpos monoclonales contra los antígenos de superficie de las clamidias también indican que los antígenos específicos de especie, subespecie y serovariedad están relacionados

predominantemente con la proteína MOMP.

Las proteínas de la envuelta externa de *C. psittaci* son probablemente tan heterogéneas antigénicamente como las de *C. trachomatis*, pero no se han realizado los correspondientes estudios antigénicos y estructurales.  
( Tabla IV )

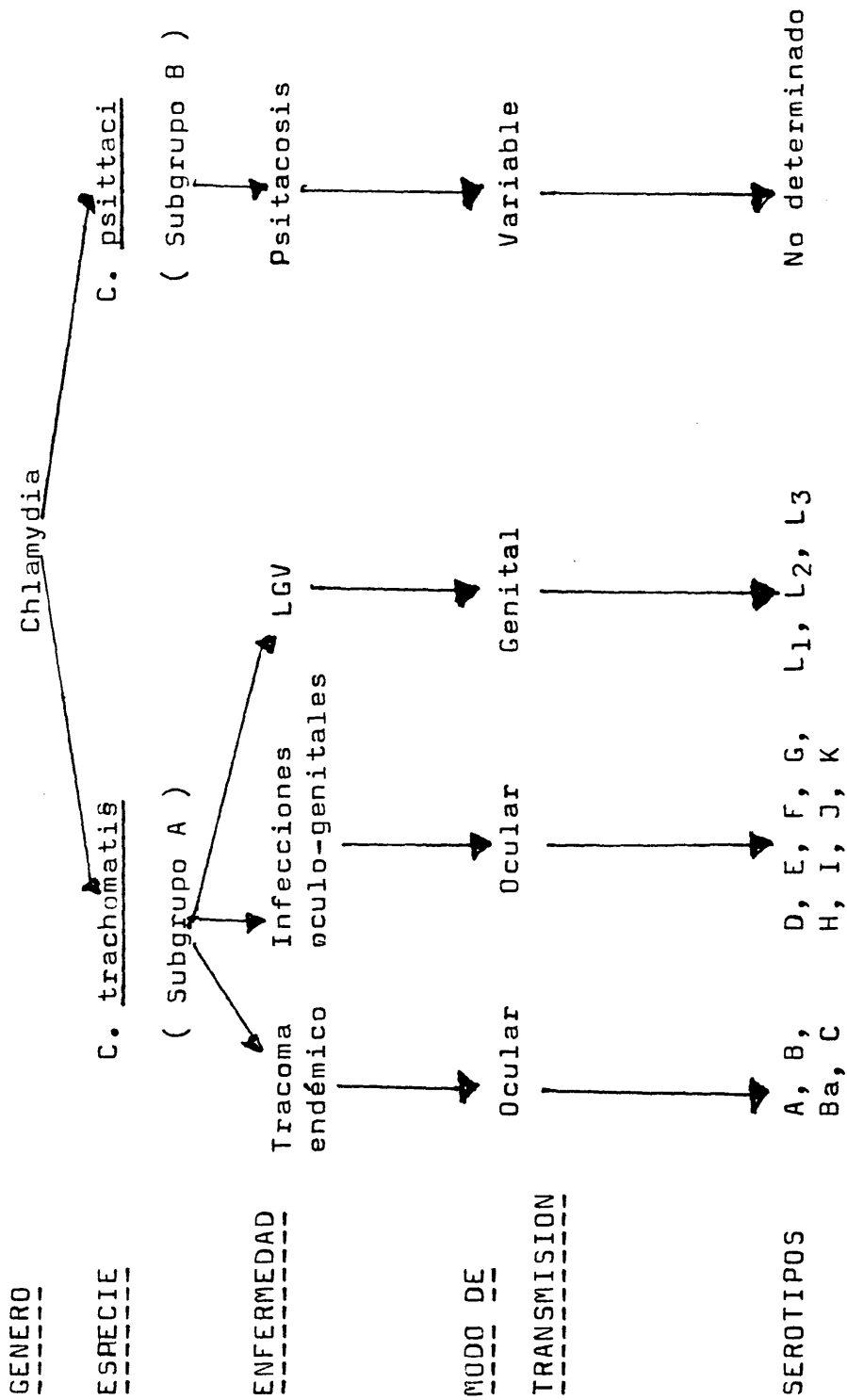


TABLA IV: DIFERENCIAS ENTRE C. psittaci Y C. trachomatis .

## ACIDOS NUCLEICOS =====

El DNA de *C. psittaci* es una doble hélice con una longitud de 345,6 um. El genoma de las clamidias es de los genomas procarióticos más pequeños, ya que sólo el de las especies de *Mycoplasma* es menor.

Existe una relación espacial entre el DNA del corpúsculo elemental y una serie de proyecciones de DNA. El DNA del corpúsculo elemental reside, típicamente, en un nucleoide elctrodense, localizado excéntricamente y -- las proyecciones de DNA se encuentran situadas en la su-- perficie del corpúsculo elemental, en la cara más lejana del nucleoide. Se piensa que hay conexiones filamentosas, sensibles a tripsina, entre el extremo de la membrana citoplasmática de las proyecciones superficiales y el DNA de las clamidias. ( FIGURA I )

Las micrografías electrónicas de clamidias en el interior de la célula huésped muestran que los corpúsculos reticulares presentan muchos más ribosomas que los corpúsculos elementales. Este RNA es procariótico. Los -- corpúsculos reticulares de *C. psittaci* purificados presentan tres veces más RNA que los corpúsculos elementales. Los corpúsculos reticulares contienen, sobre todo, RNA -- 21S, 16S y 4S, mientras que los corpúsculos elementales poseen principalmente RNA 4S. ( Tabla III ).

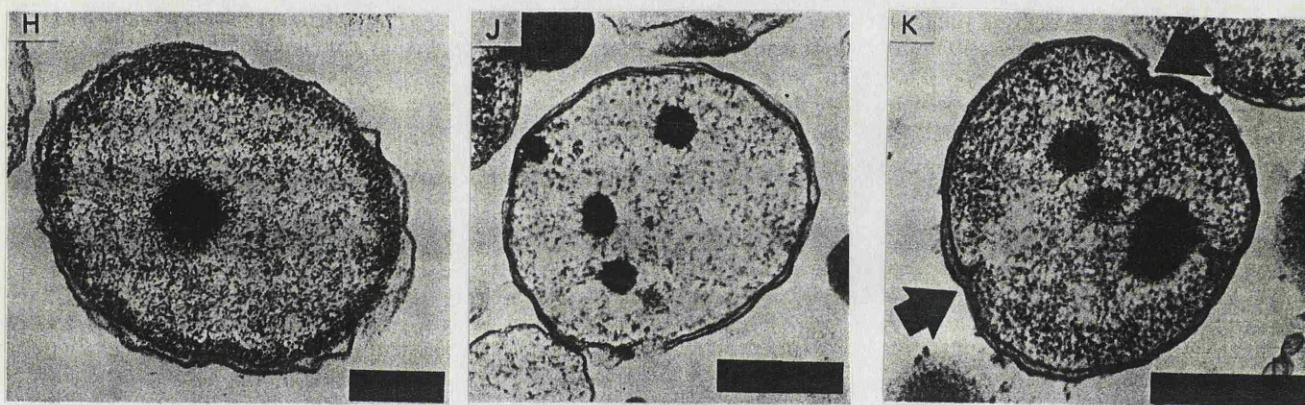


FIGURA 1: DIFERENTES FASES DE LA CONDENSACION DEL DNA EN EL CORPUSCULO RETICULAR. LAS BARRAS REPRESENTAN 0,2, 0,5 Y 0,5  $\mu$ m DE LONGITUD.

	<u>Clamidas</u>	<u>Bacterias</u>	<u>Rickettsias</u>	<u>Mycoplasma</u>	<u>virus</u>
Crecimiento fuera de la célula huésped.	-	+	-	+	-
Síntesis proteica independiente.	+	+	+	+	-
Productor de energía metabólica	-	+	+	+	-
Pared celular rígida.	variable	+	+	-	variable
Sensibilidad antibióticos	+	+	+	-	+
Acidos nucleicos	DNA y RNA	DNA y RNA	DNA y RNA	DNA y RNA	DNA y RNA

TABLA III-- COMPARACION DE LAS CLAMIDIAS CON OTROS AGENTES PATOGENOS.

## TINCION =====

Se han utilizado tres técnicas generales de tin  
ción para visualizar inclusiones de clamidias en monoca--  
pas celulares:

- Tinciones histoquímicas convencionales
- Tinciones inmunohistoquímicas
- Tinciones fluorescentes para ácidos nucleicos

1) La utilización de técnicas de tinción histo-  
químicas es la mejor establecida, y es la más conveniente  
para el exámen de rutina de un gran número de monocapas.

La tinción de Giemsa es útil para detectar inclu  
siones de C. psittaci. Los CR se tiñen de un color azul -  
característico y los CE se colorean de rojo púrpura. Sin  
embargo estas inclusiones no autofluorescen cuando se exa  
minan mediante microscopio de campo oscuro, siendo neces  
ario para su observación un microscopio lumínico. En estas  
condiciones es difícil la observación de las inclusiones,  
pues tienden a no estar bien definidas, siendo su conteni  
do difuso.

Otra técnica de tinción utilizada tradicional--

mente es la de Macchiavello, mediante la cual las partícu-  
las maduras o CE se tiñen de rojo, en contraste con el co-  
lor azul del citoplasma de la célula huésped.

Recientemente, Woodland (1982) ha comunicado la  
utilización de una tinción con rojo neutro y verde metilo,  
que es altamente sensible para demostrar la presencia de  
inclusiones de C. psittaci cuando se utiliza microscopio  
de campo claro.

2) Las técnicas de tinción inmunocitoquímicas -  
utilizan usualmente o bien isotiocianato de fluoresceína,  
o bien un sistema de anticuerpos marcados con peroxidasa,  
para detectar inclusiones de C. psittaci. Sea cual sea el  
método que se utilice, es preciso un elevado número de an-  
ticuerpos ( título alto de anticuerpos ) anticlamidiales  
que pueden utilizarse como primer anticuerpo en el siste-  
ma indirecto o puede conjugarse con el isotiocianato de -  
fluoresceína o la peroxidasa en el método directo.

Thomas, en 1977, al comparar la tinción de inmu-  
nofluorescencia indirecta ( IFI ) con la técnica de Giem-  
sa, encontró que la primera detectaba un mayor número de  
inclusiones, observación confirmada en 1980

Woodland et al., en 1978, compararon la tinción

de inmunoperoxidasa y la de inmunofluorescencia con la tinción de Giemsa. Demostraron que ambas tinciones inmunocitoquímicas presentaban una sensibilidad similar para la detección de C. psittaci, y eran muy superiores a la tinción de Giemsa.

Además de poseer una mayor sensibilidad, las tinciones inmunocitoquímicas son capaces de detectar inclusiones a las 18 horas después de la inoculación de C. psittaci en cultivos celulares.

3) Las tinciones fluorescentes que se unen al DNA, como son bisbenzimidazol, trihidrocloruro, hidrocioruro de 4'6-diamidino-2-fenilindol, han sido utilizadas para la detección de clamidias. Según las observaciones de Chasey en 1981, las inclusiones no fluorescen con tanto brillo como el núcleo de la célula en la que se han formado. En las muestras contaminadas, sin embargo, las colonias de bacterias que mimetizan las inclusiones son más difíciles de diferenciar que cuando se utilizan métodos histocitoquímicos convencionales.

M U L T I P L I C A C I O N

## CICLO BIOLÓGICO

El ciclo puede considerarse que comienza con el denominado cuerpo elemental, que es la forma infecciosa - de la clamidia, especializada en la supervivencia extracelular. Es esférico, de 0,2 a 0,4 um. de diámetro, conteniendo un nucleóide y numerosos ribosomas, ( FIGURA 2 )

El CE se pone en contacto con receptores específicos de la célula huésped susceptible. El ligando bacteriano es un componente superficial termolábil del CE, --- mientras que el receptor de la célula huésped presenta -- una localización en la membrana citoplásmica sensible a -- la tripsina. Después de la unión, el CE se interna por un proceso semejante a la fagocitosis, Las clamidias juegan un papel activo en este proceso de internalización, puesto que inducen la fagocitosis incluso en células no especializadas, que normalmente no fagocitan partículas. Al -- penetrar, los cuerpos elementales quedan incluidos dentro de los fagosomas, pero no se unen a los lisosomas; las -- clamidias viables inhiben la fusión lisosomal mediante -- sus antígenos de superficie. ( FIGURA 3 )

En las seis u ocho horas siguientes, los CE sufren una reorganización, que se percibe por la aparición

de una nueva forma llamada cuerpo reticulado o inicial. - Se trata de un esferoide reticulado de pared delgada, de 0,8 a 1,5 um. de diámetro, que contiene fibrillas nucleares y ribosomas. Los CR representan la forma vegetativa - bajo la cual se multiplica el microorganismo por fisión intracelular, pero en este estadio parece no ser infeccioso para otras células huésped. La división por fisión binaria da lugar a la formación de microcolonias dentro de las vesículas, denominadas cuerpos de inclusión. En esta fase existe una actividad metabólica grande, sintetizándose se proteínas y un gran número de macromoléculas. (FIGURA 4 )

Aproximadamente a las 20 horas del comienzo del ciclo, a partir de los CR se forman los cuerpos intermedios, fase de transición entre la forma reticular vegetativa y la forma elemental. Las formas intermedias presentan un nucleoide central, ribosomas, filamentos periféricos de DNA y están recubiertas por una doble membrana. -- Los cuerpos intermedios maduran y se condensan, dando lugar a nuevos cuerpos elementales.

Aparentemente, la célula huésped no sufre daños hasta el final del ciclo, cuando comienza a producirse la fusión lisosomal. Entonces la vesícula se desintegra y libera nuevos cuerpos elementales para comenzar de nuevo el ciclo.

La duración completa del ciclo, desde la fagocitosis del CE hasta la liberación de nuevas partículas infecciosas suele ser de 48 a 60 horas. ( Esquema II )

Las clamidias pueden crecer y reproducirse en una gran variedad de células en cultivos tisulares. Los cultivos celulares que han demostrado ser satisfactorios son los de una línea celular de fibroblastos de ratón ( células L ), las células BHK-21 (línea celular de riñón de crías de hámster ), Las células HeLa, de cancer cervical humano.

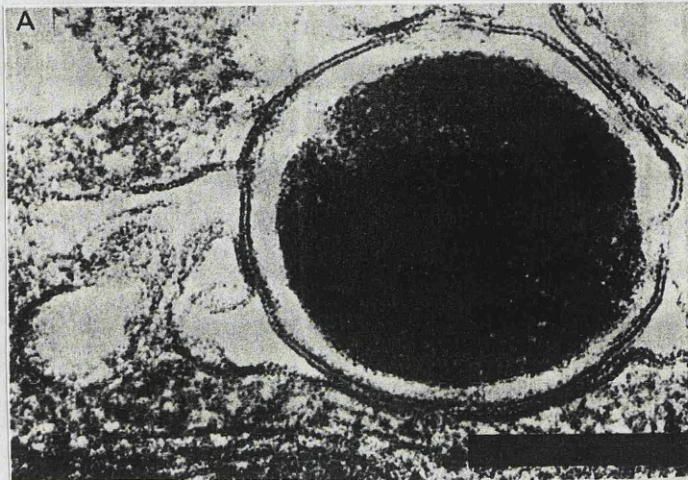


FIGURA 2: CORPUSCULO ELEMENTAL ALTAMENTE ADHERENTE A LA SUPERFICIE DE LA CELULA HUESPED. LA BARRA REPRESENTA  $0,2 \mu\text{m}$  DE LONGITUD.

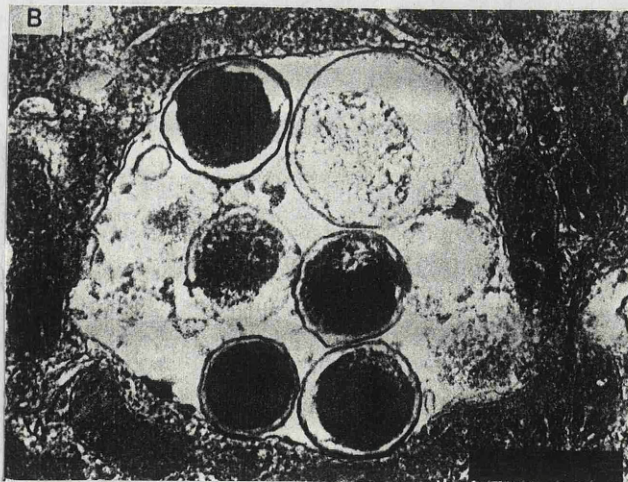


FIGURA 3: VARIOS CE DENTRO DE UNA SOLA VACUOLA EN EL INTERIOR DE LA CELULA HUESPED 3 HORAS DESPUES DE LA INFECCION. LA BARRA REPRESENTA  $0,3 \mu\text{m}$  DE LONGITUD.

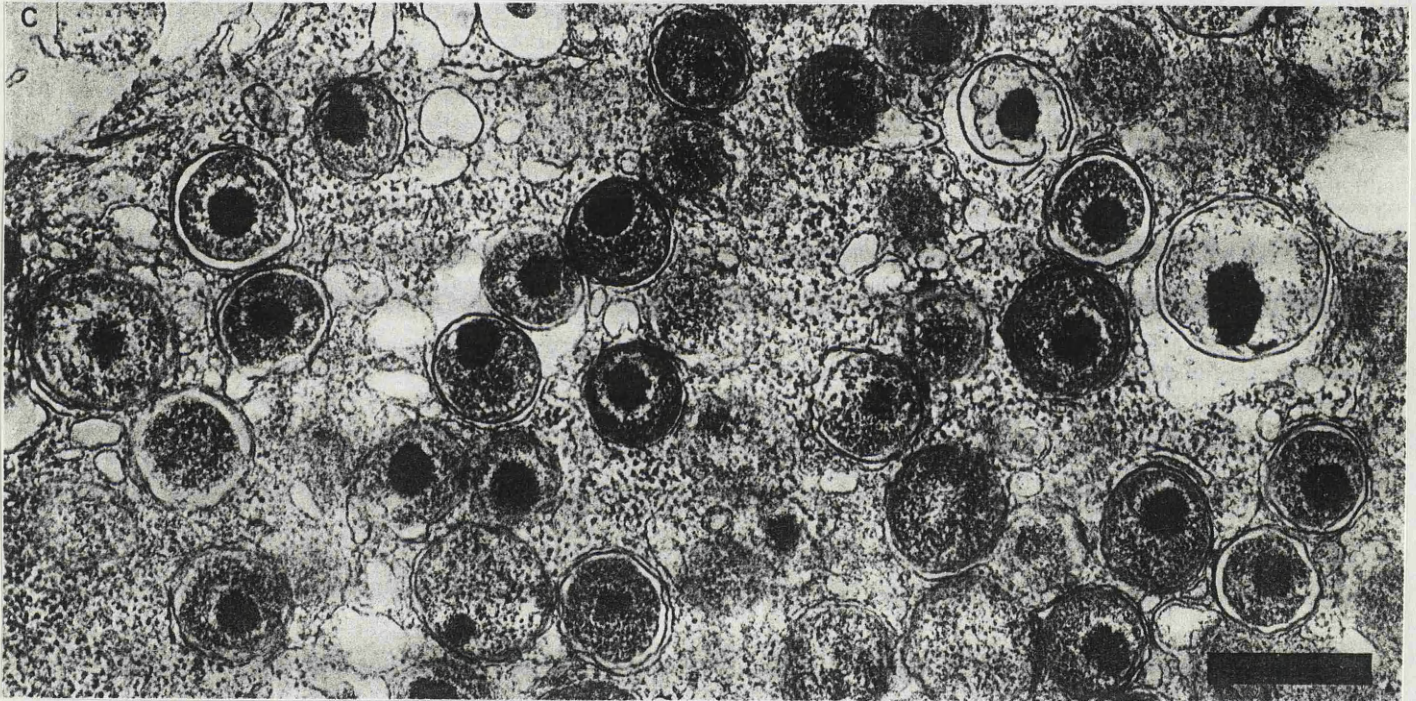
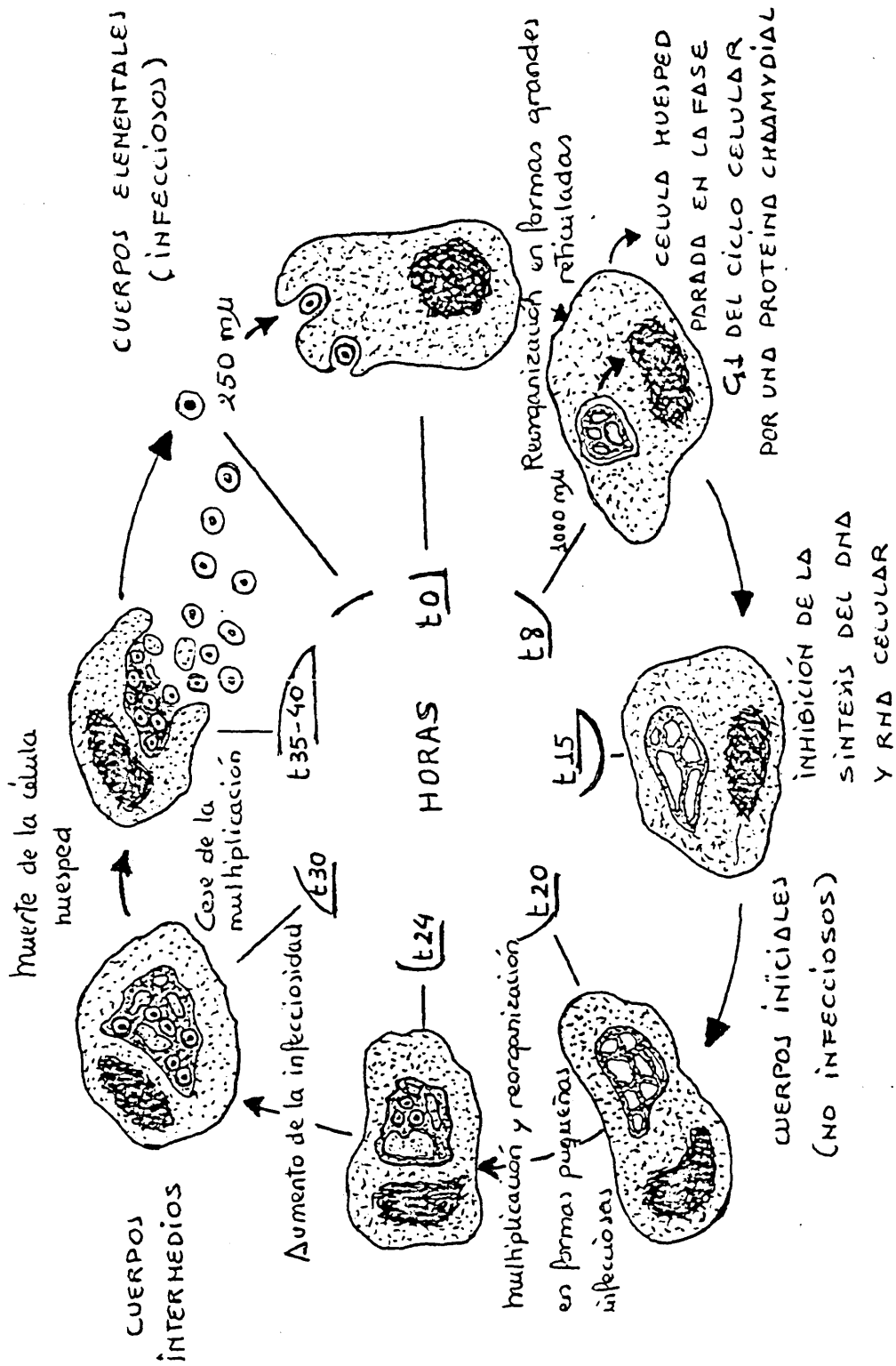


FIGURA 4:MULTIPLICACION E INVASION EN LA CELULA HUESPED DE  
LOS CE 3 HORAS DESPUES DE LA INFECCION. LOS CE SE  
ENCUENTRAN INCLUIDOS DENTRO DE UNA VACUOLA. LA BA  
RRA REPRESENTA 0,5  $\mu$ m DE LONGITUD.



ESQUEMA II: CICLO BIOLÓGICO DE LAS CLAMYDIA.

FACTORES DE VIRULENCIA DE LOS CUERPOS ELEMENTAL Y RETICULADO  
=====

Estos factores comprenden:

A- Ataque y fagocitosis inducidos por la bacteria.

B- Inhibición de la formación de fagolisosomas en la célula huésped.

C- Inducción a la formación de una citotoxina.

A- Ataque y fagocitosis.-

En las infecciones naturales como en cultivos celulares, las clamidias son fagocitadas por los macrófagos, pero también pueden ser ingeridas por células epiteliales que no son normalmente células fagocitarias. Así, pueden ocupar otro " nicho ecológico " y evitar los mecanismos habituales de defensa del organismo: macrófagos, monocitos, etc.

El ataque del CE<sup>c</sup> a la membrana de la célula huésped es la fase inicial de la fagocitosis. Byrne en 1972 separó la fase de ataque de la fase de ingestión de

las clamidias mediante tripsinización de células L inoculadas e incubadas a 37° C. Posteriormente, observó que -- existía un componente glucídico en la membrana de las células L que actuaba como receptor, la N-acetil-D-glucosamina ( NAG ). Si dicho componente era inhibido por una le citina ( que presenta gran afinidad por el azúcar ), el CE era incapaz de atacar a la célula huésped y, por lo tanto, no se realizaba la fagocitosis.

La ingestión de las clamidias constituye la segunda fase de la fagocitosis. Se produce una invaginación de la membrana limitante y la introducción de la partícula clamidial. La endocitosis es un proceso activo que depende de la temperatura ( 37° C. es la temperatura óptima ) y del metabolismo energético de la célula huésped.

En los macrófagos, la incorporación de los CE -- es muy rápida. Dicho proceso se ha seguido con microscopio electrónico. La entrada de los CE en los macrófagos se -- realiza en unos 30 minutos, estando o no estimulada la -- membrana de éstos con tioglicolato. Wyrick, en 1980, observó que un pretratamiento con calor ( 56° C. durante 5, 10 y 20 minutos ) aumentaba dicha incorporación, probablemente por un aumento en la adhesividad de la membrana externa.

La forma de entrar las clamidias en las células huésped fibroblásticas ( fagocitosis ocasional ) está en función de factores físicos y químicos de la célula huésped. Es necesaria una interacción directa entre el huésped y el microorganismo para que exista ingestión de la clamidia. Se ha demostrado experimentalmente ( Byrne 1978) que la ingestión de las clamidias depende de receptores celulares sensibles a la tripsina y a otras proteasas. Estos receptores están ampliamente distribuidos en las líneas celulares humanas y animales. La modificación de estos receptores por cicloheximida inhibe la penetración de la clamidia.

Las modificaciones físicas de la superficie de la célula huésped también estan implicadas en la penetración de las clamidias. La centrifugación con células huésped, a partir de 1000 a 3000g, aumenta considerablemente la infectividad de los CE, probablemente porque induce modificaciones en la superficie celular. Tres fases han sido descritas por Allan y Pearce:

- Una primera fase de unos veinte minutos, donde la unión es seguido de la ingestión.
- Una fase refractaria, durante la cual sigue produciéndose la unión de otras partículas
- Una tercera fase, después de cuarenta y cinco minutos, en la que solamente es posible la unión de unas pocas partículas.

Según Allan y Pearce, esto es debido a que las modificaciones de la célula huésped duran de 20 a 30 minutos, durante los cuales se favorece la entrada de la partícula bacteriana. Después de ese tiempo, cesan dichas modificaciones y el CE no puede penetrar.

#### B.- Inhibición de la formación de fagolisosomas.-

Las clamidias impiden la respuesta lisosomal, es decir, la fusión de lisosomas con la vacuola de endocitosis, de cuya unión se forman los fagolisosomas.

La inhibición de la respuesta lisosomal inducida por el CE le permite evitar las defensas celulares, asegurando la supervivencia intracelular.

La salida de las clamidias está en relación directa con la diferenciación y maduración del CE. Byone observó que las partículas infecciosas, CE, no inducían la respuesta lisosomal ni en macrófagos ni en células L. Por el contrario, si los CE son inactivados por calor ( 56°C durante 10 a 30 minutos ), o recubiertos por un anticuerpo específico, la fusión de lisosomas y endosomas se produce de 2 a 4 horas en macrófagos y en 12 horas en las células L después de la penetración.( FIGURA 5)

### C.- Inducción de toxinas citotóxicas.-

Moulder, en 1983, comprobó que, tanto "in vivo" como "in vitro", *C. psittaci* producía una toxina. Se ha visto que, "in vivo", las células que han sufrido una penetración masiva de CE mueren a causa de un producto tóxico segregado por éstos. El efecto puede contrarrestarse con antisuero, probablemente porque impide la unión del CE a la membrana citoplásmica.

La toxina no ha sido aislada, pero se ha observado que en los macrófagos, cuando existe un solo CE, la supervivencia y la multiplicación es máxima. En contraste, cuanto más CE existan en el interior del macrófago, más disminuida resulta la supervivencia de la clamidia, en relación con las lesiones celulares que producen. Estas lesiones son provocadas por la presencia de una enzima citoplásmica ( láctico deshidrogenasa ) que se encuentra en el medio extracelular dos horas después de haberse producido la infección. Esta toxicidad "inmediata", estudiada por Wyrick en 1978 y 1980, puede ser inhibida si los CE son tratados con calor ( 56° C durante 5 minutos ), y disminuye al 50% si lo CE son recubiertos por anticuerpos específicos o tratados con cloramfenicol.

En la célula fibroblástica, la toxicidad es máxima, puesto que los CE se dividen rápidamente en ella. - Moulder y Kellog sostienen la hipótesis de que ésta toxicidad es el resultado de una lesión de la membrana plasmática durante la ingestión, y no depende del grado de multiplicación de las clamidias. Así, se ha visto que la toxina se produce tardíamente en los fibroblastos, a las 24 o 48 horas después de la infección.

Schachter en 1983 observó que la exposición de cultivos celulares animales a grandes cantidades de CE, - más de 1000 partículas infectivas por célula, tiene como resultado la citotoxicidad y, habitualmente, estos cultivos son destruidos en 20 horas. El uso de dosis infectivas menores hace que aumente el tiempo necesario para que se produzca la muerte del cultivo celular. En ocasiones - algunas células pueden sobrevivir a la infección, quedando infectadas de manera continuada con una forma oculta de clamidias; estas células no están sujetas a la reinfección por clamidias exógenas.

La muerte celular, bien en animales intactos o en cultivos celulares, no requiere la multiplicación del agente infeccioso, pero está relacionada con la fagocitosis, y es posible que se deba a las múltiples lesiones - en la membrana plasmática durante la fagocitosis.



En las últimas etapas, el desarrollo de las clmidias en el interior de las células eucarióticas está acompañado por la liberación de enzimas lisosomales al citoplasma de la célula huésped, lo cual produce también -- efectos citopatogénicos.( FIGURA 6 )

Actualmente se cree que la toxicidad de las clmidias puede contribuir de un modo significativo a la patogenicidad de la enfermedad, como en el caso de la inducción de hemorragias y edemas en los pulmones

Los cuerpos reticulares no son fagocitados por las células epiteliales ni por los fibroblastos , únicamente pueden serlo por los macrófagos. En este caso los CR son rápidamente destruidos en los fagolisosomas de los macrófagos. Parece ser que los cuerpos reticulados inmaduros son susceptibles a las enzimas lisosómicas, y se protegen de ellas por medio de la membrana de inclusión durante las etapas preliminares del desarrollo. Los CR tampoco inducen la formación de toxinas ni "in vivo" ni "in vitro". ( FIGURA 7 )

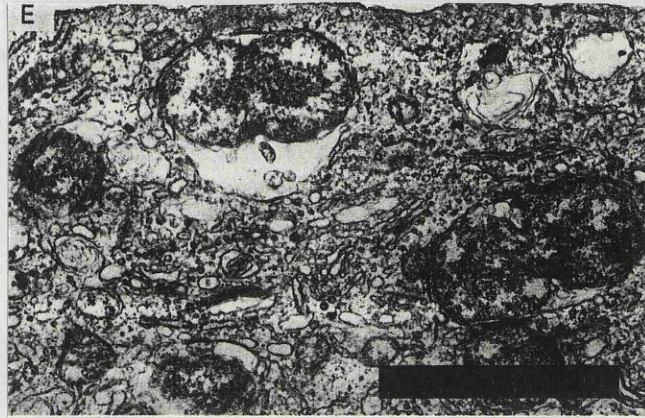


FIGURA 5: DIVISION POR FISION BINARIA DEL CR EN EL CITOPLASMA DE LA CELULA HUESPED. 9 HORAS DESPUES DE LA INFECCION. LA BARRA REPRESENTA 1  $\mu\text{m}$  DE LONGITUD.



FIGURA 6: CR INCLUIDOS DENTRO DE LAS VESICULAS. LA BARRA REPRESENTA 2  $\mu\text{m}$  DE LONGITUD.



FIGURA 7: RETICULOS INTERMEDIOS Y CUERPOS ELEMENTALES INMADUROS EN EL INTERIOR DE UNA CELULA HeLa. LA BARRA REPRESENTA 5  $\mu$ m DE LONGITUD.

C R E C I M I E N T O   Y   N U T R I C I O N

## CRECIMIENTO Y NUTRICION =====

C. psittaci, creciendo en células L mantenidas en el medio esencial de Eagle y en condiciones mínimas, no presenta requerimientos de aminoácidos que no sean los propios de la célula huésped, y no necesita ni histidina (His), ni arginina (Arg), ni lisina (Lys), ni glutamina (Gln), aminoácidos que sí necesita la célula huésped. La bacteria sintetiza Arg y Lys; probablemente también sintetice los otros aminoácidos.

No siempre es suficiente con que un aminoácido requerido por las clamidias esté presente en el pool de la célula huésped. La competición entre las clamidias y la célula huésped puede limitar el crecimiento de las bacterias, incluso en presencia de concentraciones sustanciales del aminoácido requerido. Cuando el microorganismo crece en la célula L con medio 199, utiliza isoleucina (Ile), sintetizada por ella misma, siempre y cuando la concentración de Ile sea superior a la requerida para la multiplicación de las células L. La adición de cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas en la célula huésped sin afectar a la bacteria, suprime esta competición y crece la bacteria, puesto que se suprime la competencia por los bajos niveles de Ile liberados en el conjunto de las proteínas de la célula L.

Este efecto diferencial de la cicloheximida permite examinar el requerimiento de aminoácidos cuando las bacterias crecen en células Mc Coy, en condiciones no competitivas, es decir, aquellas en las cuales la incorporación de aminoácidos a las proteínas del huésped es insignificante. En las células huésped tratadas con cicloheximida, la falta de leucina (Leu), valina (Val) o fenilalanina (Phe), hace que la multiplicación de las clamidias cese por completo, mientras que la falta de otro aminoácido no tiene ningún efecto, probablemente por que el volumen de las proteínas del huésped lo suple en cantidades suficientes.

En las enfermedades producidas por clamidias -- son comunes las infecciones persistentes, y se han ofrecido muchas explicaciones para este hecho. Una de ellas, es que las clamidias dejan de multiplicarse cuando la concentración de los nutrientes se encuentra por debajo de un nivel crítico. Esta predicción se ha confirmado en cultivos celulares para determinados aminoácidos ( Lewis y Thacker en 1978 ). Puede ser difícil averiguar si ésto -- también ocurre en las infecciones naturales.

La deficiencia en aminoácidos también puede afectar a etapas específicas del ciclo de desarrollo de las clamidias. Cuando se priva a las bacterias de cisteína, los corpúsculos reticulares se desarrollan normalmente, pero se inhibe su diferenciación para dar los cuerpos ele

mentales, posiblemente porque no sintetizan las proteínas ricas en cisteína que son necesarias para la maduración del CE.

El hecho de que se necesiten niveles muy elevados de Leu, Val, y Phe para el crecimiento de las clamidias sugiere que estos aminoácidos juegan algún papel -- además del de la incorporación a las proteínas de las -- bacterias.

De las vitaminas B presentes en el medio mínimo de Eagle, solo la riboflavina y el ácido fólico no son necesarios para el crecimiento de las clamidias en la célula L. La riboflavina no es necesaria por que las clamidias no presentan enzimas flavoprotéicas y posiblemente el ácido fólico sea sintetizado "de novo". Además se han encontrado en *C. psittaci* formas de ácido fólico que no se encuentran en las células L, y parece que sintetizan algo de ácido fólico "in vitro". Todas las clamidias son susceptibles a los análogos del ácido fólico. El crecimiento de las bacterias no es inhibido por sulfamidas.

M E T A B O L I S M O

## METABOLISMO

Se considera que las clamidias son parásitos -- energéticos porque utilizan al ATP producido por las células huésped y porque son incapaces de sintetizarlo. Además las células huésped proporcionan precursores esenciales - para las reacciones sintéticas de las clamidias y éstas - también pueden utilizar parte de la maquinaria metabólica del huésped.

Esta hipótesis está apoyada por varias líneas - de evidencias negativas: Weiss y Kissor ( 1983 ) demostraron que las células libres de *C. psittaci* carecen de enzimas flavoproteicas y de citocromos. Poblaciones mixtas de CR y CE llevan a cabo reacciones catabólicas que implican piruvato, glucosa, glutamato y otros sustratos, pero Moulder piensa ( 1984 ) que ninguno de estos elementos reduce energía metabólicamente útil. Las células L infectadas -- por *C. psittaci* presentan un aumento en la degradación de glucosa, sobretudo hacia ácido láctico, pero este aumento representa la respuesta del huésped a la infección y no - a la actividad de las clamidias.

También existen evidencias positivas para la hipótesis de los parásitos energéticos: los CR incorporan - GTP al RNA mediante mecanismos DNA-dependientes y DNA-independientes. Se utilizó una técnica de marcaje en equili

brio para demostrar que *C. psittaci*, que se está multipli-  
cando en las células L, incorpora uridina ( U ) y adenina  
( A ) exógenas a su RNA, en tasas que indican que las cla-  
midias están utilizando exclusivamente el conjunto de NTP  
del huésped.

Una evidencia incluso más directa, es el hecho  
de que los CR libres incorporan ATP y eliminan ADP de su  
espacio intracelular, mediante un mecanismo específico -  
de intercambio para estos nucleótidos. Este sistema de -  
translocasas de las clamidias es similar al existente en  
las rickettsias. El GTP, UTP y CTP también son transpor-  
tados al interior del CR, posiblemente por un mecanismo  
análogo.

La mayor parte del ATP que penetra en el CR es  
hidrolizada a ADP por una ATPasa clamidial e intercambia-  
da por ADP extracelular. Sin embargo, parte del ATP trans-  
portado hace un trabajo metabólicamente útil. En presen--  
cia de ATP la concentración de lisina se multiplica por -  
veinte.

Tanto el CE como el CR presentan actividades me-  
tabólicas diferentes que dependerán de la fase en que se  
encuentren dentro del ciclo de desarrollo.

La activación del metabolismo del CE constitu--

ye: la etapa inicial del ciclo después de la penetración - en el citoplasma de la célula huésped.

a.- Los CE requieren de determinadas funciones y sustratos de la célula huésped para la -- iniciación de su desarrollo.

a.1.- La hexoquinasa celular formará la glucosa 6-fosfato, que será el sustrato inicial en el catabolismo de la glucosa por las enzimas del CE. La degradación de la glucosa es efectuada por - la vía de las pentosas, por la liberación de CO<sub>2</sub> a partir del C<sub>1</sub> de la glucosa. La vía de la glucólisis será -- utilizada a partir de la escisión de la glucosa por el C<sub>3</sub>.

a.2.- Estas reacciones no están todas aso--ciadas a la producción neta de ATP -- únicamente como fuente de energía. -- Las clamidias regeneran la producción de ATP de la mitocondria de la célula huésped, como precursor de la síntesis de ácidos nucleicos.

b.- Modificaciones morfológicas

La primera modificación del CE es la desaparición del nucleoide. El DNA cambia de conformación, pasando de una forma compacta a una organización más laxa, que permite el acceso de las enzimas al genoma. Las moléculas de RNA-polimerasa se unen a la molécula de DNA, iniciando la síntesis de una nueva cadena.

Los CR son la forma metabólicamente activa de la clamidia. Durante las 18 primeras horas del ciclo la actividad metabólica es basal, aumentando progresivamente con la formación del CR.

Los CR utilizan sus propios ribosomas y enzimas para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, pero dependen enteramente de la célula huésped en lo concerniente a los intermediarios energéticos: NTP.

La síntesis de RNA en los CR es precoz, entre las 10 y las 22 primeras horas del ciclo. Las inclusiones teñidas con acridina se colorean de un rojo brillante --- fluorescente ( coloración típica del RNA monocatenario). Hay formación de t-RNA 4S y r-RNA 23S, y 16 S, típicos -

de procariontes, de 8 a 16 horas después de la infección. La síntesis de RNA continúa durante todo el ciclo, siendo la actividad máxima 20 horas tras la infección. Esta actividad es dirigida por una RNA- polimerasa DNA dependiente.

La síntesis de DNA aumenta progresivamente entre las 15 y 30 horas del ciclo. La molécula de DNA es replicada por una polimerasa codificada por el genoma bacteriano. La timina exógena no es incorporada al DNA, puesto que C. psittaci carece de la actividad timidina-quinasa. El d-TMP será formado por una vía diferente de síntesis - utilizando la conversión del d-UMP en el ácido tetrahidrofólico gracias a la enzima timidilato-sintetasa, presente en las clamidias.

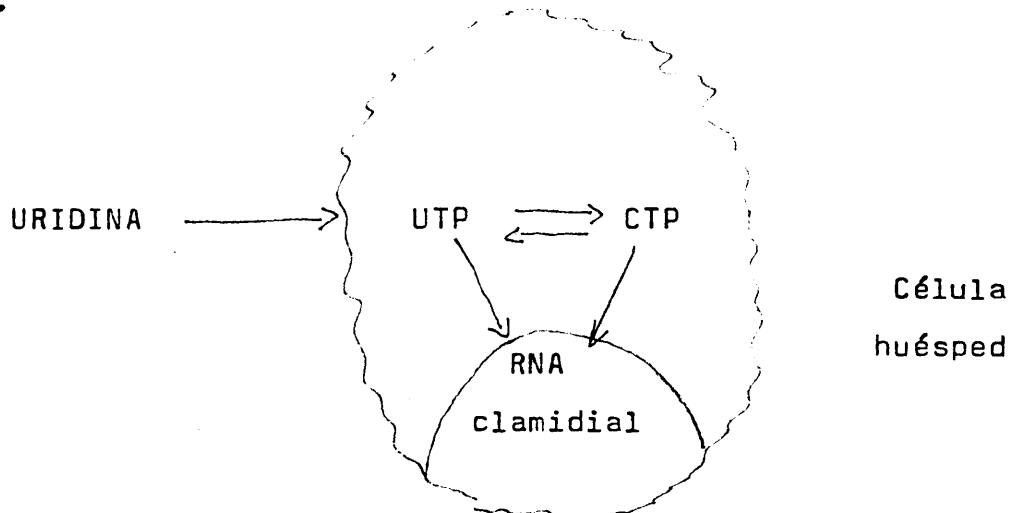
La síntesis de proteínas se detecta entre las 12 y 48 horas del ciclo. Estas proteínas no se ven afectadas por el tratamiento con cicloheximida de la célula huésped, ni por tratamiento con emetina. Sin embargo, son inhibidas por el cloramfenicol y las tetraciclinas. Los RNA 16S y 23S se unen a las proteínas para formar las subunidades 50S y 30S, que constituyen los ribosomas 70S.

Las clamidias son incapaces de sobrevivir fuera

de una célula eucariota. Estas entran en competición con la célula huésped por los factores extracelulares comunes y por los factores producidos por la propia célula huésped, requiriéndose la actividad de las mitocondrias.

La síntesis de ácidos nucleicos requiere una -- fuente de NTP. Los RNA 16S y 23S son sintetizados a partir de nucleótidos púricos y pirimidínicos trifosfatados de la célula huésped.

Hatch demostró que la guanina es incorporada en el DNA y RNA de la clamidia solamente si la célula huésped es capaz de transformarla en otro NTP, y no si la célula huésped es deficiente en hipoxantina fosforibosil transfe rasa.



Síntesis de RNA clamidial a partir de NTP pirimidínicos de la célula huésped.

E P I D E M I O L O G I A

## EPIDEMIOLOGIA

En las primeras infecciones por C. psittaci descriptas en la literatura, la fuente de infección fueron -- aves exóticas, importadas desde los trópicos, pertenecientes a la familia de los psitácidos ( loros, periquitos, - cotorras, papagayos ) motivo por el que la enfermedad recibió el nombre de psitacosis. Posteriormente, se ha demostrado que más de 130 especies diferentes de aves ( palomas, canarios, patos, pollos, gansos ) pueden ser infectadas por esta bacteria, por lo que en la actualidad se -- prefiere el término general de ornitosis. Realmente las -- psitácidas son fuente de infección en menos del 20 % de -- los casos ( Pumarola, 1983 ).

Las aves son el reservorio fundamental de C. psittaci. Pájaros adultos aparentemente sanos pueden ser portadores no excretores de la bacteria . Mayer en -- 1942 comunicó que un 8 % de los periquitos maduros eran portadores de este microorganismo.

El stress de las aves, asociado particularmente a una alimentación incorrecta, el hacinamiento, como puede ocurrir durante el transporte, el cruzamiento y la puesta, pueden producir la excreción del microorganismo. Las crías y animales inmaduros son muy susceptibles a la infec

ción a partir de las excretas de los adultos, y los que sobreviven se convierten a su vez en portadores.

El ave enferma muestra signos de somnolencia, - plumas erizadas, ojos cerrados, tiritona, pérdida de peso, descarga mucosa nasal, respiración fatigosa y, con menor frecuencia, diarrea.

Generalmente, la psitacosis humana es más grave cuando se contrae a partir de psitácidas; sin embargo, es de destacar que los pacientes que presentan psitacosis es porádica rara vez han estado en contacto con aves. En 1980 sólo el 17 % de los casos comunicados en Inglaterra habían tenido contacto conocido con aves exóticas domésticas o salvajes ( Palmer, 1981 ).

No existen datos exactos sobre la verdadera incidencia de la psitacosis humana, debido a que muchas de las infecciones que se producen no son diagnosticadas, o bien, no son notificadas en los diferentes países.

Antes de 1966 la incidencia media de casos notificados en Inglaterra estaba por debajo de los 40 al año. Desde entonces las cifras han aumentado considerablemente ( Lancet, 1973 ). Entre 1975 y 1980 se comunicaron 1.143 casos en Inglaterra. Los datos de 1979 ( 179 casos ) y de

1980 ( 384 casos ) son especialmente altos. Entre las razones para este aumento se pueden incluir una mayor vigilancia serológica, así como un aumento de la incidencia de la enfermedad.

Los datos obtenidos en los diferentes países sobre la incidencia de la psitacosis son muy variables, siendo probablemente, la falta de vigilancia serológica una de las causas. Así por ejemplo, en Alemania, con una cuarta parte de la población de Estados Unidos, se comunicaron más casos de psitacosis humana ( alrededor de 130 casos ) (Schachter, 1982 ), mientras que en Estados Unidos, sólo se comunicaron 108.

Los estudios realizados sobre la psitacosis como causa de neumonía en la población humana han dado resultados variables. Los trabajos realizados en Estados Unidos ( Marril, 1981 ) no identificaron a la psitacosis como un problema importante. De igual modo, se ha observado que la psitacosis es una causa rara de infección respiratoria aguda en el trópico, 0,4 % de 524 niños estudiados ( Chanock, 1967 ). Los estudios realizados en Inglaterra han implicado a la psitacosis como causa de neumonía adquirida en una comunidad de adultos en menos del 1 % de los pacientes en Edimburgo ( Bath, 1984 ), el 1,5 % en Bristol ( White, 1981 ), y el 3 % en Londres ( Crofton, 1981 ). Un estudio realizado en Finlandia ( Stenstroml, -

1980 ) 29 de 539 pacientes con neumonía ( 5,4 % ) presentaban psitacosis.

Existen pocos estudios clínicos sobre la incidencia de la psitacosis en los trópicos, probablemente -- por la dificultad de realizar pruebas serológicas. Sin em bargo, un estudio realizado en Egipto encontró psitacosis en el 4,8 % de los pacientes con neumonía ( Hassan, 1982). En Nigeria, en un estudio realizado por McFarlane ( 1972) no se detectaron casos . En Japón, la psitacosis puede ex plicar un 20 % de neumonía atípica ( Schachter, 1978 ).

En España se han publicado muy pocos trabajos - dedicados al estudio de la infección humana por C. psittaci ( Soriano, 1981 e Izquierdo, 1983 ), cuya incidencia - ha sido tradicionalmente considerada como muy escasa. Es necesario el empleo de pruebas serológicas múltiples para comprobar si la frecuencia de la psitacosis es realmente mayor de lo que hasta ahora suponíamos. A este res pecto, Pumarola en 1983 ha encontrado que la frecuencia de la neumonía por C. psittaci se aproxima al 4% de las neumonías en las que, tras un estudio sistemático y pro tocolizado, se consiguió llegar a un diagnóstico etiológ ico de certeza. Solans y cols. (1978) ha estimado esta frecuencia en un 0,96% en un estudio de 415 neumonías.

Un trabajo realizado por Ausina y cols. en 1985, sobre un total de 782 pacientes con neumonía, dió como resultado - que un 3,9% de dichas afecciones eran causadas por C. psittaci (Tabla y ),

El ave enferma o portadora asintomática, elimina continuamente el microorganismo a través de sus secreciones digestivas ( heces y saliva fundamentalmente) y -- respiratorias, contaminando el medio ambiente al que el - CE es muy resistente. Como fuentes de infección de naturaleza no aviar se encuentran numerosos mamíferos, como gatos, cabras, vacas, corderos, etc.

El mecanismo de transmisión al hombre puede ser indirecto, por inhalación de partículas portadoras de restos desecados de excrementos o de secreciones de aves infectadas; también puede ser por mecanismos directos, -- tanto por manejo y contacto con el ave infectada o con -- sus productos orgánicos, como por picadura.

También se puede producir la transmisión de hombre a hombre, y la infección en el personal de laborato-- rio. La enfermedad se da en personas que están en contac-- to con psitácidos recién importados, como son los criado-- res de aves, y también en personal que maneja pájaros en-- jaulados, generalmente después de haber mostrado los ani-- males signos de enfermedad.

En la industria de aves de corral se han comunicado brotes de la enfermedad en veterinarios y personal - empleado en plantas de procesamiento de pollos, pavos, etc.

	Ausina.	Berenguer.	Pumarola.
	23 casos	14 casos	13 casos
Sin antecedentes con <u>g</u> cidos.	8 (34,8%)	5 (37 %)	7 (53,8%)
Psitacidas.	9 (39,1%)	2 (14,3%)	1 (7,7 %)
Otras aves.	6 (26,1%)	7 (50 %)	5 (38,4%)

TABLA V . - ANTECEDENTES EPIDEMIOLOGICOS DE LA PSITACQSIS EN ESPAÑA.

P A T O G E N I A

## PATOGENIA

En los pájaros, los sitios de localización primaria de la enfermedad son el hígado, bazo y pericardio. Esto se ha comprobado en las necropsias de pájaros muertos en la etapa aguda de la enfermedad, en los cuales el bazo está aumentado de volumen y pueden mostrar zonas de necrosis focal. El hígado presenta cambios similares junto a hemorragia local e infartos. Se descubre un exudado semipurulento en el saco pericárdio y en el saco aéreo y revestimiento externo del esternón.

En el hombre el pulmón es el órgano más afectado. La infección comienza en los bronquiolos y se difunde a los alveolos adyacentes en un patrón lobulado. Existe un intenso exudado alveolar e intersticial que implica -- principalmente a las células mononucleares, eritrocitos, y neutrófilos ( MacFarlane, 1986 ).

Pueden observarse cuerpos de inclusión intracitoplásmaticos resultantes de la multiplicación del microorganismo en las células mononucleares. Se aprecia, así mismo, una proliferación y descamación marcada de células -- que revisten el alveolo, recibiendo esta patología el nombre de "neumonía de células alveolares" ( Yow 1959 ).

Características de los casos crónicos son que - el pulmón tiene una consistencia sólida, la superficie de corte aparece gelatinosa, los bronquios y tráquea con frecuencia se encuentran inflamados y con tapón mucoso extenso.

Los ganglios linfáticos están g<sup>e</sup>neralmente in-- inflamados y son elásticos. Los campos pulmonares pueden -- tardar en desaparecer o disolverse más de cinco semanas.

Los cambios en otros tejidos pueden ser, una inflamación atípica del bazo y una hepatitis reactiva. Tam-- bién se han observado granulomas hepáticos ( Cornog, 1967)

En el miocardio pueden existir infiltraciones - mononucleares, edemas, hemorragia subendocárdica y degene-- ración grasa.

El riñón puede presentar oclusión glomerular -- hialina y necrosis tubular aguda ( Byrom 1980 ).

No son raros la congestión y edemas cerebrales y puede aparecer una aracnoiditis fibrinosa. También se - han descrito inclusiones intracitoplásmicas en macrófagos procedentes de exudados meníngeos ( Wolton, 1984 ).

C L I N I C A

## CLINICA =====

Las características clínicas de la psitacosis - pueden ser muy variadas, tanto en el hombre como en otros animales..

### Clínica en el hombre.-

La psitacosis es igual de frecuente en ambos se xos y afecta generalmente a adultos cuyas edades están -- comprendidas entre 30 y 60 años. La infección infantil es poco común y suele ser benigna.

El período de incubación es de una a siete sema- nas tras el contacto con el ave enferma. No se ha observado variación estacional.

La presentación clínica de la psitacosis puede variar ampliamente, desde una enfermedad benigna parecida a la gripe, hasta un estado tóxico fulminante con muchos órganos implicados. ( Byrom, 1979 ).

La enfermedad puede desarrollarse de forma insidi osa durante más de una semana, pero puede aparecer brusca mente con fiebre alta, rigor, malestar y anorexia. Aun-

que la mayoría de las personas afectadas de psitacosis -  
tienen tos, esta no es siempre prominente. La tos puede -  
ser seca o con producción de esputo mucoso. La hemotisis  
y el dolor pleural son poco frecuentes, y el dolor abdomi  
nal se observa en un 25% de los pacientes.

Durante el proceso de la enfermedad la fiebre -  
permanece muy elevada, alrededor de 39°C, con remisiones  
matinales. Las cefaleas severas, artralgia, neuralgia y -  
fotofobia son importantes síntomas que predominan en más  
de un tercio de los enfermos de psitacosis.

El herpes labial es poco frecuente.

En el pecho son más comunes las crepitaciones -  
inspiratorias que los signos clásicos de consolidación --  
( manifestaciones extrapulmonares ).

El examen radiológico pone de manifiesto que de  
terminadas zonas del pulmón suelen mostrar sombras inters  
ticiales y alveolares mixtas desiguales, sobre todo en el  
lóbulo izquierdo. El sombreado lobular homogéneo es poco  
común. Puede observarse cierto grado de atelectasia en un  
tercio de los pacientes y, en más de la mitad, una reac---  
ción pleural.

Las difusiones pleurales importantes son poco -  
comunes. Se han comunicado casos de linfadenopatías hi--  
liares en más de un tercio de los pacientes ( Schaffner,  
1967 ). La cavitación es rara. La frecuencia de desaparici--  
ción de la sombra lobular en los pulmones es rápida, si -  
el paciente es tratado con tetraciclinas.

Se han dado casos de psitacosis fulminante (Lan--  
cet, 1979), en los cuales el comienzo de la enfermedad es  
brutal: escalofríos, elevación de la temperatura a 40°C,  
cansancio, vomitos y diarrea, edema peribucal o erupcio--  
nes blanquecinas en labios o lengua, que aparecen en los  
primeros días. Rápidamente aparece tos, disnea, a veces -  
intensa, síntomas de una hepatitis única o diseminada. El  
enfermo cae en un estado de agitación y delirio, produ--  
ciéndose la muerte a los ocho o diez días del primer sín--  
toma.

La psitacosis en los niños se presenta bajo la  
forma de una neumopatía agudo o subaguda, bronquitis seg--  
mentaria, o un síndrome infeccioso sin signos de localiza--  
ción. La evolución es, por regla general, favorable y las  
complicaciones no son citadas más que por su rareza: ane--  
mia hemolítica, miocarditis rápidamente mortal.

La frecuencia de complicaciones extrapulmonares producida por C. psittaci es difícil de precisar. La psitacosis aguda se ha relacionado con endocarditis, miocarditis y pericarditis.

Se ha detectado el antígeno de C. psittaci en el atrio izquierdo y en muestras de biopsia valvular en la cuarta parte de los pacientes con enfermedad valvular adquirida ( Mair, 1974 ).

En los pacientes con psitacosis aguda es común un estado de confusión que puede dominar el cuadro clínico y enmascarar el diagnóstico de neumonía. Además de la confusión se han descrito meningitis, encefalitis, signos neurológicos focales transitorios y epilepsia ( Murray, - 1980 ).

La glomerulonefritis puede desarrollarse secundariamente a partir de una endocarditis producida por -- psitacosis.

En 1977 Tuazon comunicó que en los procesos de psitacosis aguda se observaban también alteraciones hematológicas que incluyen hemólisis, pruebas de Korch positivas y coagulación intravascular diseminada. ( tabla VI )

## Clínica en animales.-

La infección adquirida naturalmente no es rara en algunos animales superiores, y es posible como proceso latente, incluso con una mayor frecuencia de la supuesta.

En el loro, la enfermedad se caracteriza por es calofríos, debilidad, apatía y diarrea, acompañada a veces de trastornos respiratorios. En estas aves la enfermedad es una infección de hígado, bazo y tracto intestinal, con participación ocasional de pulmones, habiendo microorganismos en la sangre, tejidos afectados, secreciones nasales y heces.

Cierto número de mamíferos están infectados por microorganismos muy parecidos en forma latente, y tales infecciones pueden activarse para originar enfermedades clínicamente manifiestas.

Existen pocos estudios realizados sobre enfermedades producidas por C. psittaci en mamíferos. Se piensa que la neumonía porcina, meningoneumonía de la zarigüeya, encefalitis bovina, el aborto de las ovejas y el moquillo

de los gatos están producidos por este microorganismo, pe  
ro todavía no existen los suficientes datos experimenta--  
les que apoyen ésto.

	Schaffner et al. 1967 9 casos	Pumarola et al. 1983 13 casos	Berenguer et al. 1985 14 casos	Ausina et al. 1985 35 casos
Tos	9 ( 100% )	9 ( 69% )	10 ( 71% )	21 ( 67,7% )
Disnea	4 ( 44,4% )	0 --	--	6 ( 19,3% )
Epistaxis	2 ( 22,2% )	--	--	--
Hemotisis	1 ( 11,1% )	0 --	3 ( 21,4% )	--
Dolor pleural	3 ( 33,3% )	4 ( 30% )	5 ( 35,7% )	13 ( 41,9% )
Fiebre	9 ( 100% )	13 ( 100% )	13 ( 93 % )	30 ( 96,7% )
Escalofríos	4 ( 44,4% )	10 ( 77% )	--	--
Nauseas y vómitos	4 ( 44,4% )	--	4 ( 28,5% )	--
				( Sigue )

	Schaffner et al. 1967 9 casos	Pumarola et al. 1983 13 casos	Berenguer et al. 1985 14 casos	Ausina et al. 1985 35 casos
Mialgias y artralgia	4 ( 44,4%)	3 ( 23%)	5 ( 35,7%)	12 ( 38,7%)
Cefaleas	3 ( 33,3%)	9 ( 69%)	4 ( 28,5%)	13 ( 41,9%)
Dolor abdominal	2 ( 22,2%)	- --	1 ( 7,1%)	-- --
Esteriores crepitantes	8 ( 68,8%)	8 ( 61%)	11 ( 78,5%)	24 ( 77,4%)
Signos de consolidación	6 ( 66,6%)	2 ( 15%)	-- --	2 ( 6,4%)
Hepatomegalia	5 ( 55,5%)	4 ( 30%)	6 ( 43%)	6 ( 19,3%)
Esplenomegalia	1 ( 11,1%)	3 ( 23%)	3 ( 21,4%)	3 ( 9,6%)
Obnubilación	3 ( 33,3%)	3 ( 23%)	-- --	-- --
Bradicardia relativa	2 ( 22,2%)	3 ( 23%)	-- --	-- --

TABLA VI: MANIFESTACIONES CLINICAS MAS FRECUENTES EN LA  
PSITACOSIS.

I N M U N I D A D

## INMUNIDAD

El conocimiento actual de la respuesta inmune - generada durante la infección clamidial y del control --- ejercido sobre la enfermedad es limitado.

### A- Respuesta inmune humoral.-

El conocimiento sobre la respuesta de los anticuerpos durante la infección por clamidias se basa en -- pruebas de microinmunofluorescencia, en las cuales las -- reacciones entre los anticuerpos y los microorganismos fi jados con acetona se detectan mediante un conjugado anti-globulina-fluoresceína. Estos datos, sin embargo, no dan información sobre la especificidad de los anticuerpos implicados.

Se ha confirmado que existe respuesta de anti-- cuerpos a los antígenos específicos de género, especie y serotipo ( Ward, 1983 ).

Parece ser que la inmunidad a corto plazo puede ser específica de serotipos, lo que implicaría un papel - importante para los antígenos de tipo.

Se han detectado tanto IgG como IgA en la conjuntiva. Sin embargo, no está claro hasta qué punto la presencia de IgG refleja la translocación desde el torrente sanguíneo.

La medida de la neutralización de la infectividad clamidial en cultivos celulares se complica por el uso de la centrifugación para promover la infección. Esta centrifugación parece alterar la interacción entre la partícula y la célula huésped, pudiendo ser la neutralización por anticuerpos apreciablemente más reducida en comparación con la infección espontánea de los cultivos celulares ( Pearce et al., 1981 ).

Durante algunos años se ha admitido la idea de la inducción de interferon por las clamidias y su capacidad para limitar la infección. Sin embargo, se desconoce su modo de acción y su importancia "in vivo".

#### B- Respuesta inmune celular.-

Los papeles de los mecanismos celulares citotóxicos, linfoides, y fagocíticos en la infección por clamidias no están aún bien definidos.

La interacción macrófago-clamidia depende de la

multiplicidad y la infección. La ingestión de altas dosis conduce a daños citotóxicos en una forma similar al fenómeno de citotoxicidad inmediata. A bajas dosis de clamidias, los macrófagos mantienen la multiplicidad de las mismas, pero una estimulación continuada con linfoquinas inhibe el crecimiento de las clamidias.

La acumulación de linfocitos polimorfonucleares es concomitante con la infección clamidial de la mucosa. Young, 1982, sugiere que las células polimorfonucleares de la sangre humana son muy eficaces para destruir clamidias mediante mecanismos dependientes o independientes de oxígeno.

Las células linfoides citotóxicas pueden tener un papel en la infección clamidial. Lammer, 1983, ha comunicado que las células del bazo de ratones infectados son tóxicas para macrófagos infectados por clamidias. Por lo tanto será importante dilucidar la fase de sensibilización de los macrófagos puesto que el efecto puede tener importancia para la protección mediante la destrucción temprana de las células infectadas.

### C- Infecciones latentes y persistentes.-

Las clamidias pueden tener períodos de latencia

verdadera in vivo, por ejemplo la no multiplicación; sin embargo, si esto ocurre en la mucosa, se produce la multiplicación de las clamidias para mantener la fase infecciosa, puesto que las células epiteliales se renuevan continuamente. Según Pearce, 1983, las fases de latencia se deberían a que los organismos deben de ser capaces de pasar a zonas más profundas de la mucosa o bien permanecer en - zonas n~~o~~ mucosas.

El término de latencia se aplica comúnmente a - la existencia de infecciones clamidiales que pueden ser a veces inaparentes microbiológicamente ( no se detectan organismos ), o clínicamente ( ausencia de enfermedad ). -- Aunque la forma de infección es diferente, en la práctica la infección latente.intermitente o persistente benigna, probablemente serían indistinguibles.

Es difícil asegurar hasta qué punto se producen estas fases en las infecciones por clamidias en el hombre.

Actualmente sólo podemos especular cómo aparecen las fases de latencia o persistencia.mediante estudios -- realizados en cultivos celulares. La infección persistente puede implicar un equilibrio entre el crecimiento mi--crobiano y las defensas del huésped. Un hábitat intraceluu

lar puede, como ocurre en otros microorganismos patógenos, proteger a las clamidias de las defensas del huésped, si el crecimiento intracelular no proporciona un signo extracelular de presencia o sólo lo hace cuando se ha producido un crecimiento importante.

La supervivencia de la clamidia en los macrófagos en ausencia de linfoquinas proporciona otro sistema de equilibrio, y se piensa que la liberación de los productos de los macrófagos podría contribuir al daño tisular ( Byrne, 1982 ).

La posibilidad de producir inmunodepresión es otro mecanismo que ayudará a la persistencia del microorganismo. Así, Lammer en 1983, comunicó la existencia de respuestas mitógenas por la célula del bazo cuando se encuentra infectada por *C. psittaci*. Lammer opina que el material de la envuelta no degradada podría mantener la inmunodepresión durante la infección.

La inducción de la infección latente en cultivos celulares se conoce desde los trabajos realizados por Morgan y cols. ( 1980 ). Tanto la destrucción de la célula huésped como la disminución de vitaminas y aminoácidos del medio de cultivo, no sintetizados por las clamidias, inhibe el crecimiento de éstas hasta que se restablecen -

los nutrientes del medio. La introducción de cicloheximida, que inhibe la síntesis de proteínas de la célula huésped, para aumentar la detección de las clamidias inoculadas a partir de material clínico en cultivos celulares, sugiere que no todos los microorganismos pueden iniciar su ciclo de desarrollo, incluso en condiciones nutricionales favorables. Se desconoce si este efecto está relacionado con la prevención de una respuesta inhibitoria del huésped, tal como el interferon, o con la heterogeneidad dentro de la población de clamidias.

Moulder ( 1980-82 ) ha descrito infecciones de cultivos celulares en división, en los cuales aparece una forma críptica de clamidia que se multiplica periódicamente. Esta forma inhibe la superinfección de la célula huésped y también altera la superficie de la célula. No se sabe qué determina la forma críptica y qué conduce a la activación y a la infección. Esta forma puede estar relacionada con clamidias que sobreviven pero no se multiplican cuando se suprime el tratamiento con cicloheximida.

Parace por tanto, que existen diferentes mecanismos que son responsables de una infección latente verdadera, lo que falta es la evidencia de que estas fases aparezcan in vivo.

DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

## DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de la psitacosis requiere el aislamiento del microorganismo o un estudio serológico de la respuesta inmune.

La obtención del material para el cultivo, al principio de la enfermedad, es impracticable en la mayoría de los casos porque, obién no se sospecha la infección, o bién no se dispone de esputo.

El microorganismo se puede aislar de animales de laboratorio ( Benson, 1930 ), saco vitelino del huevo embrionado ( Rake, 1941 ) o de cultivos celulares.

### A.- Animales de laboratorio.-

Generalmente se suele utilizar a los ratones como animales de experimentación en los laboratorios. Estos pueden ser infectados por vía intranasal, intraperitoneal e intracerebral, con la mayor parte de las cepas de este microorganismo, para dar lugar a infecciones mortales. La inoculación intranasal origina un proceso neumónico carac

terizado por consolidación y se descubren cuerpos elementales en gran número de frotis de tejido afectado.

En la necropsia, los animales infectados por vía intraperitoneal presentan agrandamiento de hígado, bazo y un exudado fibroso en la cavidad abdominal que con-- tiene gran número de cuerpos elementales.

Se ha producido una meningoencefalitis por ino-- culación intracerebral, dando lugar a un exudado que con-- tenía células polimorfonucleares y mononucleares.

Los ratones también pueden infectarse por ino-- culación subcutánea, produciéndose una afección generaliza-- da, raras veces mortal, y casi siempre de evolución pro-- longada.

La inoculación en animales de laboratorio se -- utiliza actualmente con poca frecuencia, constituyendo -- los cultivos celulares el método de elección.

#### B.- Huevo embrionado.-

Las clamidias pueden crecer en huevo embrionado de gallian, en el saco vitelino, donde se multiplican has

ta alcanzar un número elevado. En las células endoteliales se han observado inclusiones, y la toxina es liberada en el vitelo. La infección también puede producirse por inoculación en la membrana corioalantoidea y en las cavidades alantoidea y amniótica.

La multiplicación de estos microorganismos en el saco vitelino se acompaña de un metabolismo elevado y un aumento de la síntesis de ácidos nucleicos.

Las cepas de la psitacosis se han hecho resistentes a las sulfamidas, penicilina y tetraciclinas y diversas combinaciones de éstas por el pase seriado en saco vitelino en presencia de cada uno de los fármacos.

Este método de saco vitelino, aunque es muy sensible, tiene el riesgo de una rápida contaminación por organismos de elevada multiplicación y también requiere la obtención de huevos fértiles de dos o tres días.

#### C.- Cultivos celulares.

El agente de la psitacosis crece fácilmente en cultivos celulares. Esto se demostró por primera vez mediante el empleo de cultivos celulares suspendidos y explantes cultivados por la técnica de suspensión de una gota.

Hoy en día se cultiva el agente de la psitacosis en muchos tipos de células, por ejemplo, en fibroblastos L de ratón, células hepáticas humanas y de ratón, células sinoviales humanas, y fibroblastos de embrión de pollo.

La base de los cultivos celulares para el crecimiento de las clamidias, es la separación por centrifugación de los microorganismos de las capas de células que no se dividen o lo hacen lentamente.

El cultivo de *C. psittaci* se ha llevado a cabo generalmente utilizando células L y, estos microorganismos, igual que las cepas de LGV, pueden ser cultivados sin necesidad de utilizar células tratadas o centrifugación. Sin embargo, el tratamiento de las células y la centrifugación del inóculo han demostrado que incrementan la sensibilidad de la célula L para el aislamiento del agente de la psitacosis ( Farner, 1982 ).

Debido a la naturaleza esporádica y a la dificultad para obtener el material apropiado, los métodos de cultivo celular no se han aplicado mucho hasta ahora en la investigación de la psitacosis.

Otra forma de estudiar la infección por clamidias puede ser proporcionada mediante la detección de anticuerpos frente a estos antígenos, utilizando una gran variedad de técnicas serológicas:

A- Fijación del complemento.-

La fijación del complemento ( FC ) se utilizó - por primera vez para detectar anticuerpos frente a clamidias en casos de psitacosis ( Bedson, 1935 ) y posteriormente de LGV.

La FC es suficientemente sensible para detectar anticuerpos en infecciones sistémicas de psitacosis y LGV, pero su sensibilidad es limitada para infecciones clamidiales localizadas, Tiene la desventaja de que sólo detecta anticuerpos producidos contra un antígeno termoestable polisacarídico ácido, común a todos los miembros del género Chlamydia, por tanto, esta técnica no diferencia entre C. trachomatis y C. psittaci.

B- Inmunofluorescencia indirecta ( IFI ).-

a) Microinmunofluorescencia:

Esta prueba fue desarrollada por Wang y Greyston en 1970 frente a cepas de serotipos de C. trachomatis,

pero su finalidad era detectar anticuerpos clamidiales. - CE purificados se utilizan como antígenos y originalmente todos los serotipos de C. trachomatis ( denominados A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, LGV 1, LGV 2, y LGV 3 ) -- más algunas cepas de C. psittaci se aplicaron por separado como antígenos individuales en esta prueba, sin embargo la técnica se ha simplificado mediante la agrupación de antígenos, bien en base a sus reacciones serológicas, o en base a sus características epidemiológicas semejantes.

La microinmunofluorescencia detecta anticuerpos específicos de tipo producidos frente a serotipos clamidiales individuales, y por consiguiente, pueden diferenciar entre los anticuerpos producidos frente a C. trachomatis y C. psittaci y los aislados atípicos.

Se deben buscar anticuerpos en sangre, suero, secreciones locales o descargas, por ejemplo, fluidos lacrimales o secreciones cervicales.

Por la técnica de microinmunofluorescencia pueden ser detectadas inmunoglobulinas específicas de anticuerpos IgG, IgM, e IgA.

b) Otras pruebas de inmunofluorescencia:

b : Uso de inclusiones de antígeno de serotipo único: Esta técnica utiliza como antígeno inclusiones completas formadas en células de cultivos celulares infectados. Fue empleada inicialmente por Collier ( 1972 ) y mejorada posteriormente por Richmond ( 1975 ) que utilizaron el serotipo E de C. trachomatis como antígeno. También se utiliza un modelo similar que usa el serotipo LGV 2. Esta prueba puede detectar IgG e IgM en pacientes infectados - por C. trachomatis y C. psittaci, por lo tanto, es específica de grupo como la FC, aunque con mayor sensibilidad.

La tinción fluorescente de monocapas de cultivo celular produce invariablemente cierta tinción inespecífica, especialmente de células degeneradas, y esto hace que estas preparaciones sean más difíciles de interpretar que los antígenos purificados.

b : Uso de antígenos de CR de serotipo único: Young et al. ( 1979 ) utiliza CR purificados procedentes del serotipo E de C. trachomatis en una prueba de inmunofluorescencia. Los CR son las formas vegetativas. Esta prueba presenta una sensibilidad similar a la que utiliza CE purificados, y puede detectar IgG e IgM en el suero. El antígeno demostró tener especificidad de grupo. --

Sin embargo, este antígeno no es tan sensible para detectar IgG, sobre todo en infecciones agudas, y detecta IgM específica raramente.

#### C- Enzimoimmunoanálisis ( ELISA ).-

Se utilizó para detectar anticuerpos frente a clamidias en 1976 por Lewis, utilizando antígeno derivado de C. psittaci. Posteriormente se utilizó un antígeno de C. trachomatis ( LGV 2 ) tanto en forma de CE completos, como en forma de antígeno soluble específico de grupo. -- Aunque es específico de grupo, Levy ( 1982 ) encuentra -- que su sensibilidad es del mismo orden que la de la IFI - para detectar IgG.

#### D- Radioinmunoensayo ( RIA ).-

Esta prueba es específica de género, y puede detectar tanto IgG como IgA.

Tanto la técnica de ELISA como el RIA permiten un análisis tan rápido como la IFI, pero evitan la lectura subjetiva de los resultados que tiene lugar en esta última técnica.

T R A T A M I E N T O

## TRATAMIENTO

Como han demostrado la experimentación y la clínica, las tetraciclinas son el tratamiento de elección en las infecciones producidas por C. psittaci.

Los diferentes derivados de las tetraciclinas, clortetraciclinas, oxitetraciclinas, o el clorhidrato de tetraciclina asociado al hexametáfosfato de sodio, ejercen su acción sobre el crecimiento de las clamidias, es decir, son bacteriostáticas pero no bactericidas.

Las infecciones producidas por estos microorganismos son siempre intracelulares, con tendencia a volverse latentes o persistentes; por consiguiente no está recomendada una terapia a corto plazo. Generalmente se aconseja la administración de tetraciclinas durante un período de 21 días, con una dosis de 1 a 2 g/día. Después del tratamiento con tetraciclinas la fiebre y síntomas acompañantes suelen desaparecer en dos o tres días, aunque en algunos pacientes la mejora es más lenta.

Se ha recomendado un ciclo de 21 días porque períodos más cortos de medicación dan lugar a recaídas, aunque la evolución clínica fuese inicialmente favorable.

El cloramfenicol, la sulfadiazina y la penicilina a altas dosis, también pueden ser eficaces.

"In vitro", también se ha descrito la sensibilidad de C. psittaci a la rifampicina y su eficacia en la clínica ya ha sido señalada en algún caso de endocarditis subaguda producida por la psitacosis.

Aunque la eritromicina es más eficaz "in vitro" y es la alternativa al tratamiento con tetraciclinas, su rendimiento es bajo en caso de psitacosis aguda.

Algunos autores han considerado que el efecto -inhibidor de las sustancias quimioterápicas sobre el crecimiento de las clamidias implica la existencia de una actividad metabólica del microorganismo independiente de la célula y aún no descubierta. Aunque esta hipótesis quizá se confirme con demostración directa, y por tanto, más definitiva, también es posible que el efecto, al menos en parte, sea dependiente del mecanismo fisiológico de la célula huésped relacionado con la multiplicación del microorganismo.

Tiene particular interés que algunos microorganismos pueden hacerse resistentes a los quimioterápicos -

después de pasar por huevo embrionado o por ratón en presencia de estas mismas sustancias. La aparición de mutantes ha sido observada así mismo en el tratamiento quimioprolifático de la psitacosis en aves. En la enfermedad humana, la administración de tetraciclinas con una duración corta no parece entrañar el mismo riesgo.

P R O F I L A X I S

## PROFILAXIS =====

La psitacosis no es un problema de salud pública importante en función del número de casos que se comunican. Sin embargo, en la mayoría de los países, tienen regulada la importación de aves para intentar prevenir esta infección.

Las aves deben ser examinadas a su llegada para ser trasladadas posteriormente a locales de cuarentena, donde serán observadas durante 35 días. A veces se utilizan ejemplares no inmunes para detectar infecciones ocultas en estas aves importadas.

Este procedimiento se debe llevar a cabo, además de en las psitácidas, en las palomas, aves de rapiña, aves de exhibición y, en general, en todas las especies que no sean psitácidas.

En U.S.A y algunos países europeos, todas las aves importadas son tratadas profilácticamente con tetraciclina. Semillas medicadas con tetraciclina durante 30 días administradas como única fuente de alimento erradicarán la infección por el microorganismo. Suplementos multivitamínicos minimizarán la enteritis y otros síntomas relacionados con un tratamiento prolongado con tetraciclinas.

Sin embargo, no siempre se elimina el microorganismo de las aves tratadas, probablemente porque la dosis de tetraciclina no se aplica correctamente.

Se han realizado estudios serológicos previos al sacrificio para detectar infecciones por C. psittaci en plantas de procesamiento de aves. Esto no siempre tiene éxito en la prevención de los brotes de psitacosis en los empleados de estas plantas.

Se aconseja la destrucción de las aves enfermas para que no se produzca una epidemia; cuando esta recomendación no es aceptada debe aplicarse al ave enferma un tratamiento, consistente en mezclar con el mijo o agua de beber tetraciclina en una dosis de 15 a 30 mg., aunque el pájaro sano puede convertirse en portador.

Puede producirse la transmisión de hombre a hombre de la psitacosis, aunque es poco frecuente. Ocasionalmente se originan infecciones en cadena, como en 1939, cuando hubo una comunicación en Inglaterra que se refería a 26 casos con 13 muertos. Más recientemente, en 1977, once personas contrajeron la enfermedad a partir de un paciente que murió de psitacosis en un hospital. Entre ellas

se encontraban parte del personal médico de la planta, un limpiador, un paciente de la misma habitación y un paciente del enfermo. Aunque generalmente el diagnóstico de la psitacosis es retrospectivo, es esencial tener cuidado -- cuando se está tratando a un paciente sospechoso de la infección. El enfermo debe ser aislado en una habitación y el esputo y secreciones respiratorias deben considerarse como potencialmente infecciosos.

El tratamiento profiláctico con tetraciclinas - ha sido aconsejado para las personas en contacto estrecho con un paciente infectado.

A P O R T A C I O N

P E R S O N A L

## OBJETIVOS =====

*Chlamydia psittaci* es una bacteria intracelular obligada cuyas características biológicas y bioquímicas - no se conocen bien. Su comportamiento biológico "in vivo" no está claro del todo pues produce más patologías de las que se suponía en un principio.

La ruta de entrada y su mecanismo de transmisión estaban hasta ahora bien delimitados. Sin embargo, se están teniendo en cuenta otros posibles mecanismos de transmisión como puede ser el interhumano.

En España apenas se conoce la prevalencia de anticuerpos en población sana, debido tal vez, a la falta de un seguimiento serológico, y a que la psitacosis se -- considera como una enfermedad de aves.

El presente trabajo tiene por objetivos determinar la tasa de anticuerpos frente a *C. psittaci* en dos poblaciones supuestamente sanas, así como el estudio de un nuevo antígeno de inmunofluorescencia para determinar su sensibilidad frente a los antígenos de fijación del complemento ( FC ).

No se conoce la perdurabilidad de los anticuer-

pos frente a clamidias tras la infección. Al hacer una de terminación para conocer el estado inmunitario de una per sona frente a una especie de Clamidia, se detectan anti-- cuerpos de género que pueden deberse a infección por la - otra especie. Por esto, también se quiere determinar el - grado de posibles "reacciones cruzadas" entre C. psittaci y C. trachomatis.

M A T E R I A L   Y   M E T O D O S

MATERIAL  
=====

Entre Julio de 1985 y Julio de 1986 se han estudiado 289 muestras de suero humano y 214 muestras de suero de ganado bovino y ovino, las cuales han sido agrupadas de la siguiente forma:

I.- SUEROS HUMANOS.-

A.- Población sana compuesta por 148 muestras de suero -- procedentes de 73 varones y 75 mujeres, cuyas edades estaban comprendidas entre los 22 meses y 80 años. -- Estos sueros procedían del ambulatorio de Aranjuez y se obtuvieron entre Julio de 1985 y Enero de 1986. En este grupo se realizó una comparación de técnicas.

B.- Población sana compuesta por 111 muestras de suero, -- correspondientes a 56 varones y 55 mujeres, cuyas edades estaban comprendidas entre los 7 meses y los 65 años. Estos sueros se recogieron entre Mayo y Julio -- de 1986 y procedían de personas que se realizaban un chequeo en un laboratorio privado. En este grupo se -- realizó la determinación de anticuerpos frente a --

C. psittaci y C. trachomatis

C.- Población patológica: Se estudiaron 10 sueros que presentaban anticuerpos frente a L. pneumophyla, 8 con anticuerpos frente a HIV, 5 con anticuerpos frente a C. burnetii y 7 que presentaban anticuerpos frente a M. pneumoniae. En estos sueros se determinaron anticuerpos frente a C. psittaci, con el fin de detectar la existencia o no de reacciones cruzadas.

## II.- SUEROS DE GANADO.-

A.- Muestra de ganado bovino, formada por 107 sueros de vacas procedentes de nuestro medio. Los sueros se obtuvieron con la colaboración de personal del matadero de Pozuelo de Alarcón ( Madrid ).

B.- Muestra de ganado ovino compuesto por 105 sueros de corderos procedentes de la Provincia de Madrid. Las muestras se obtuvieron, así mismo, gracias a la colaboración del personal del matadero de Villaviciosa de Odón.

En ambos grupos se determinó la presencia de anticuerpos frente a C. psittaci mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta ( IFI ).

## METODOS

En la primera población sana se determinó la -- presencia de anticuerpos frente a C. psittaci mediante las reacciones de Fijación del Complemento ( FC ) y de Inmuno fluorescencia Indirecta (IFI ). En la FC se utilizaron -- dos antígenos distintos obtenidos, uno a partir de huevo embrionado ( P1 ) y otro de cultivo celular ( P2 ). En la técnica de IFI se utilizó un nuevo antígeno, obtenido mediante cultivo en huevo embrionado.

La técnica de FC está perfectamente estandarizada en el laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid donde se ha realizado esta Tesina.

La técnica de IFI está siendo utilizada para la determinación de anticuerpos frente a C. trachomatis, no encontrando en la bibliografía revisada ningún trabajo en el que se emplease esta técnica para la determinación de anticuerpos frente a C. psittaci

Las poblaciones de Aranjuez y Madrid fueron divididas en grupos de edad y sexo para realizar posteriormente un estudio comparativo de sus niveles de anticuerpos.

Las sangres del ganado bovino y ovino fueron extraídas en el momento del sacrificio y los sueros se conservaron a - 30 hasta el momento de su utilización.

En las poblaciones humanas, la sangre se extrajo en ayunas, el suero se separó por centrifugación y se conservaron en las mismas condiciones que la sangre del ganado hasta el momento de su uso.

## I.- METODO SEROLOGICO.-

A continuación se describen las técnicas utilizadas para el presente estudio.

### A.- FIJACION DEL COMPLEMENTO.-

#### 1.- Fundamento.-

Esta reacción se basa en la capacidad que tie--nen ciertos anticuerpos de fijar el Complemento cuando se encuentran formando agregados con antígeno.

Para visualizar la reacción se utiliza la capacidad del Complemento para lisar glóbulos rojos ( en este caso de carnero ) junto con un sistema hemolítico ( en este caso suero de conejo inmunizado contra los hematíes de carnero ).

Si en un suero problema hay anticuerpos específicos para el antígeno que queremos estudiar, se unirá al antígeno puesto por nosotros junto al complemento, e impedirán que éste lise los hematíes, que precipitarán formando un botón.

Si en el suero problema no hay anticuerpos que busquemos, el complemento quedará libre para poder lisis los hematíes, que no precipitarán, sino que se romperán.

## 2.- Material.

### a) Diluyente

Se empleó solución tamponada a pH 7,4 de veronal calcio-magnesio, Mayer Croff ( MC )

NaCl	85 g.
Acido dietilbarbitúrico	5,75 g.
MgCl <sub>2</sub>	1,68 g.
Ca Cl <sub>2</sub>	0,28 g.
H <sub>2</sub> O destilada	2000 ml.

Medir el pH y conservar en nevera.

Para su empleo, debe diluirse 1 MC/4 H<sub>2</sub>O destilada.

b) Antígeno

Se utilizaron antígenos comerciales purificados que fueron previamente titulados.

c) Complemento

Se empleó complemento comercializado de cobaya. La dilución del complemento es inestable, y debe prepararse inmediatamente antes de su uso. Se titula previamente.

d) Sistema hemolítico

Se compone de partes iguales de:

- 1.- Hematíes de carnero al 4% lavados con diluyente mediante centrifugación y dilución en MC (3 veces ).
- 2.- Hemolisina ( suero de conejo antiematíes de carnero ). La dilución óptima ( ap. 1/200), -- previa titulación, se hizo con MC

La mezcla se incuba a 37°C, 30 minutos al baño-maría

e) Suero control positivo

Mezcla de sueros humanos inmunizados.

f) Antígeno control no infectado

Preparado a partir de células cultivadas no infectadas.

g) Instrumental

- Pipeta multicanal de 12 diluidores, de 0,025 ml.
- Pipetas cuentagotas de propileno, de 0,025 ml.
- Dispensadores multicanales para distribuir 0,025 ml. por pocillo
- Placas de plástico de estireno rígido, con fondo en "U" de 96 pocillos (12 x 8)
- Espejo lector
- Pipetas automáticas de 0,1, 0,2 y 1 ml.

- Pipetas de vidrio graduadas
- Estufa a 37°C
- Microagitador
- Baño-maría a 56°C y 37°C
- Nevera

### 3.- Método

Titulaciones de los reactivos.

a) Titulación de Complemento y Hemolisina. Titulación cruzada.

Primer día

1.- Dilución inicial de complemento ( C ), 1/10

<u>NUMERO</u>	<u>MC</u>	<u>C 1/10</u>	<u>VOLUMEN</u>	<u>DIL. FINAL</u>
1	0,5 ml.	0,5 ml.	1,0 ml.	1/20
2	1,0 "	" "	1,5 "	1/30
3	1,5 "	" "	2,0 "	1/40
4	2,0 "	" "	2,5 "	1/50
5	2,5 "	" "	3,0 "	1/60
6	3,0 "	" "	3,5 "	1/70

( Sigue )

<u>NUMERO</u>	<u>MC</u>	<u>C 1/10</u>	<u>VOLUMEN</u>	<u>DIL. FINAL</u>
7	3,5 ml.	0,5ml.	4,0 ml.	1/80
8	4,0 "	" "	4,5 "	1/90
9	4,5 "	" "	5,0 "	1/100
10	9,5 "	" "	10,0 "	1/200

2.- Preparación de la microplaca.

- 2 gotas de MC en todos los pocillos de la -  
columna 1 a 10
- 1 gota de las diluciones de C en las colum-  
nas 1 a 10, empezando por la dilución más -  
alta ( 1/200 ). Agitar
- Dejar en nevera a 4 °C tapadas con papel hú-  
medo durante 18 horas.

Segundo día

1.- Diluciones de hemolisina.

<u>TUBO</u>	<u>MC</u>		<u>DIL. FINAL</u>
1	4,9 ml.	0,1 ml. hemolisina	1/50
2	2,0 "	2,0 " tubo 1	1/100
3	" "	" " tubo 2	1/200
4	" "	" " tubo 3	1/400
5	" "	" " tubo 4	1/800
6	" "	" " tubo 5	1/1.600
7	" "	" " tubo 6	1/3.200
8	" "	" " tubo 7	1/6.400

- 2.- Añadir a cada tubo de dilución de hemolisina una parte igual de hematíes de carnero al 4%
- 3.- Incubar al baño-maría a 37 °C durante 30 minutos. Guardar la microplaca en estufa el mismo tiempo
- 4.- Añadir 1 gota de cada mezcla hemolítica en las filas empezando por 1/6.400. Agitar bien.
- 5.- Incubar 30 minutos a 37 °C en estufa. Repetir la incubación
- 6.- Dejar a temperatura ambiente 2 horas. Leer.

Lectura:

Título de Hemolisina.- 1 Unidad: la más alta dilución que produce la mayor lisis a la dilución más alta de Complemento.

Título de Complemento.- 1 Unidad: la dilución que da 100 % de lisis a la dilución óptima de Hemolisina.

En la práctica se trabaja con 2 U de Hemolisina y 2 U de Complemento.

b) Titulación del Antígeno.

Se usa suero positivo de referencia, que se inactiva a 56 °C al baño-maría durante 30 min.

Hacer diluciones del antígeno con MC:

1/2 1/4 1/8 1/16 1/32 1/64 1/128 1/256

En placas Microtiter poner:

- 1.- 1 gota de MC en todos los pocillos
- 2.- Añadir suero positivo ( diluido 1/4 )  
a la columna 1. Hacer diluciones del  
suero con los microdiluidores hasta  
la columna 8.
- 3.-Poner en las filas las diluciones del  
antígeno, empezando por la mayor ( --  
- 1/256 )
- 4.- Añadir 1 gota de complemento a la di  
lución óptima ( 2U )
- 5.- Las columnas 9, 10, 11 y 12 son para  
ver posible anticomplementariedad del  
antígeno. Para ello enfrentamos las  
distintas diluciones de éste con 2,  
1 y 1/2, 1 y 1/2 U de complemento. Si  
el antígeno presenta anticomplementari  
edad a alta dilución debe desecharse  
se.
- 6.- Se incuba 18 h. a 4 °C, se añade una  
gota de la mezcla hemolítica, se agi

ta, se incuba 60 min. a 37 °C en estu  
fa y se lee

Título del Antígeno.- Es la mayor dilución de antí-  
geno que produce la titulación correcta del suero -  
de referencia y no presenta anticomplementariedad.

El antígeno suele usarse a 1 U ( a veces  
2 U )

c) Titulación de los sueros problema

- 1.- Inactivar los sueros a 56 °C al baño-maría 30 -  
min.
- 2.- Diluirlos al 1/8 en MC
- 3.- Añadir 0,025 ml. de MC en cada pocillo ( excep  
to en las columnas 1 y 9 )
- 4.- Poner en las columnas 1 y 9 una gota de la di-  
lución 1/8 del suero inactivado. Hacer sucesi-  
vas diluciones desde la columna 1 a la 8. Con  
la columna 9 lo mismo hasta la 12.

5.- Poner 1 gota de Complemento ( a 2 U ) en toda -  
la placa.

6.- Poner 1 gota de antígeno hasta la columna 8. --  
Las columnas 9, 10, 11 y 12 sirven para ver la  
anticomplementariedad de los sueros.

7.- Hacer control de antígeno, complemento y hema--  
tíes.

#### Control de Antígeno ( 4 pocillos )

a) 1 gota de MC en los pocillos 2, 3 y 4

b) 2 gotas de antígeno en el pocillo 1. Hacer dilu-  
ciones.

c) 1 gota de complemento ( a 2 U ) en los 4 pocillos

d) 1 gota de MC en los 4 pocillos ( para representar  
el volumen de suero )

#### Control de Hematíes

En 4 pocillos se ponen 3 gotas de MC

plementario.

Control de Complemento: Hemólisis en los pocillos 1 y 2, lo que indica que el complemento es tá correcto. En los pocillos 3 y 4, no hemólisis, por estar el complemento a dilución mayor.

Control de Hematíes: No hemólisis en los 4 pocillos.

Suero problema: Título = última dilución que -- presente un 100 % de precipitación ( no hemólisis ).

Poder anticomplementario de los sueros.-

Los pocillos 9, 10, 11 y 12 darán el posible poder anticomplementario de los sueros. Deben presentar hemólisis a menor dilución que el suero problema. Si da igual título, hay que absorber con complemento y repetir la titulación.

El poder anticomplementario puede deberse a contaminación queímica o bacteriológica, a una contenido anormalmente alto de delta-globulina o a la pre-

Control de Complemento ( 4 pocillos )

- a) 1 gota de MC en los pocillos 2, 3 y 4
- b) 2 gotas de complemento ( a 2 U ) en el primer pocillo. Hacer diluciones.
- c) 2 gotas de MC a cada pocillo ( para representar volumen de suero y antígeno )

8.- Agitar, dejar en nevera a 4 °C durante 18 h.

9.- Preparar la mezcla hemolítica y añadir 1 gota a cada pocillo ( incluidos controles )

10.- Agitar y poner en estufa a 37 °C, 30 min. Repetir la operación 2 veces. A las 2 horas se puede hacer la lectura.

Lecturas ( Figura 8 )

Control de Antígeno: Hemólisis en todos los pocillos, de lo contrario, el antígeno es anticom

sencia de inhibidores del complemento en el suero.

Para eliminar esta actividad enticomplementaria se realiza el siguiente procedimiento:

- Añadir 0,025 ml de complemento a un tubo de ensayo con 0,1 ml de suero.
  - a) Incubar al baño-maría a 37 °C, 30 min.
    - o
    - b) Dejar a 4 °C toda la noche e incubar a 37 °C en baño-maría 30 min.
- Hacer la dilución a 1/8 en MC y volver a realizar la titulación.



FIGURA 8: TITULACION DE LOS SUEROS POR LA TECNICA DE FIJACION DEL COMPLEMENTO.

## 8.- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.-

### 1.- Fundamento.-

La fluorescencia es la propiedad que tienen --- ciertos cuerpos de autoiluminarse al absorber la energía - suministrada por una radiación térmica, química o de fotones ( fotoiluminiscencia ), siendo esta última la que se utiliza en el fundamento del microscopio de fluorescencia.

No todos los cuerpos tienen la propiedad de la fluorescencia primaria o espontánea. Sin embargo, se puede proporcionar esta característica a través de unas sustancias llamadas fluorocromos, en cuyo caso se habla de fluorescencia conferida o secundaria.

Fueron Coons y Col, en 1942, los que, aprovechando esta propiedad de los fluorocromos de unirse con ciertas moléculas protéicas, descubrieron que los anticuerpos pueden hacerse fluorescente con la fijación química a isotiocianato de fluoresceína.

Sin embargo, el marcaje de estos anticuerpos -- presentaba muchas dificultades, siendo el mismo Coons, en 1954, el que consiguió poner en marcha esta técnica por un procedimiento indirecto. Para ello, se basó en la propiedad que tienen los anticuerpos de actuar como antígenos y producir anticuerpos contra ellos mismos ( anti-anticuerpos ). El mismo autor tuvo la idea de , en lugar de marcar el anticuerpo , marcar la inmunoglobulina-antiglobulina-anticuerpo, para lo cual conjugaba la inmunoglobulina con fluorocromo, el isotiocianato de fluoresceína.

así, en un primer tiempo, se fija el anticuerpo sobre el antígeno correspondiente, previamente preparado en un porta; luego se eliminan todos los anticuerpo que - el suero pueda contener no fijados y, en un segundo tiempo, se revela el fenómeno de la fijación por la adición - de la antiglobulina conjugada, la cual, si hay anticuerpos específicos, se fija sobre ellos marcándolos y dándoles la propiedad de la fluorescencia, siendo en este caso la reacción positiva. Si la reacción es negativa, la antiglobulina no encuentra soporte y se pierde.

## 2.- Reactivos.-

- Chlamydia psittaci-spot IFI, antígeno clamidial fijado sobre portas y obtenido a partir de huevo embrionado
  
- Control de Copenhague, suero testigo positivo humano.
  
- Globulina antihumana marcada con fluoresceína obtenida por inmunización de cabra con suero humano, y marcado posteriormente con el fluorocromo en frío.
  
- Disolvente PBS ( phosphate buffered saline ).  
pH 7,2.
  
- Contracolorante, Se usó azul de Evans el 1/100 en solución tamponada a pH 7,2, que se conserva en nevera durante varios meses. Para su uso inmediato hay que colcer a diluir al 1/100, quedando, pués, una dilución al 1/10.000.
  
- Glicerina tamponada.

### 3.- Material.-

- Microscopio para fluorescencia en luz U.V. --  
( x 40 ).
  
- Suero problema. No deben estar hemolizados y,  
si no se utilizan en el día, se congelan a --  
- 30 °C.

### 4.- Método.-

Seguimos la técnica modificada por Ambroise Tho-  
mas y cols. ( 1966 ).

- 1.- Se coloca la suspensión de antígeno clami-  
dial homogeneizado en pocillos de portas es  
peciales y se deja secar en estufa a 37 °C.
  
- 2.- Se diluyen los sueros problema partiendo de  
1/16 y diluciones al doble.
  
- 3.- Sobre cada uno de los pocillos de los por-  
tas con antígeno se coloca una gota de la  
dilución de suero correspondiente.

- 4.- En placas de Petri grandes y sobre papel -  
humedecido, se incuban a 37 °C durante 30 -  
minutos.
- 5.- Se vierte el suero sobrante y se lavan en -  
cubetas pequeñas durante 10 minutos en PBS,  
agitando y renovando éste a mitad de tiempo.
- 6.- Se sacan los portas de la cubeta y se colo-  
can oblicua o verticalmente para su deseca-  
ción en un dispositivo apropiado que puede  
ser un listón ranurado.
- 7.- Secados los portas, se deposita una gota --  
del conjugado-antigammaglobulina marcada, -  
previamente titulada y mezclada con el con-  
tracolorante de Azul de Evans diluido al --  
1/10.000.
- 8.- Se hace una nueva incubación a 37 °C duran-  
te 30 minutos en cámara húmeda.
- 9.- Se vierte el exceso de conjugado y contraco  
lorante y se hace un nuevo lavado de 10 mi-

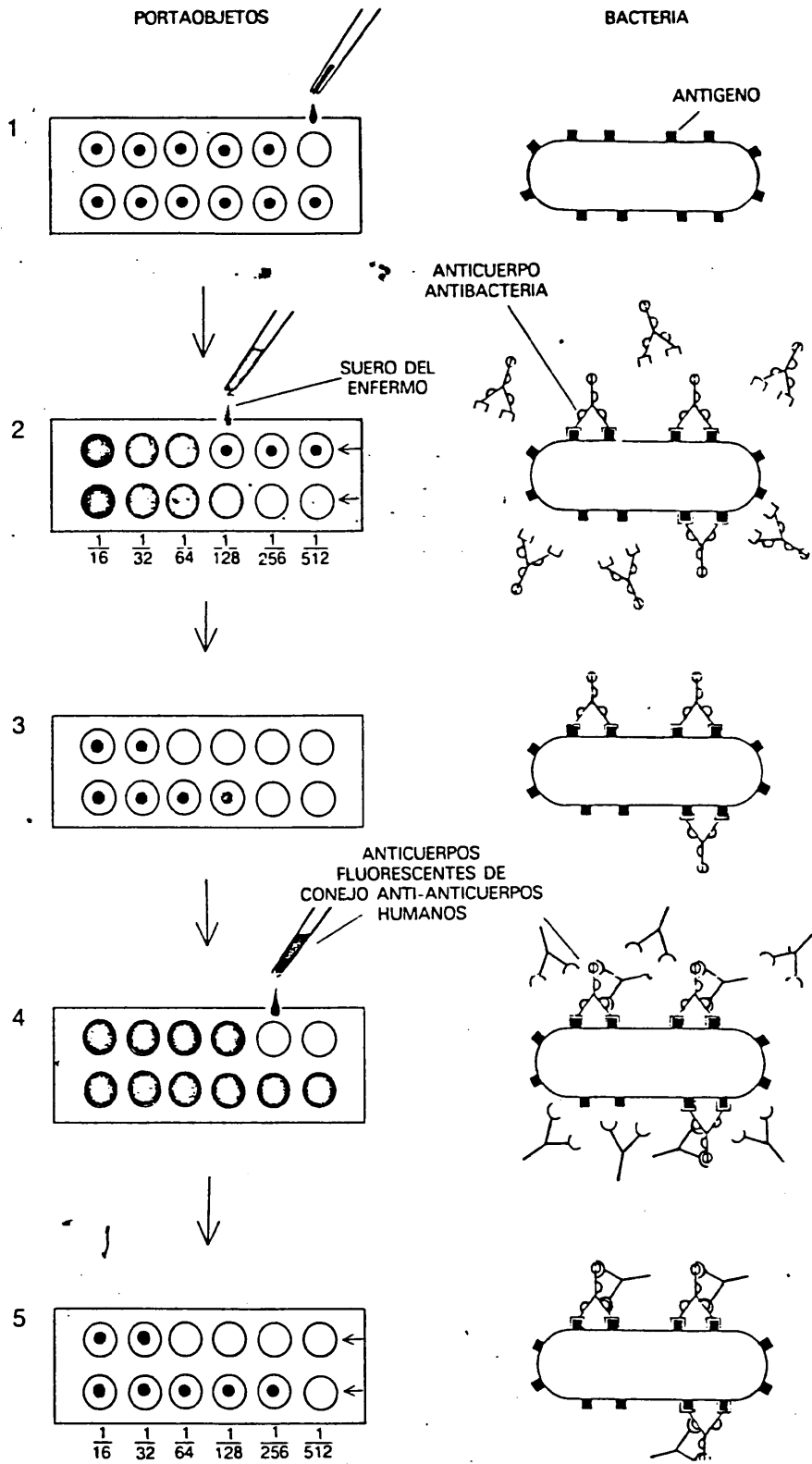
nutos con PBS, renovando el tampón a la mitad del tiempo.

10.- Se secan y se procede al montaje para su -- lectura, añadiendo antes una gota de glicerina tamponada, sobre cada círculo, colocándose el cubre encima. La lectura se hace -- con el objetivo de menor aumento ( x 10 ) - buscando la zona de mayor riqueza en corpúsculos fluorescentes. A continuación se pasa a hacer la lectura con el objetivo de 40 x.

Si las células se ven sin fluorescencia y sólo con el color rojo del contracolorante, la reacción es negativa. Si se aprecia dentro de ellas la presencia de puntos color verde manzana, la reacción es positiva.

El título de los anticuerpo nos lo da la dilución más alta del suero problema que presenta reacción positiva. Los resultados se expresan en Unidades Internacionales, para lo cual, en cada sesión de trabajo comparamos los resultados obtenidos con un suero patrón positivo.

( Esquema III )



**ESQUEMA III: ENSAYO DE INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA.**

## II.- METODO ESTADISTICO.-

Para el estudio de los datos recogidos en este trabajo se han empleado los siguientes conceptos estadísticos.

### 1.- Error "estándar" ( Comparación de porcentajes ).-

Se fundamenta en el intervalo de confianza --- ( margen de tolerancia de la población inaccesible ) y en la probabilidad de error ( P, probabilidad que escapa al - margen de tolerancia ).

Dado que en este trabajo se manejan variables - cualitativas, como la prevalencia, aplicamos a los distingtos grupos el porcentaje hallado en la muestra y determinamos el error "estándar" del porcentaje, es decir, la -- dispersión que presentaría la serie de porcentajes que -- iríamos obteniendo ante una hipotética repetición del experimento en muestras imaginarias sucesivas.

Mediante esta prueba se comparan los porcenta-- jes globales, obtenidos al realizar el estudio de las di-

ferentes técnicas, así como en la comparación de los porcentajes de títulos bajos, medios y altos.

Por otro lado, también se empleó esta prueba para determinar se las diferencias existentes entre las poblaciones de Aranjuez y Madrid, así como las observadas - en los distintos grupos de edad de cada una de ellas, tienen significación estadística.

Por último, se ha utilizado este "test" para determinar si los porcentajes globales obtenidos frente a - C. psittaci y C. trachomatis presentan diferencias estadísticamente significativas.

Matemáticamente, la diferencia entre estos porcentajes sería:

$$d = P_2 - P_1$$

$P_1 = \% \text{ de la población A ( Aranjuez )}$   
 $P_2 = \% \text{ de la población B ( Madrid )}$

Siendo  $P_1$  y  $P_2$ :

$$P_1 = \frac{r_1}{n_1}$$

$r_1 = \text{total de positivos totales de la población A}$   
 $n_1 = \text{nº total de sueros de la población A}$

$$P_2 = \frac{r_2}{n_2}$$

$r_2$  = total de positivos totales de la población A

$n_2$  = nº total de sueros de la población B

La diferencia (d) determinará si hay significación estadística entre los porcentajes:

- Si  $d \geq 2Sdp$  hay diferencias significativas entre las poblaciones A y B, con un riesgo de 5% de que exista una fluctuación fortuita ( $p < 0,05$ )

- Si  $d \geq 2,6Sdp$  hay diferencias significativas con riesgo menor de 1% de que exista una fluctuación fortuita ( $p < 0,01$ )

$$Sdp = \text{Error "estándar"} = P(1-P) \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)$$

$$P = \frac{r_1}{n_1} + \frac{r_2}{n_2}$$

## 2.- Criterio del $\chi^2$ .-

Para ver si dos muestras son homogéneas, o si hay diferencia significativa entre ellas se puede utilizar el criterio de  $\chi^2$  mediante la siguiente tabla y fórmula:

	<u>POSITIVOS</u>	<u>NEGATIVOS</u>	<u>TOTAL</u>
<u>MUESTRA 1</u>	a	b	a + b
<u>MUESTRA 2</u>	c	d	c + d
<u>TOTAL</u>	a+c	b+d	a+b+c+d

$$\chi^2 = \frac{(a \times d - c \times b)^2}{(a+b)(c+d)(a+c)(b+d)}$$

Si el resultado es mayor que el dato de las ta-

blas para una  $p$  determinada, existe diferencia significativa y no se debe al azar.

Si el resultado es menor que el dato de las tablas para una  $p$  determinada, la diferencia no es significativa y puede deberse al azar

Mediante esta prueba estadística se compararon las prevalencias de anticuerpos de ambas poblaciones en relación con la edad y el sexo.

En ambas pruebas estadísticas se toma un nivel de significación de  $p < 0,05$

## R E S U L T A D O S

## RESULTADOS

Se han separado los resultados obtenidos en cuatro grupos según el título de anticuerpos:

### A. En fijación del complemento ( FC ).

- negativos ( Neg. ): ausencia de anticuerpos o diluciones menores de 1/8.
- títulos bajos ( TB ): diluciones 1/8 - 1/16.
- títulos medios ( TM ): diluciones 1/32 - 1/64.
- títulos altos ( TA ): diluciones mayores de 1/64.

### B. En inmunofluorescencia ( IFI ).

- negativos ( Neg ): ausencia de anticuerpos o diluciones menores de 1/16.
- títulos bajos ( TB ): diluciones 1/16 - 1/32.
- títulos medios ( TM ): diluciones iguales a 1/64.
- títulos altos ( TA ): diluciones mayores de 1/64.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

## I. Comparación de técnicas.-

El porcentaje de anticuerpos detectado mediante la técnica de FC fué del 47,97% para el antígeno P1 ( huevo embrionado ) y del 41,21% para el antígeno P2 ( cultivo celular ). La técnica de Inmunofluorescencia determinó un porcentaje de seropositividad del 45,94%. Los resultados globales obtenidos por estas técnicas se recogen en - la Tabla VII y en la Gráfica 1, donde puede apreciarse - que no existen diferencias significativas estadísticamente en dichos resultados.

La comparación de los títulos bajos, medios y - altos obtenidos por cada uno de los antígenos se recogen en la Tabla VIII y en las Gráficas 2, 3 y 4.

Es de señalar que en los títulos bajos se observan diferencias estadísticamente significativas (  $p < 0,05$  ) entre el antígeno P1 y el P2, así como entre los antígenos P1 y de IFI.

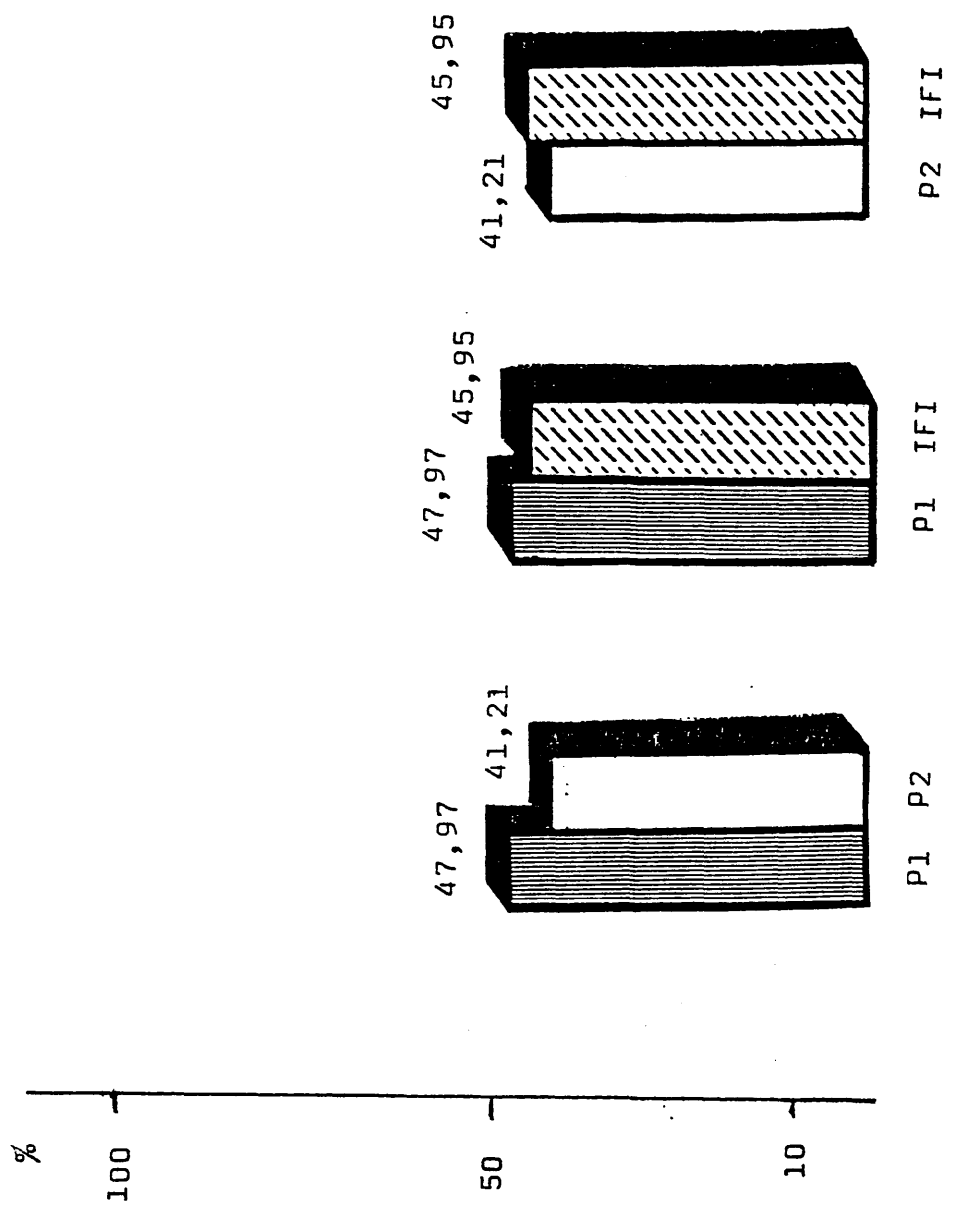
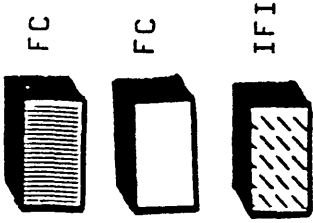
En los títulos medios también se observaron diferencias entre P1 y P2 (  $p < 0,01$  ) y entre estos dos antígenos y el de IFI (  $p < 0,01$  ).

El estudio estadístico realizado para comparar los porcentajes de títulos altos detectados por cada antígeno pone de manifiesto la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tres, P1, P2 e IFI (  $p < 0,01$  ).

Se determinó la sensibilidad del antígeno de -- IFI frente a los antígenos de FC, obteniéndose un índice de 0,764 con respecto a P1 y de 0,89 con respecto a P2. - Estos resultados se recogen en la Tabla IX.

	<u>NEGATIVOS</u>		<u>POSITIVOS</u>	
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
P1	77/148	52,02	71/148	47,97
P2	87/148	58,78	61/148	41,21
IFI	80/148	54,05	68/148	45,95

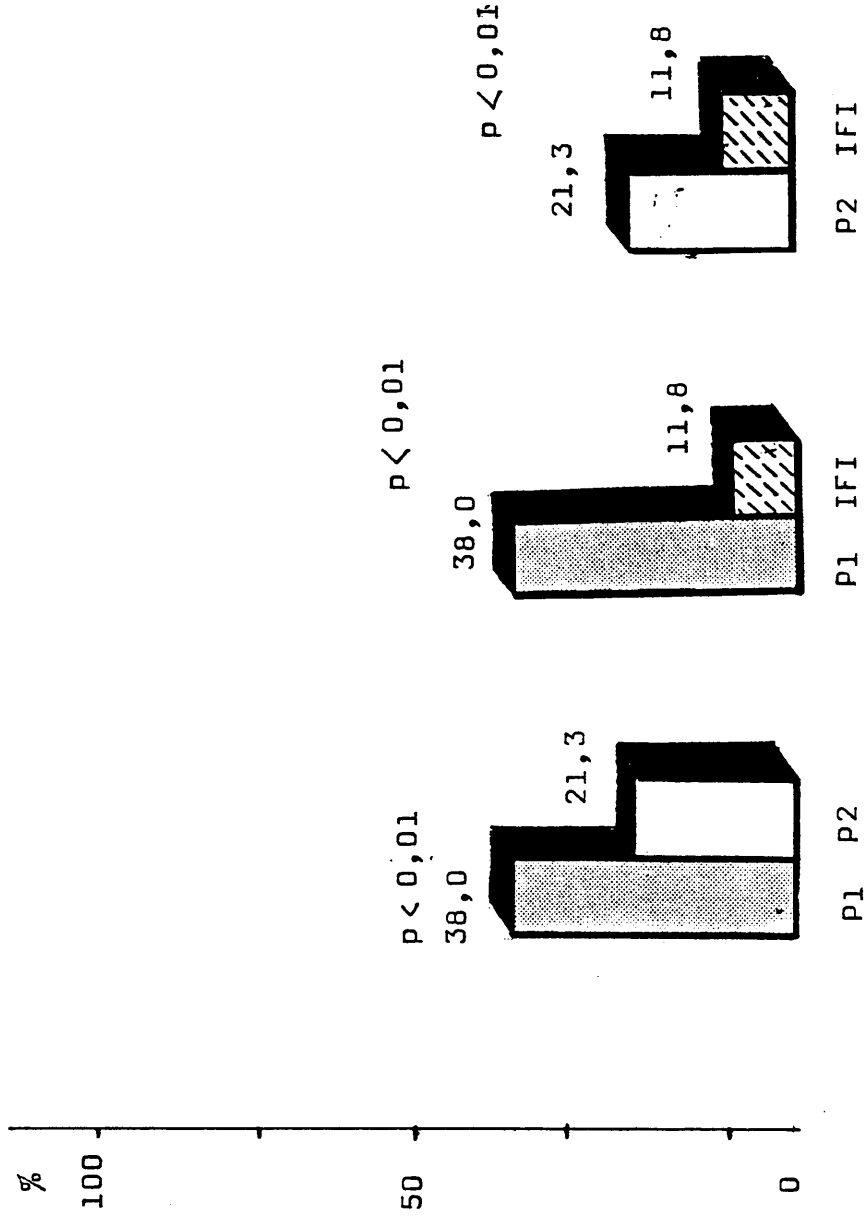
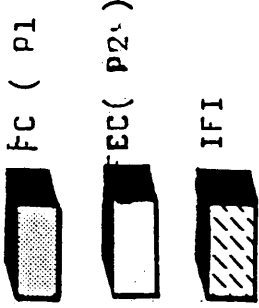
TABLA VII: RESULTADOS GLOBALES OBTENIDOS POR  
LOS TRES ANTIGENOS.



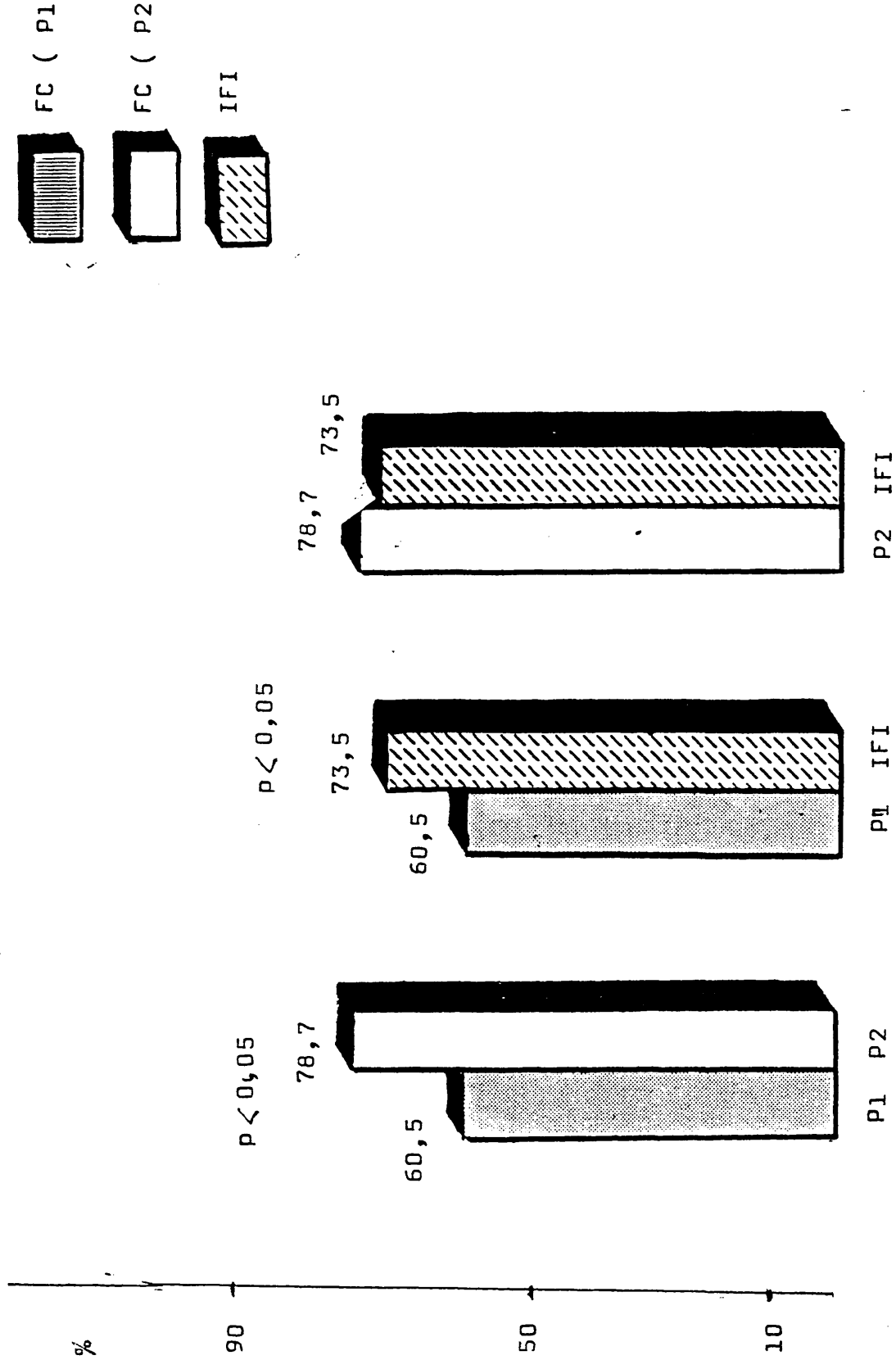
GRAFICA 1: COMPARACION DE LOS PORCENTAJES GLOBALES OBTENIDOS CON LAS TRES TECNICAS

	<u>POSITIVOS</u> <u>TOTALES</u>	<u>TITULOS</u> <u>BAJOS</u>		<u>TITULOS</u> <u>MEDIOS</u>		<u>TITULOS</u> <u>ALTOS</u>	
		<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
P1	71/148	43/71	60,5	27/71	38,0	1/71	1,4
P2	61/148	48/61	78,7	13/61	21,3	0	0
IFI	68/148	50/68	73,5	8/68	11,8	10/68	14,7

TABLA VIII: PORCENTAJE DE ANTICUERPOS OBTENIDOS CON CADA UNO DE LOS TRES ANTIGENOS.



**GRAFICA 3:** COMPARACION DE PORCENTAJES DE TITULOS MEDIOS OBTENIDOS CON LOS TRES ANTIGENOS.

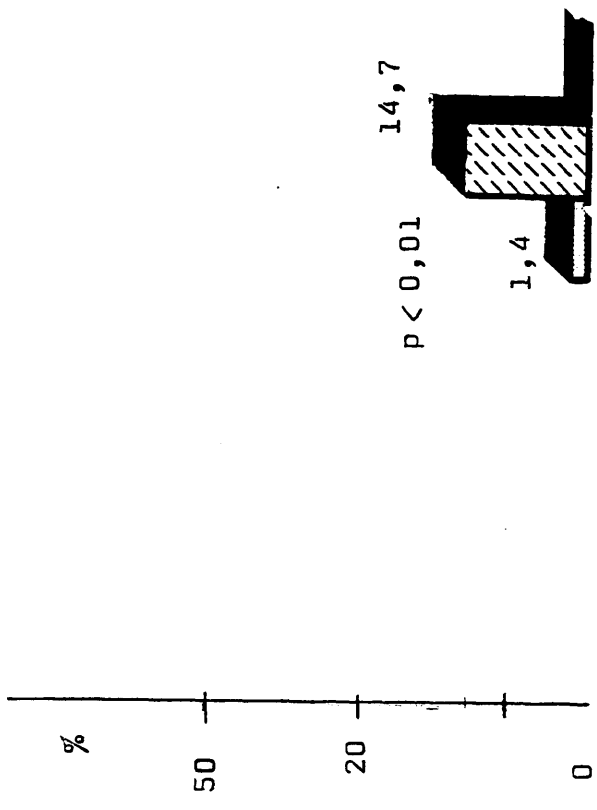


GRAFICA 2: COMPARACION DE LOS PORCENTAJES DE TITULOS BAJOS OBTENIDOS POR LOS TRES ANTIGENOS

FC ( PI



IFI



GRAFICA 4: COMPARACION DE PORCENTAJES DE TITULOS ALTOS OBTENIDOS CON LOS TRES ANTI - GENOS.

	FC <sup>+</sup> IFI <sup>+</sup>	FC <sup>+</sup> IFI <sup>-</sup>	FC <sup>-</sup> IFI <sup>+</sup>	FC <sup>-</sup> IFI <sup>-</sup>	Vp	Vn	IS
P1	55	17	7	59	72	66	0,764
P2	51	6	12	66	57	78	0,895

TABLA IX: SENSIBILIDAD DEL ANTIGENO DE IFI CON RESPECTO A  
LOS DOS ANTIGENOS DE FC.

## II. Estudio de C. psittaci en dos poblaciones.-

El porcentaje de individuos con anticuerpos frente a C. psittaci en la población de Aranjuez fué de 45,97% y en la muestra de Madrid capital resultó ser de 44,15%. Los datos globales de ambas poblaciones se recogen en las Tablas X y XI y en la Gráfica 5, donde puede apreciarse - que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ambas poblaciones.

En las Tablas XII y XIII y en las Gráficas 6,7 y 8 se recogen los datos obtenidos al agrupar ambas poblaciones por edades.

Al realizar el estudio estadístico en cada uno de los grupos de edad se observa que en ambas poblaciones existen diferencias significativas entre el grupo de más de 50 años y cada uno de los grupos de edad restantes --- (  $p < 0,01$  ).

En las Tablas XIV y XV y Gráficas 9 y 10 se recogen los resultados agrupados por sexos.

En Madrid capital, la prevalencia de anticuerpos observada en varones es de 42,85% y en mujeres de 45,45%, no habiendo diferencias estadísticamente significativas.

En la muestra recogida en Aranjuez la prevalencia de anticuerpos en mujeres es del 40%, siendo en varones de un 52,05%. Las diferencias detectadas tenían significación estadística (  $p < 0,01$  ).

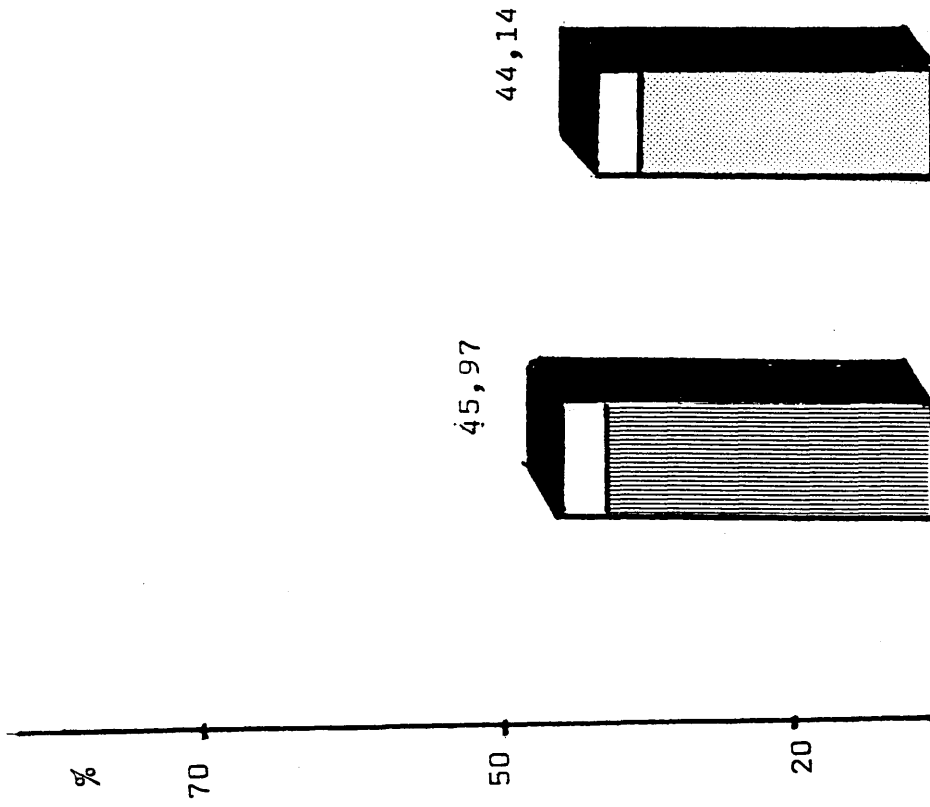
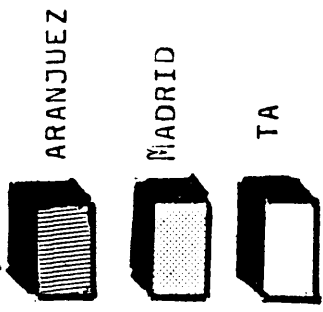
Al realizar un estudio comparativo entre ambas poblaciones se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre los varones de Aranjuez y Madrid capital ( $p < 0,01$ ) no existiendo estas diferencias en las mujeres, para las que ambas muestras resultaron ser muy similares.

<u>TITULOS</u>	<u>NUMERO</u>	<u>PORCENTAJE</u>
POSITIVOS TOTALES	68/148	45,94
POSITIVOS BAJOS	50/148	33,78
POSITIVOS MEDIOS	8/148	5,40
POSITIVOS ALTOS	10/148	6,75

TABLA X: RESULTADOS GLOBALES DE LA POBLACION DE ARANJUEZ

<u>TITULOS</u>	<u>NUMERO</u>	<u>PORCENTAJES</u>
POSITIVOS TOTALES	49/111	44,14
POSITIVOS BAJOS	30/111	27,02
POSITIVOS MEDIOS	12/111	10,8
POSITIVOS ALTOS	7/111	6,3

TABLA XI: RESULTADOS GLOBALES DE LA POBLACION DE MADRID -  
CAPITAL.



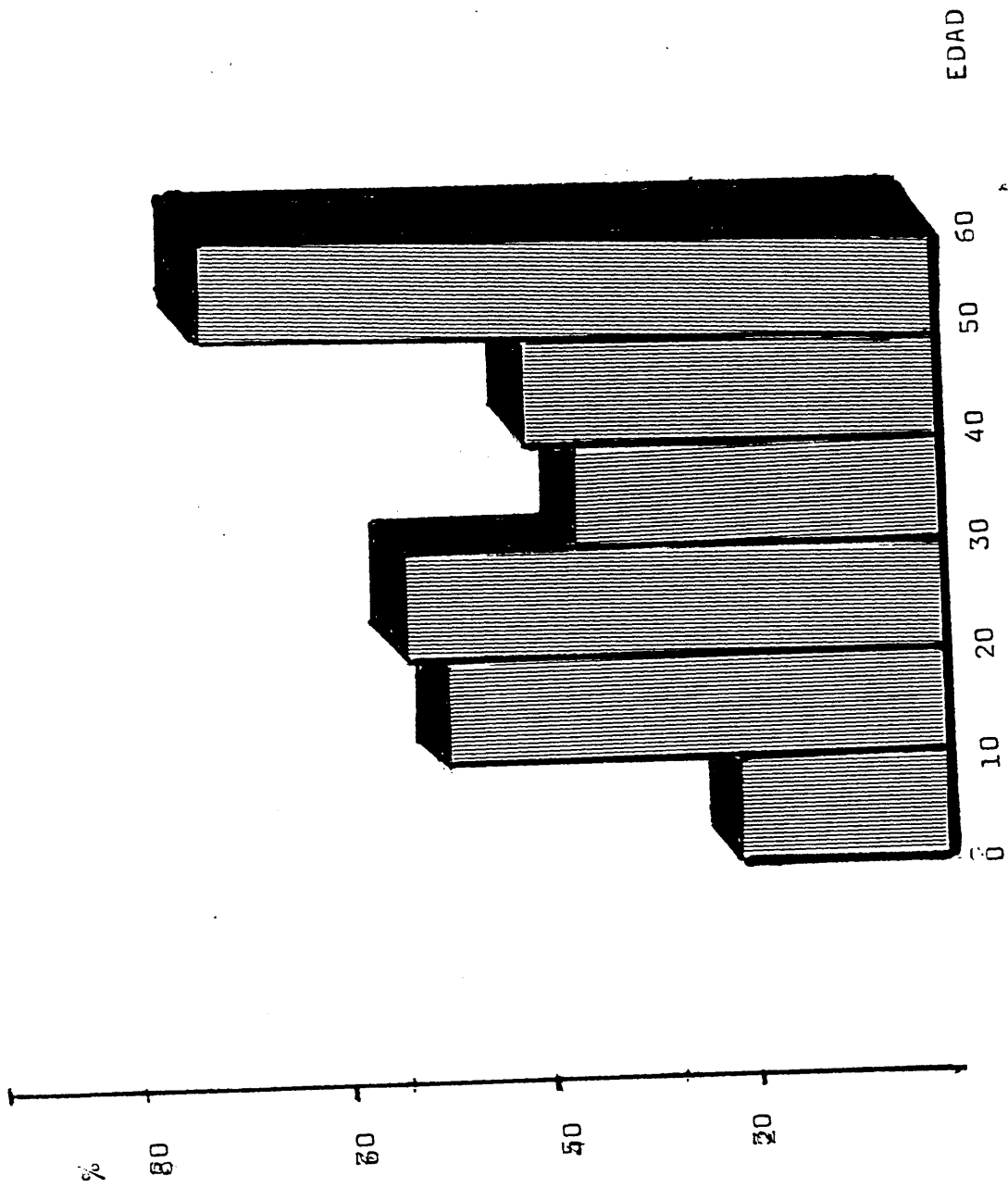
GRAFICA 5: COMPARACION DE PORCENTAJES GLOBALES OBTENIDOS EN AMBAS POBLACIONES.

	<u>POSITIVOS</u> <u>BAJOS</u>		<u>POSITIVOS</u> <u>MEDIOS</u>		<u>POSITIVOS</u> <u>ALTOS</u>		<u>TOTAL</u>
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>	
0-10	3/20	15	2/20	10	0	0	20
11-20	7/25	28	3/25	12	2/25	8	25
21-30	7/22	31,8	3/22	13,6	2/22	9	22
31-40	5/22	22,7	1/22	4,5	1/22	4,5	22
41-50	2/9	22,2	2/9	22,2	0	0	9
50	6/13	46,1	1/13	7,6	2/13	15,3	13
TOTAL	30/111		12/111		7/111		111

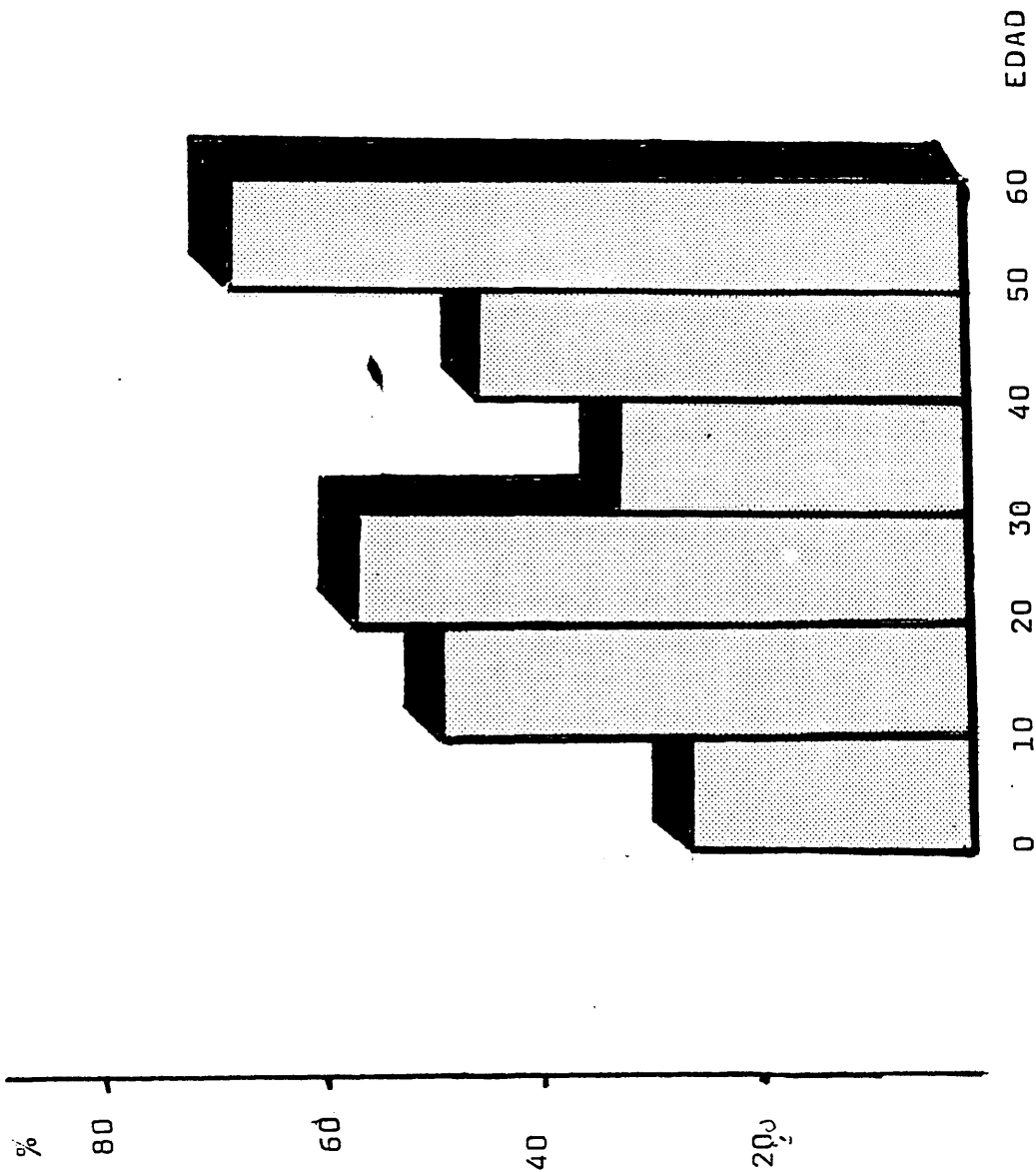
TABLA XII: RESULTADOS GLOBALES DE LA POBLACION DE MADRID  
CAPITAL AGRUPADOS POR EDADES.

	<u>POSITIVOS</u> <u>BAJOS</u>		<u>POSITIVOS</u> <u>MEDIOS</u>		<u>POSITIVOS</u> <u>ALTOS</u>		<u>TOTAL</u>
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>	
0 -10	4/20	20	0	--	0	--	20
11-20	9/27	33,3	2/27	7,4	2/27	7,4	27
21-30	13/33	39,4	2/33	6,0	2/33	6,0	33
31-40	9/33	27,3	1/33	3,0	2/33	6,0	33
41-50	0	--	2/10	20	2/10	20	10
50	15/25	60	1/25	4,0	2/25	8,0	25
TOTAL	50/148		8/148		10/148		148

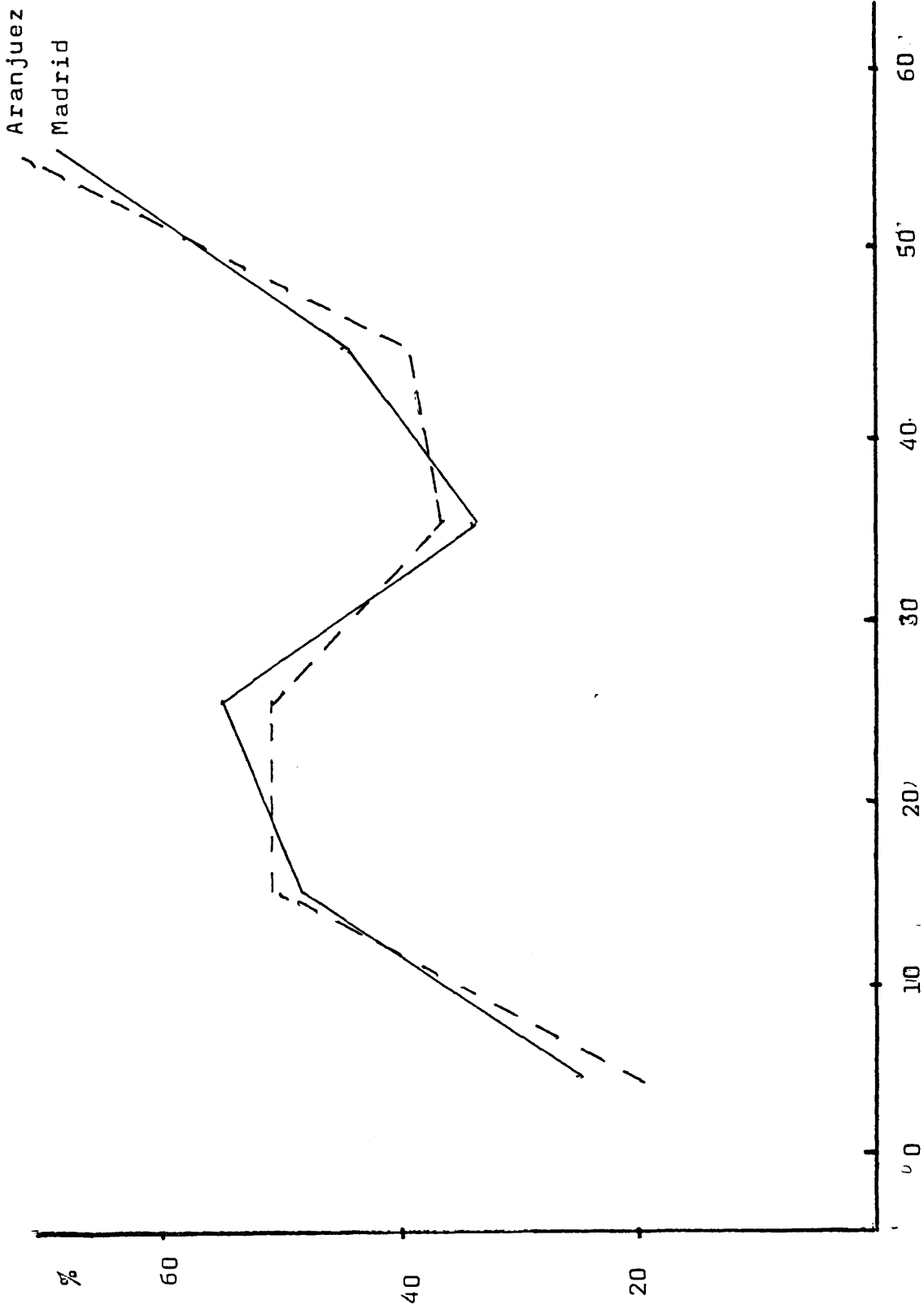
TABLA XIII: RESULTADOS GLOBALES DE LA POBLACION DE ARANJUEZ  
AGRUPADOS POR EDADES.



GRAFICA 6: COMPARACION DE PORCENTAJES D ANTICUERPOS DE LA POBLACION DE ARANJUEZ AGRUPADA POR EDADES.



GRAFICA 7: COMPARACION DE PORCENTAJES DE ANTICUERPOS DE LA POBLACION DE MADRID POR EDADES.



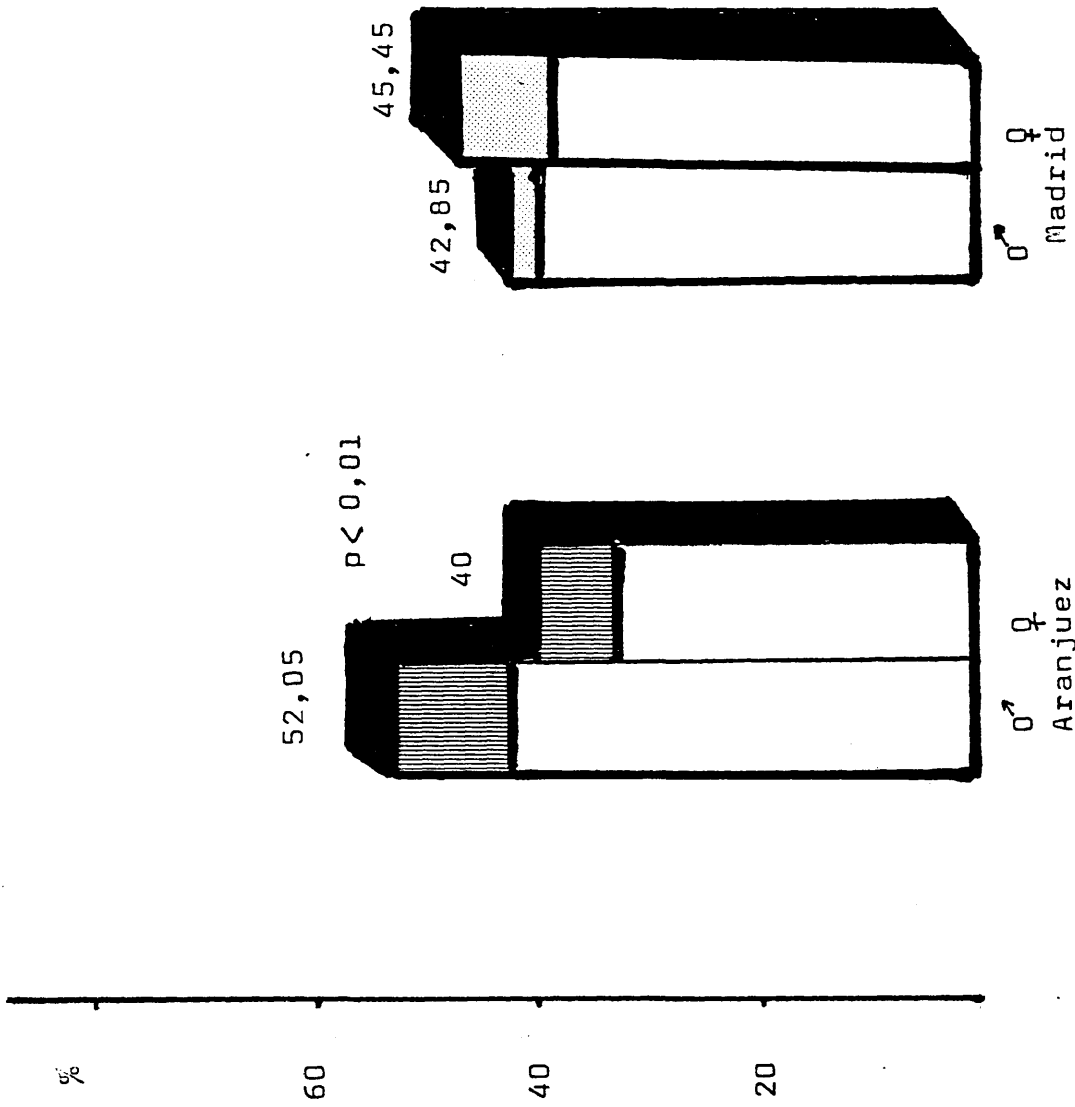
GRAFICA 8: COMPARACION DE PORCENTAJES DE AMBAS POBLACIONES AGRUPADAS POR EDADES.

<u>TITULOS</u>	<u>VARONES</u>		<u>MUJERES</u>	
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
POSITIVOS BAJOS	29/73	39,7	21/75	28
POSITIVOS MEDIOS	3/73	4.1	5/75	6,6
POSITIVOS ALTOS	6/73	8,2	4/75	5,3
POSITIVOS TOTALES	38/73	52,05	30/75	40

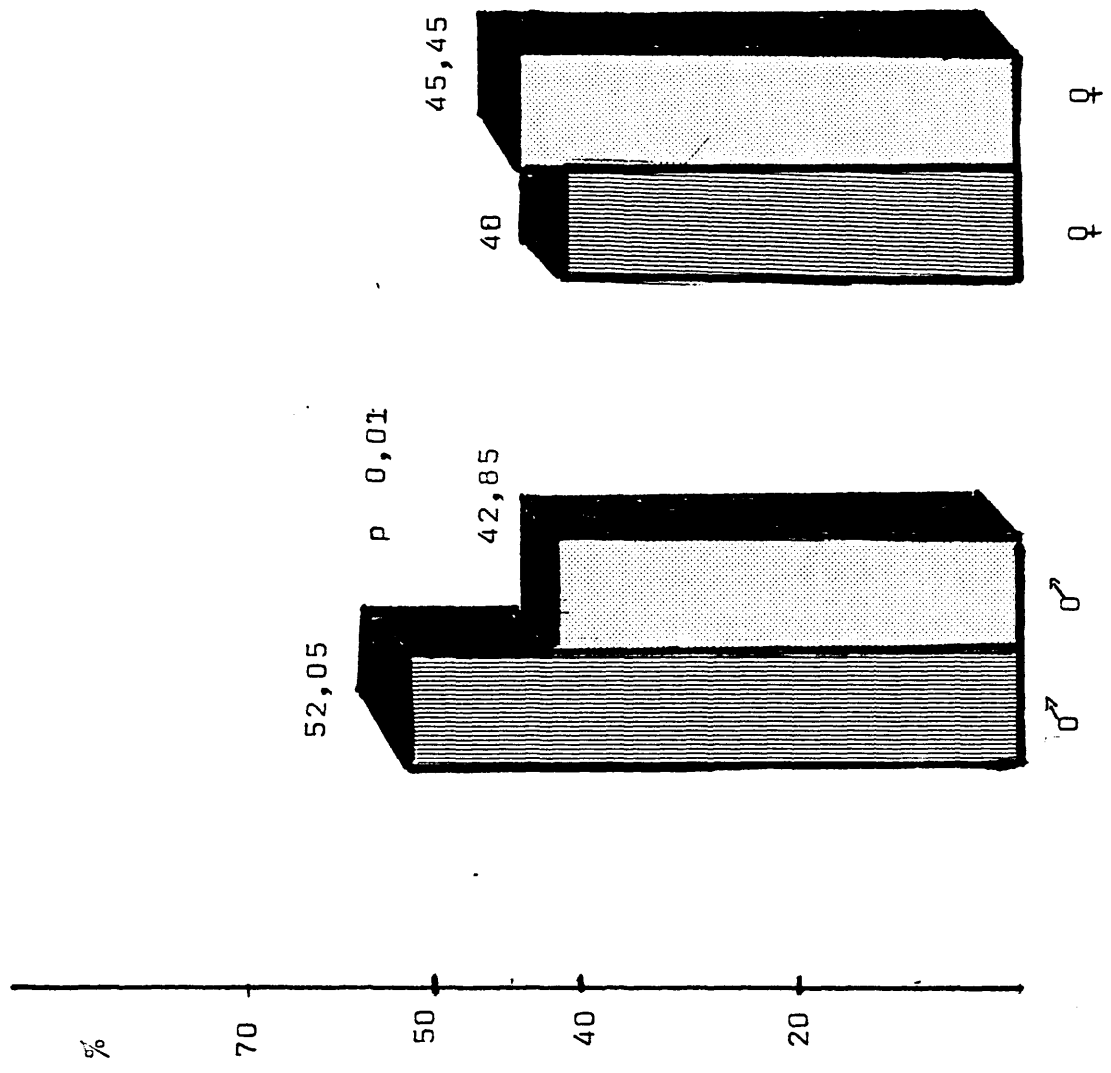
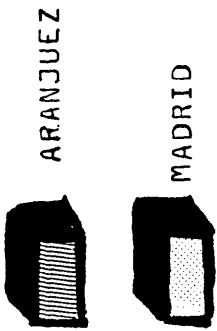
TABLA XIV: RESULTADOS DE LA POBLACION DE ARANJUEZ  
AGrupados por sexo.

<u>TITULOS</u>	<u>VARONES</u>		<u>MUJERES</u>	
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
POSITIVOS BAJOS	18/56	32,14	12/55	21,81
POSITIVOS MEDIOS	4/56	7,14	8/55	14,54
POSITIVOS ALTOS	2/56	3,57	5/55	9,1
POSITIVOS TOTALES	24/56	42,85	25/55	45,45

TABLA XV: RESULTADOS DE LA POBLACION DE MADRID CAPITAL  
AGRUPADOS POR SEXOS.



GRAFICA 9: RESULTADOS DE LA POBLACION DE ARANJUEZ Y MADRID AGRUPADOS POR SEXOS.



GRAFICA 10: COMPARACION DE PORCENTAJES DE ANTICUERPOS DE AMBAS POBLACIONES AGRUPADAS POR SEXO.

III. Estudio de C. psittaci y C. trachomatis en una población ( Madrid capital ).-

En las Tablas XVI y XVII y en la Gráfica 11 se recogen los resultados globales obtenidos al estudiar la prevalencia de anticuerpos frente a C. psittaci y C. trachomatis en la población de Madrid capital.

El porcentaje de individuos con anticuerpos --- frente a C. psittaci en la muestra de Madrid capital es - de 44,14%; para C. trachomatis se obtuvo un porcentaje de seropositividad de 34,2%, siendo la diferencia entre am-- bas estadísticamente significativa (  $p < 0,01$  )

La comparación de títulos medios y altos frente a ambas especies de Chlamydia presenta diferencias con -- significación estadística (  $p < 0,01$  )

En las tablas XVIII, XIX y XX y en las Gráficas 12, 13 y 14 se recogen los resultados al agrupar a la población por edades.

El estudio comparativo de anticuerpos frente a C. psittaci y C. trachomatis en la muestra de Madrid ---

agrupada por edades evidencia diferencias estadísticamente significativas (  $p < 0,01$  ) entre varios grupos de edad -- ( 31-40, 41-50 y mayores de 50 años ).

En la Tabla XXI se recogen los resultados obtenidos al contrastar la prevalencia de anticuerpos frente a C. psittaci y C. trachomatis.

Se observa en este estudio que un 21,62% de personas eran seropositivas a ambas especies de Chlamydia y un 12,51% lo fueron frente a C. trachomatis, pero no frente a C. psittaci.

También se determinó que el 22,52% de los individuos eran seropositivos frente a C. psittaci y seronegativos frente a C. trachomatis; un 43,24% eran seronegativos frente a ambas especies.

En la Tabla XXII y Gráfica 15 se recogen los obtenidos en el estudio de la población de Madrid frente a C. trachomatis.

El 28,57% de los varones eran seropositivos a C. trachomatis y el 40% de las mujeres lo eran para la misma especie, existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas .

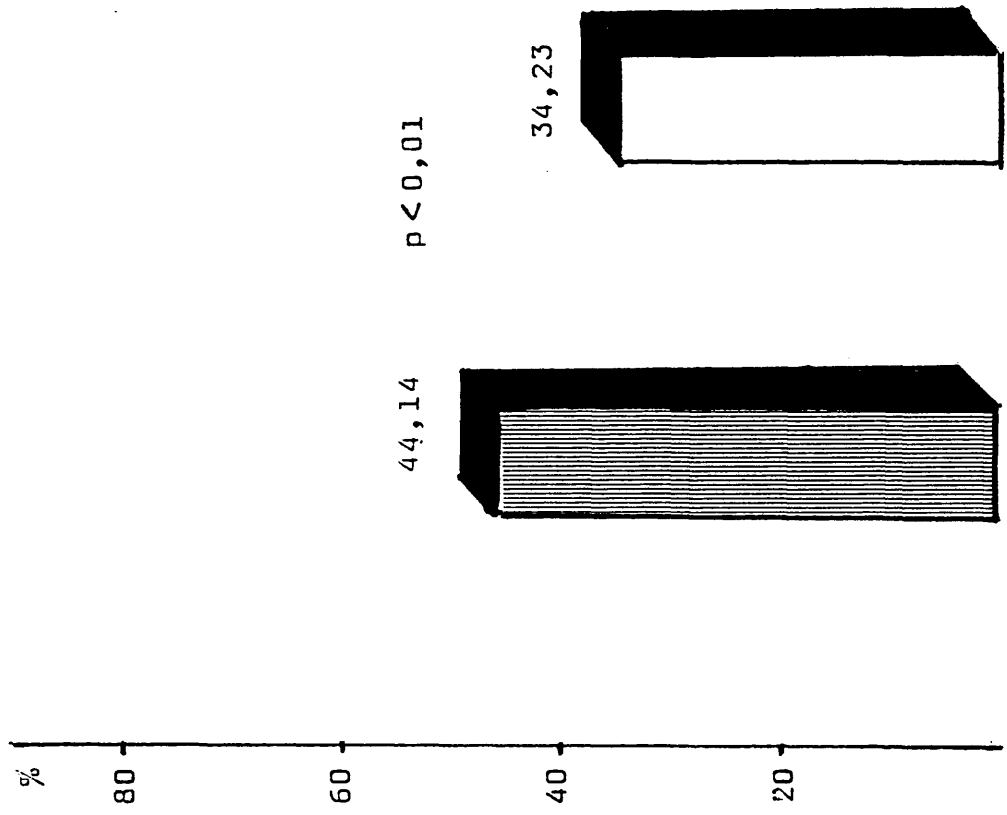
<u>TITULO</u>	<u>NUMERO</u>	<u>PORCENTAJE</u>
NEGATIVOS	62/111	55,85
POSITIVOS BAJOS	30/111	21,92
POSITIVOS MEDIOS	12/111	10,8
POSITIVOS ALTOS	7/111	63,3
POSITIVOS TOTALES	49/111	44,14

TABLA XVI: RESULTADOS GLOBALES OBTENIDOS EN LA POBLACION DE MADRID CAPITAL FRENTE A C. psittaci

<u>TITULO</u>	<u>NUMERO</u>	<u>PORCENTAJE</u>
NEGATIVOS	73/111	65,76
POSITIVOS BAJOS	37/111	33,33
POSITIVOS MEDIOS	1/111	0,90
POSITIVOS ALTOS	0	0
POSITIVOS TOTALES	38/111	34,23

TABLA XVII: RESULTADOS GLOBALES DE ANTICUERPOS OBTENIDOS  
EN LA POBLACION DE MADRID CAPITAL FRENTE A -  
C. trachomatis

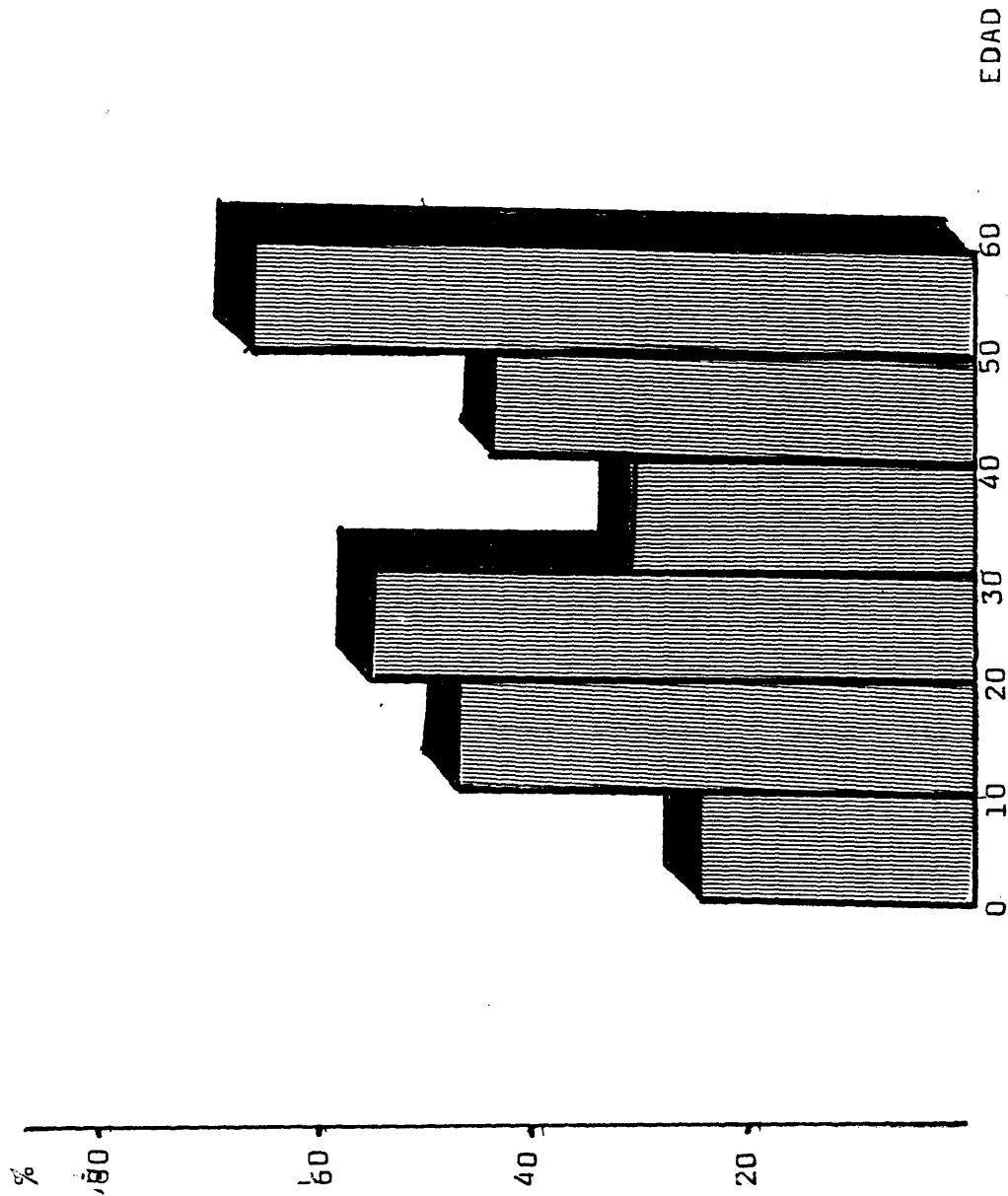
C. psitt  
C. tract



GRAFICA 11: PORCENTAJES DE ANTICUERPOS FRENTE A C.psittaci Y C. trachomatis:  
EN MADRID CAPITAL

<u>EDAD</u>	<u>POSITIVOS</u>	<u>PORCENTAJE</u>
0-10	5/20	25
11-20	12/25	48
21-30	12/22	54,54
31-40	17/22	31,81
41-50	4/9	44,4
50	9/3	69,23
TOTAL	49/111	44,14

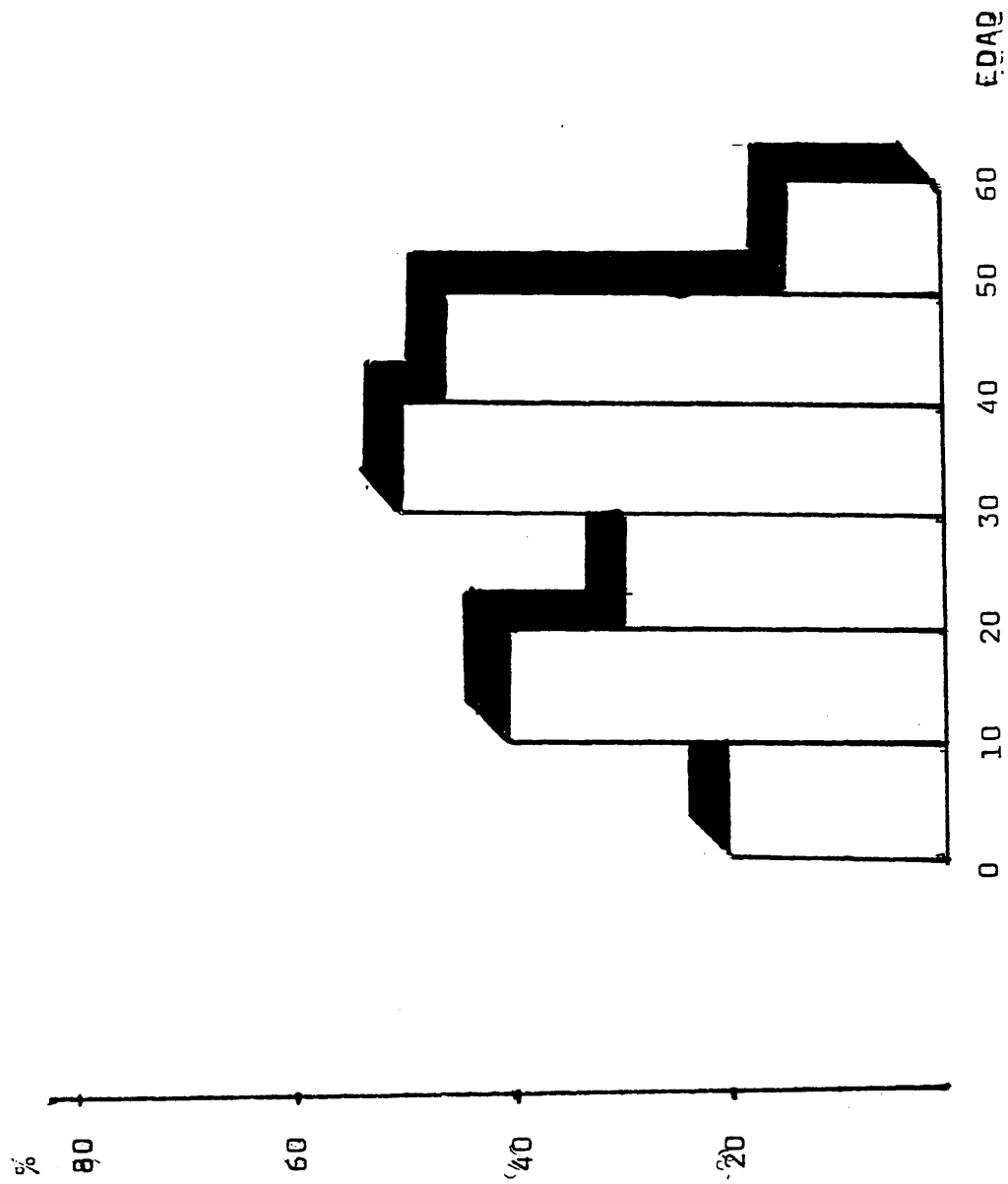
TABLA XVIII: PREVALENCIAS DE ANTICUERPOS EN LA POBLACION DE MADRID CAPITAL FRENTE A C. psittaci AGRUPADAS POR EDADES.



GRAFICA 12: PORCENTAJE DE ANTICUERPOS FRENTE A C. psittaci EN MADRID AGRUPA POR EDADES

<u>EDAD</u>	<u>POSITIVOS</u>	<u>PORCENTAJE</u>
0-10	4/20	20
11-20	10/25	40
21-30	7/22	31,8
31/40	11/22	50
41/50	4/9	44,4
50	2/13	15,38
TOTAL	38/111	34,23

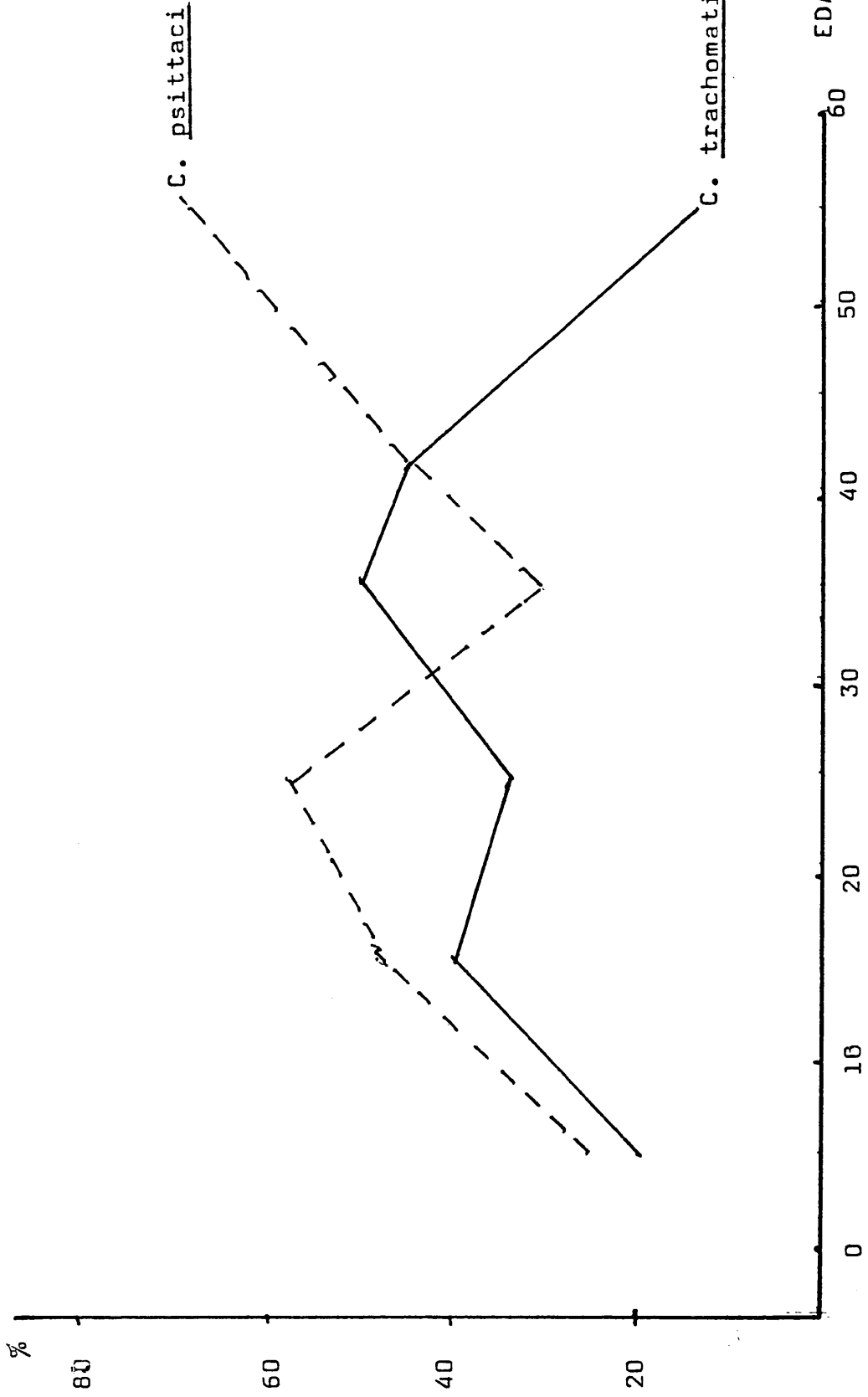
TABLA XIX: PREVALENCIAS DE ANTICUERPOS FRENTE A C. trachomatis EN LA POBLACION DE MADRID CAPITAL AGRUPADOS POR EDADES.



GRAFICA 13: PORCENTAJES DE ANTICUERPOS FRENTE A C. trachomatis EN MADRID AGRU-  
PADA POR EDADES.

EDAD	<u>NEGATIVOS</u>		<u>POSITIVOS</u>		<u>PORCENTAJE</u>	
	C. <u>ps.</u>	C. <u>tr.</u>	C. <u>ps.</u>	C. <u>tr.</u>	C. <u>ps.</u>	C. <u>tr.</u>
0-10	15/20	16/20	5/20	4/20	25	20
11-20	13/25	15/25	12/25	10/25	48	40
21-30	10/22	15/22	12/22	7/22	54,5	31,8
31-40	15/22	11/22	17/22	11/22	31,8	50
41-50	5/9	5/9	4/9	4/9	44,4	44,4
50	4/13	11/13	9/13	2/13	69,2	15,3
TOTAL	62/111	73/111	49/111	38/111	44,14	34,2

TABLA XX: COMPARACION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS FRENTE A AMBAS ESPECIES EN LA POBLACION DE MADRID CAPITAL AGRUPADOS POR EDADES



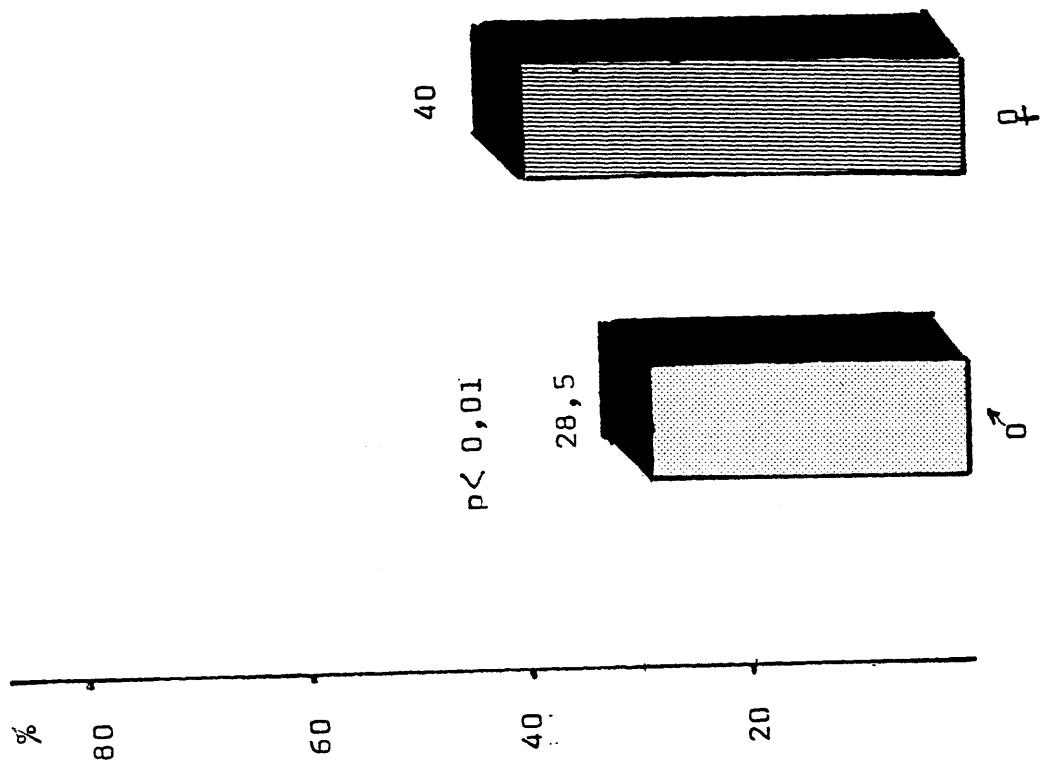
**GRAFICA 14: COMPARACION DE PORCENTAJES DE ANTICUERPOS FRENTE A AMBAS ESPECIES EN LA POBLACION DE MADRID AGRUPADA POR EDADES.**

	P <sup>+</sup> T <sup>-</sup>	P <sup>-</sup> T <sup>+</sup>	P <sup>+</sup> T <sup>+</sup>	P <sup>-</sup> T <sup>-</sup>
NUMERO	25/111	24/111	14/111	48/111
PORCENTAJE	22,52	21,62	12,51	43,24

TABLA XXI: RELACION DE RESULTADOS AGRUPADOS POR PRESENCIA (+)  
Y/O AUSENCIA (-) DE ANTICUERPOS FRENTE A C. psittaci  
(P) Y C. trachomatis (T).

<u>TITULO</u>	<u>VARONES</u>		<u>MUJERES</u>	
	<u>Nº</u>	<u>%</u>	<u>Nº</u>	<u>%</u>
POSITIVOS BAJOS	16/56	28,5	21/55	38,18
POSITIVOS MEDIOS	0	0	1/55	1,8
POSITIVOS ALTOS	0	0	0	0
TOTALES	16/56	28,5	22/55	40

TABLA XXII: PORCENTAJE DE ANTICUERPOS FRENTE A C. trachomatis EN LA POBLACION DE MADRID CAPITAL AGRUPADOS POR SEXO.



GRAFICA 15: PORCENTAJE DE ANTICUERPOS FRENTE A *C. tracomatis* EN MADRID AGRUPADA POR SEXO.

#### IV. Estudio de C. psittaci con respecto a otros microorganismos.-

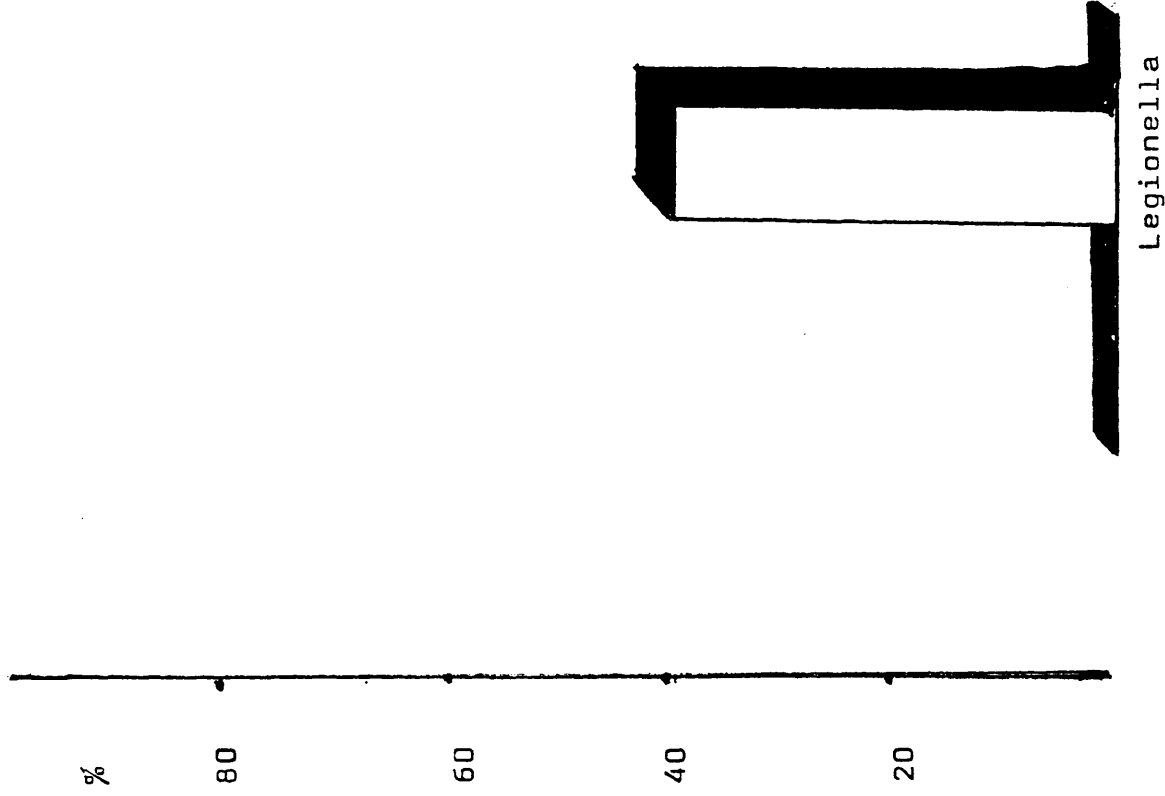
Se estudiaron 10 sueros que presentaban títulos altos de anticuerpos frente a L. pneumophyla, 8 con títulos altos frente a HIV, 5 frente a C. burnetii y 7 frente a M. pneumoniae. A estos sueros se les determinó el porcentaje de anticuerpos frente a C. psittaci, existiendo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los sueros de L. pneumophyla. Estos resultados se recogen en la Tabla XXIII y en la Gráfica 16.

#### V. Estudio en el ganado.-

De las 200 muestras estudiadas de ganado bovino y ovino para determinar la prevalencia de anticuerpos --- frente a C. psittaci, ninguno de los sueros presentó sero positividad frente a esta especie.

<u>MICROORGANISMO</u>	<u>NEGATIVOS</u>	<u>POSITIVOS</u>
HIV	8	0
M. <u>pneumoniae</u>	7	0
C. <u>burnetii</u>	5	0
L. <u>pneumophyla</u>	6	4

TABLA XXIII: PREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A C. psittaci  
EN RELACION CON OTROS MICROORGANISMOS.



Legionella

GRAFICA 16: PREVALENCIA DE ANTICUERPOS FRENTE A C. psittaci EN RELACION CON OTROS MICROORGANISMOS.

D I S C U S I O N

## DISCUSION

### I. Comparación de técnicas

A la vista de los resultados obtenidos se observa que la tasa global de anticuerpos frente a C. psittaci, detectados mediante los dos antígenos de FC ( obtenidos, uno de huevo embrionado y otro de cultivo celular ) y el antígeno de IFI ( procedente de cultivo en huevo embrionado ) son muy similares, no existiendo diferencia estadísticamente significativa.

Al considerar sólo los títulos positivos que --capta cada uno de los antígenos y separarlos en títulos -bajos, medios y altos, pueden observarse las diferencias existentes entre ellos.

Con el antígeno procedente de cultivo celular - ( P2 ) el porcentaje correspondiente a los títulos bajos es mayor que con el antígeno obtenido en cultivo de embrión de pollo ( P1 ), no existiendo diferencias estadísticamente significativas. El antígeno de IFI también determinó un porcentaje similar al que se obtiene con el P2.

La tasa de títulos medios es mucho mayor cuando

la detección de anticuerpos frente a C. psittaci se realiza con el antígeno de fijación de complemento obtenido de embrión de pollo ( P1 ), existiendo una diferencia notable con lo detectado con los otros dos antígenos.

Es de señalar que el antígeno que detecta menos títulos medios es el empleado en la técnica de IFI y sin embargo detecta títulos altos que no son captados por los antígenos de FC.

De los 10 títulos altos detectados por IFI, dos fueron seropositivos a una dilución de 1/1.024. Uno de ellos presentaba por FC seropositividad a 1/128. Los dos sueros con título de 1/1.024 correspondían a varones de 31 y 34 años de edad.

A la vista de los resultados anteriores, puede deducirse que la IFI es más sensible para captar títulos altos que la FC.

Con respecto a las técnicas utilizadas, los datos obtenidos coinciden con los de otros autores ( Wang, Schachter y Orfila ) que consideran que la FC capta anticuerpos frente a antígenos de género o grupo, mientras -- que la IFI detecta también anticuerpos específicos que no se ponen de manifiesto con la técnica de FC.

Esto podría explicar el hecho de que, al considerar sólo los títulos positivos, corresponde a la FC la mayor proporción de títulos bajos por detectar sólo los anticuerpos de género, mientras que la IFI capta más títulos altos debido a que detecta además la presencia de anticuerpos específicos.

Al comparar los títulos obtenidos en cada individuo mediante los tres antígenos, se aprecia un mayor número de discordancias entre los resultados observados para el antígeno P1 de FC y el antígeno de IFI. Estas diferencias son menores cuando se comparan los antígenos de IFI y P2 de FC.

También existe discordancia entre los datos obtenidos con los antígenos P1 y P2 de FC. Así, en 6 de los casos se observa que el título de anticuerpos obtenido con el P1 es de 1/8 mientras que presentan un título de 1/32 cuando se utiliza el P2.

En la bibliografía revisada no hemos encontrado ningún trabajo que utilice la técnica de IFI para la determinación clínica de infecciones por *C. psittaci*, sin embargo dicha técnica sí se emplea para la determinación de anticuerpos frente a *C. trachomatis* ( Freeman, 1986, Orfila, 1986 ).

Por lo tanto, a la vista de los resultados, podemos concluir que la IFI, al ser mucho más sensible para la detección de títulos altos, debería utilizarse mucho más como técnica de laboratorio para determinar enfermedades producidas por C. psittaci.

Además, dicha técnica presenta una serie de ventajas:

- Permite detectar antígenos mientras están todavía en la célula, necesitándose pocas células.
- Identificación específica en pocas horas.
- Tras la fijación las muestras son estables y pueden enviarse sin limitación de tiempo.
- Se pueden visualizar antígenos solubles, proteínas, y el lugar donde están localizados.

Algunos autores ( Ausina, Berenguer, 1985 ) consideran título alto indicativo de infección activa una dilución mayor o igual a 1/32 por FC, mientras que otros -- ( Schachter, 1978 ) consideran que corresponden a una dilución mayor o igual a 1/64. Esto se basa en la tasa de anticuerpos que presenta la población sana, correspondiendo cada uno de ellos a zonas geográficas distintas.

La relación en este trabajo de títulos altos -- ( mayores de 1/64 ) de IFI a FC es de 10 a 1. Si el título alto se considera como indicativo de posible infección activa, sería preciso hacer una revisión sobre qué título

de anticuerpos debería ser considerado como alto para cada técnica.

Para ello, sería preciso hacer un estudio epidemiológico de la incidencia de la psitacosis en nuestro medio, y hacer una equivalencia entre porcentaje de infecciones activas ( individuos que padecen la enfermedad ) y porcentaje de títulos altos detectado por IFI y FC; la dilución a partir de la cual coincide el porcentaje con la incidencia, nos indicará que dilución se considera título alto.

## II. Estudio de las poblaciones de Madrid y Aranjuez

El porcentaje de anticuerpos obtenido en la población de Aranjuez frente a C. psittaci es de un 45,95 % y en la muestra de Madrid capital es de 44,14 %, no existiendo diferencia estadísticamente significativa entre ambas poblaciones.

Se pueden comparar estos resultados con los obtenidos por Ausina y cols. en 1985, en la población urbana de Barcelona. En este estudio se utiliza la técnica de FC y la tasa de sueros positivos fue del 8,4 %. Estos resultados estarían dentro del intervalo que preconiza García-Casasola ( 1986 ) de 0,3 al 18,5 % de individuos po-

sitivos en la población sana.

En el presente trabajo, para determinar el porcentaje de anticuerpos frente a *C. psittaci* se emplean las técnicas de IFI y FC en la población de Aranjuez, y la -- IFI en la muestra de Madrid capital, obteniéndose una tasa de individuos seropositivos muy similar en ambas poblaciones cuya media es de 45,17 %; sin embargo, los datos - observados en ambas poblaciones distan mucho de los resultados publicados por Ausina que señala una prevalencia de 8,4 %.

Si bien en la bibliografía revisada no se han - encontrado, excepto en los de Ausina, estudios realizados sobre la prevalencia de anticuerpos en población sana, -- creemos que la prevalencia de anticuerpos es mucho más allta en población sana de lo que se pensó en un principio.

Así mismo, se ha observado que el 3,9 % de las neumonías de adquisición extrahospitalaria son producidas por *C. psittaci* cuando en 1978 Schachter comunicó la cifra de 1,2 % de neumonías producidas por esta bacteria.

Según Berenguer ( 1985 ), la psitacosis es un - problema más frecuente de lo esperado en nuestro medio, y se debe tener en cuenta en el diagnóstico diferencial de neumonías, síndromes febriles febriles, pericarditis, mio

carditis, etc., y diversos procesos de etiología oscura.

El porcentaje de individuos con anticuerpos --- frente a C. psittaci en población sana en este trabajo es muy superior al esperado, aunque también las infecciones por esta bacteria son más frecuentes en nuestro medio que en otros países como Inglaterra y Estados Unidos, donde - está reglamentado el control sanitario de pájaros y de otras aves importadas, es lógico pensar que la prevalencia de anticuerpos en población no patológica sea superior a la esperada.

Además se están barajando otras posibilidades - de infección por C. psittaci de origen no aviar. La infección por C. psittaci de origen bovino y ovino es conocida desde hace mucho tiempo, y aunque las cepas de esta procedencia están consideradas como de baja actividad para el hombre, se han descrito infecciones humanas de este origen ( MacFarlane, 1983 ) incluyendo meningitis, endocarditis, conjuntivitis,... Por otro lado, está demostrada la posibilidad de transmisión interhumana y, aunque su incidencia se desconoce, parece que esta forma de contagio está muy extendida.

Todo esto unido a que la psitacosis puede cur-- sar como un simple resfriado llevaría a explicar el por-- centaje de individuos seropositivos a C. psittaci en este trabajo.

En ambas poblaciones, Madrid y Aranjuez, cuando se realiza el estudio por edades podemos observar que se produce un aumento en la tasa de anticuerpos hasta alcanzar la edad de 30-40 años, donde existe un descenso considerable, siendo en esta edad el porcentaje de 36,36 %. A partir de los 41 años se aprecia un nuevo ascenso presentando el mayor porcentaje en los individuos mayores de 50 años.

En la bibliografía revisada no hemos encontrado ningún estudio similar aunque se ha observado que los individuos que presentaban mayor número de infecciones por -- C. psittaci tenían una edad media de 50 años.

En el estudio estadístico realizado para ver la correlación entre el porcentaje de individuos seropositivos y la edad, se comprobó, que si bien esta aumenta con la edad, no existe una relación directa (  $r = 0,8$  NS ). No se encontró ninguna razón lógica para explicar el descenso que se produce entre los 30 y 40 años, es posible -- que estudios posteriores puedan aclararlo.

En la población de Madrid capital se ha observado que el porcentaje de anticuerpos frente a C. psittaci

presentes en varones y mujeres es muy similar no existiendo entre ellos diferencias estadísticamente significativas. Esto coincide con otros autores que han visto que la psittacosis afecta tanto a varones como a mujeres.

Por el contrario, en la población de Aranjuez - el porcentaje de varones que presentan anticuerpos frente a C. psittaci es mayor ( 52,05 ) que en mujeres , cuyo porcentaje es del 40 %. Se puede apuntar que el mayor porcentaje de anticuerpos presente en los varones de Aranjuez se debe a la existencia en las proximidades de algunas granjas avícolas; esto junto con el hecho de que los varones que presentan una mayor prevalencia de anticuerpos corresponden a edades comprendidas entre los 30 y 40 años, edad laboral, podría explicar este mayor porcentaje.

La comparación entre mujeres de ambas poblaciones no muestra diferencias estadísticamente significativas, mientras que entre los varones sí se pone de manifiesto esta diferencia.

### III. Comparación entre C. psittaci y C. trachomatis

En la población de Madrid capital se llevó a cabo la determinación de anticuerpos frente a C. psittaci

y C. trachomatis presentando unos porcentajes de 44,14 % y de 34,23 % respectivamente.

Al realizar el estudio agrupados por edades se puede observar que la prevalencia de anticuerpos frente a C. trachomatis presentaba un aumento considerable en aquellas edades en que la prevalencia de anticuerpos frente a C. psittaci disminuye. Este aumento de anticuerpos frente a C. trachomatis coincide con edades en que la actividad sexual es mayor ( 20-40 años ), produciéndose un descenso progresivo a partir de los 40 años.

Al diferenciar la población en varones y mujeres se observa que el 40% de las mujeres eran seropositivas a C. trachomatis y sólo el 28,5% de los varones presentaba anticuerpos frente a dicha especie, siendo dicha diferencia estadísticamente significativa.

En IFI se considera que títulos mayores o iguales a 1/16 en varones correspondería a clamidiosis inicial y títulos mayores o iguales a 1/64 serían indicativos de ella en mujeres. Si esto es así, todos los varones que -- son seropositivos a C. trachomatis ( 28,5% ) estarían en este caso, pues sus títulos son, o bien de 1/16, o bien de 1/32. Por el contrario, sólo una mujer presentó un título alto ( 1/64 ) a C. trachomatis.

Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos frente a C. trachomatis y C. psittaci, observamos que el 22,52% de los individuos sólo son seropositivos a C. psittaci, y el 12,51% lo son a C. trachomatis. Por otra parte, el 21,62% son positivos a C. psittaci y C. trachomatis, lo que nos llevó a considerar el caso de las reacciones cruzadas.

C. trachomatis y C. psittaci presentan un antígeno común de género que es termoestable y no permite diferenciar ambas especies. Los antígenos utilizados para la determinación de C. psittaci y C. trachomatis son de grupo y especie, por lo tanto, mediante la técnica de IFI se van a detectar anticuerpos frente a antígenos de grupo y antígenos de especie.

Considerando esto último, actualmente no es posible distinguir, en los sueros que dan reacciones positivas con los dos antígenos, las que son reacciones cruzadas de las que son realmente positivas para ambas especies.

La explicación para los sueros que son positivos frente a una sola especie puede ser diversa:

- 1.- Durante el proceso de fijación del antígeno al porta, pueden haberse inactivado los antígenos de grupo en algunos pocillos, reaccionando únicamente los antígenos de especie, de modo que sólo se detectarían los anticuerpos frente a estos últimos.
  
- 2.- La relación Anticuerpos de grupo/Anticuerpos de especie es pequeña, y la cantidad de anticuerpos de grupo es insuficiente para dar reacción positiva frente a una de las especies, siendolo para la otra especie. Es to sería aplicable para los títulos bajos, pero no para los títulos altos, porque es de suponer que en estos casos sí habrían su ficientes anticuerpos de grupo.
  
- 3.- En estos sueros no hay anticuerpos frente a antígenos de grupo, lo cual puede deberse a dos causas:
  - a. Los anticuerpos frente a antígeno de especie son más perdurables que los anticuerpos frente a los antígenos de grupo,

Esto podría deberse a la existencia de reacciones cruzadas, pues los títulos de anticuerpos observados frente a C. psittaci fueron de 1/16 y, además, estos sueros procedían de individuos que no presentaban diagnóstico de certeza de psitacosis.

#### V. Estudio en el ganado.

La infección por C. psittaci de origen bovino y ovino es conocida desde hace muchos años y, aunque las cepas de esta procedencia están consideradas como de baja infectividad para el hombre, se pensó que dichos animales podían constituir una vía de transmisión de la psitacosis para las personas empleadas en mataderos. Sin embargo, al determinar la tasa de anticuerpos frente a C. psittaci en corderos y vacas se observó que, tanto unos como otros -- eran negativos.

Se esperaba que alguno de los sueros fuera positivo frente a C. psittaci, pues en nuestro laboratorio se han determinado anticuerpos en animales frente a otros microorganismos como C. burnetii, obteniéndose una elevada tasa de seropositividad. Es posible que la extensión de la muestra fuera insuficiente, por lo que el estudio debería continuarse aumentando ésta o bien, recogiendo -- sangre de animales de distinta procedencia.

habiendose extraido estos sueros una vez pasada la infección.

- b. Se sabe que los anticuerpos frente a antígenos de especie aparecen antes que -- los anticuerpos frente a antígenos de -- grupo, por lo que es posible que los sueros hayan sido extraidos en esta fase y sería indicativo de infección activa.

• Para aclarar estas hipótesis es preciso hacer - determinaciones de anticuerpos frente a antígenos de gé- nero y frente a antígenos de especie. Actualmente no existen antígenos específicos de especie comercializados para realizar estos análisis, por lo que estos estudios debe-- rán llevarse a cabo en un futuro próximo,

#### IV. Estudio de C. psittaci con respecto a otros microorganismos

En los sueros que presentaban títulos altos de anticuerpos frente a M. pneumoniae, L. pneumophyla, C. burnetii y HIV, sólo se detectaron positividades a C. psittaci en aquellos que presentaban anticuerpos frente a --- L. pneumophyla.

C O N C L U S I O N E S

## CONCLUSIONES

- 1.- El antígeno de FC, obtenido a partir de huevo embrionado ( P1 ), capta mayor número de títulos bajos.
- 2.- El antígeno de IFI capta mayor número de títulos altos.
- 3.- La técnica de Fijación del Complemento sólo detecta anticuerpos frente a antígenos de género.
- 4.- La técnica de Inmunofluorescencia Indirecta capta adémás anticuerpos frente a antígenos de especie.
- 5.- La técnica de IFI es mucho más sensible que la FC.
- 6.- El mayor índice de sensibilidad del antígeno de Inmunofluorescencia se obtiene respecto al antígeno de FC obtenido de cultivo celular.
- 7.- El porcentaje de individuos con anticuerpos frente a C. psittaci en las poblaciones estudiadas ( Aranjuez y Madrid ), es de 45,17% .
- 8.- La prevalencia de anticuerpos frente a C. psittaci es muy similar en varones y mujeres.

- 9.- El porcentaje de anticuerpos frente a C. psittaci no está en relación directa con la edad.
- 10.- La prevalencia de anticuerpos frente a C. trachomatis en Madrid capital es de 34,23% .
- 11.- El mayor porcentaje de anticuerpos frente a C. tra - chomatis se observa en mujeres.
- 12.- Se producen reacciones cruzadas entre C. psittaci y C. trachomatis.
- 13.- En el ganado no se detectó anticuerpos frente a C. psittaci.
- 14.- C. psittaci sólo presentó reacciones cruzadas con --  
L. pneumophyla



B I B L I O G R A F I A

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allan L, Pearce JM. - Differential amino acid utilization by *Chlamydia psittaci* and its regulatory effect on Chlamydial growth.- J. Gen. Microbiol., 129: 1991-1999. 1983.
- 2.- Allan L, Pearce JM. - Amino acid requirements of strains of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* growing in McCoy cells: relationship clinical syndrome and host origin.- J. Gen. Microbiol., 129: 2001-2007. 1983.
- 3.- Andrews B, Palmer S. - Ornithosis in poultry workers.- Lancet, 1: 632-634. 1981.
- 4.- Ausina V, Sambeat MA, Prats G et al. - Infecciones de pulmónes por *Chlamydia psittaci*. Estudio clínico y epidemiológico de 31 casos esporádicos asistidos en un hospital general.- Med. Clin., 85: 396-399. 1985.
- 5.- Bath JC, Bøissard GP, Calder MA, et al. - Psittacosis.- Br. J. Dis. Chest., 58: 1-16. 1964.
- 6.- Beer. R, Bradford W, Hart R, et al. - Pregnancy complicated by psittacosis acquired from sheep.- Br. Med. Clin., 284: 391-395. 1982.

- 7.- Berenguer J, Gonzalez R, Bouza E, et al. - Psittacosis experiencia en un hospital general.- Med. Clin. 85: 391-395. 1985.
- 8.- Bevan BJ. - Laboratory transfer, of a virus between isolates of Chlamydis psittaci .- Vet. Rec., 2: 112-180. 1983.
- 9.- Broholm K, Bottiguer M, Jernelius H, et al. - Ornithosis as a nosocomial infection.- Scand. J. Infect. Dis., 9: 263-267. 1977.
- 10.- Byone L, Gordon FB, Harper IA, et al. - Detection of Chlamydia ( Bedsonia ) in certain infections of man.- J. Infect. Dis., 120: 222-229. 1968.
- 11.- Byrne GI,. - Requirements for ingestion of Chlamydia psittaci by mouse fibroblasts ( L cells ).- Infect. and Immunit., 3: 645-651. 1974.
- 12.- Byrne GI. - Parasite-specified phagocytosis of Chlamydia psittaci and Chlamydia trachomatis by L and HeLa-cell.- Infect. and Immunit., 19: 2258-2267. 1978.
- 13.- Byrom NP, Wallas J, Mair HJ. - Fulminant psittacosis.- Lancet, 1: 363:366. 1979.

- 14.- Catalan F, Khoury B, Doulé D, et al. - Evaluation d'une technique immunoenzymatique pour la recherche des anticorps anti-chlamydiens sériques.- Rev. Intern. du Trachoma., 1: 333-335. 1984.
- 15.- Collier LH. - Psittacosis.- Br. Med. Bull., 15: 141-147. 1964.
- 16.- Cornog JL, Hanson CW. - Chlamydial infection and arthritis.- Br. Med. Bull., 98: 1133-1136. 1968.
- 17.- Crofton JW, Fawcett JW, James D, et al. - Detection of Chlamydiae by isolation and direct examination.- Br. Med. J., 2: 1368-1374. 1974.
- 18.- Chasey D, Davies P, Dawson M. - Detection of Chlamydiae.- Br. Vet. J., 137: 634-638. 1981.
- 19.- Chonock R, et al. - Psittacosis.- Bull. World. Health. Organ., 37: 363-369. 1967.
- 20.- Darougar S. - Chlamydial disease.- Br. Med. Bull., 39: 107-207. 1983.
- 21.- Dourmon E, Sirinelli A, Bastin R. - Manifestations neurologiques de l'ornithose.- Sem. Hôp. Paris., 59: 1763-1765. 1983.

- 21.- Dynock I, Lawson JM, Ross AC. - Myocarditis associated with psittacosis.- Br. J. of Clin. Pract., 25:240-242. 1977.
- 22.- Editorial. - Psittacosis of non-avian origin.- Lancet 2: 442-443.
- 23.- Emmons RW, Teneberg DJ, Schachter J. - Fatal pulmonary psittacosis and aspergillosis. Case report of dual infection.- Arch. Intern. Med., 140: 697-698. 1980.
- 24.- Farmer H, Chalmers WS, Woolcock PR. - Trachoma.- Vet Rec., 110: 97-107. 1982.
- 25.- File TA, Tan JS. - Concurrent antibody rises to C. psittaci and L. pneumophila in a patient with psittacosis.- Chest., 81: 393-394. 1982.
- 26.- Freedman SD, - Psittacosis.- En: Braude AL. ed. Medical Microbiology and Infectious Diseases. Philadelphia, WB Saunders Co., 929-932. 1981.
- 27.- Freedman SD. - Chlamydia.- En: Textbook of Microbiology. ed. Medical Microbiology and Infectious Diseases Philadelphia. WB. Saunders Co., 998-1010. 1985.

- 28.- Friis RR. - Interaction of L cells and Chlamydia psittaci : entry of the parasite and host responses to its development.- J. of Bacteriol., 2: 706-721. - 1972.
- 29.- García-Casasola G, Cour MI, Espinos D, et al. - Infección pulmonar por Chlamydia psittaci y Streptococcus pneumoniae en un enfermo respiratorio crónico.- En prensa. 1986.
- 30.- García San Miguel J. - Infecciones por Chlamydia.- En: Farreras Valentí P. Medicina Interna. ed Marín - SA. Barcelona. 1982.
- 31.- Grayston JT, Altman J. - A new Chlamydia psittaci -- strain, TWAR isolate in acute respiratory-trac infections.- N. Engl. J. Med., 315: 161-167. 1986.
- 32.- Hatch TP. - Host-free activities of Chlamydia.- En: Chlamydial infections . Holmes JD. Elsevier Biomedical Press. NY. 25-28. 1982
- 33.- Hatch TP, Allan L, Pearce JH. - Structural and polypeptide differences between envelopes of infective - and reproductive life cycle forms Chlamydia spp.- J. Bacteriol., 146: 426-429. 1984.

- 34.- Isaacs D. - Psittacosis.- Br. Med. J., 289: 510-511.  
1984.
- 35.- Izquierdo del Amo A, Ferrer D, Otero LA, et al. - Psittacosis: comentarios clínico-epidemiológicos a propósito de tres casos ocurridos en una familia.- Arch. Bronconeumol., 19:132-135. 1983.
- 36.- Kalling I, Nyström C, Forsgren A et al.- Serologic differentiation of legionnaires' disease and psittacosis.- J. Infect. Dis. 2: 114-118. 1981.
- 37.- Kellogg KR, Horoschak KD, Moulder JW. - Toxicity of low and moderate multiplicities of Chlamydia psittaci for mouse fibroblasts ( L cells ).- Infect. Immun., 2:531-541. 1978.
- 38.- Knight V. - Psittacosis.- En: Petersdorf RG, Adams R Martín JB. ed Harrison's . Principles of Internal Medicine. 10th. edition. NY., 998-1016. 1983.
- 39.- Lammert JK. - Immune responses and chlamydial infections.- Infect. Immun., 35: 1011-1017. 1983
- 40.- Lammert JK, Wyrick PB, - Chlamydial serology.- Infect Immun., 35: 557-565. 1983.

- 41.- Leroyer C, Guillerm D, Cliver J, et al. - Pneumopathies atypiques de l'ornithosis-psittacose.- Sem. Hôp Paris., 61: 2447-2450. 1985.
- 42.- Levi HJ, Moulder JW. - Attachment of cell walls of - Chlamydia psittaci to mouse fibroblasts (L cells).- Infect. Immun., 37: 214-216. 1982.
- 43.- Lewis VJ, Thacker WL, Mitchell JH. - Demonstration - of Chlamydial endotoxin-like activity.- J. Gen. Microbiol., 114: 214-216. 1979.
- 44.- MacFarlane JT, Finch RG, Ward MJ, et al. - Hospital study of adult community-acquired pneumonia.- Lancet, 2: 255-258, 1982. 1982.
- 45.- MacFarlane JT, Macrae AD. - Psittacosis.- Br. Med. - Bull., 39: 163-167. 1983.
- 46.- MacFarlane JT, Miller A, Morris A, et al. - Comparative radiographic features of community acquired legionnaires' diseases, pneumococcal, mycoplasma, and psittacosis.- Thorax,,39: 28-33. 1984

- 47.- Mair J, Marril L. - Psitacosis.- Br. Med. Bull., 55:  
419-428. 1981.
- 48.- Manigand G, Taillandier J, Faux N, et al. - Elevation  
du taux de créatine-phosphate au cours de l'ornitho-  
se-psittacose.- Nouv. Press. Med., 10: 2442-2443. 1981
- 49.- Montejo M, Alvarez A, Alberola L. - Infección por -  
Chlamydia psittaci : Cinco casos nuevos.- Arch. bron  
coneumol., 19:173-176. 1983.
- 50.- Montejo M, Lizarra M, Sobradillo V et al. - Psitaco-  
sis. Estudio de dos casos ocurridos en una familia.-  
Rev. Clin. Esp., 175: 173-174. 1984.
- 51.- Morgan HR;,- Latent viral infections of cells in tu-  
ssue culture. I. Studies on latent infections of --  
chick embryo-tissues with psittacosis virus.- J. Exp  
Med., 103: 37-39. 1965.
- 52.- Moulder JW. - Looking at Chlamydiae Without looking  
at their hosts.- ASM. News., 50: 353-362. 1984.
- 53.- Moulder JW. - Orden II. Chlamydiales.- En: Krieg Hol  
JB. ed Bergey'S manual of systematic bacterology. Bal  
timore. Williams & Wilkins. CO. 729-739. 1984.

- 54.- Murray ES, Charbonnet L, Barron A. - Immune responses and chlamydial infections.- Br. Med: Bull.,110: 897-912. 1980.
- 55.- Nagington J. - Psittacosis/ornithosis in Cambridgeshire, 1975-1983.- J. Hyg., 92: 9-19. 1984.
- 56.- Orfila J, Haider F, Corbel C. - Intérêt et limites de la microméthode en immunofluorescence dans le diagnostic des infections respiratoires à Chlamydia trachomatis du nourisson.- Rev. Pédiatrie., 2: 75-84. 1981.
- 57.- Orfila J, Eb F. - Serodiagnosis in Chlamydial respiratory infections of the newborn.- Isr. J. Med. Sci. 19: 940-942. 1983.
- 58.- Orfila J. - Fiabilité des différentes méthodes de diagnostic des infections à Chlamydia.- Med. Mal. Infect., 13: 581- 586. 1983.
- 59.- Page LA. - Proposal for the recognition of two species in the genus Chlamydia Jones, Rake and Stearns 1945.- Int. J. Syst. Bacteriol., 21: 332-334. 1971.

- 60.- Page LA, Cutlip RC. - Morphological and immunological confirmation of presence of chlamydiae in the gut tissues of the Chesapeake Bay clam *Mercenaria mercenaria* .- *Curr. Microbiol.*, 7: 279- 299. 1982.
- 61.- Palmer SR. . - Psittacosis in man-recent development in the UK: a review.- *JR. Soc. Med.*, 75:262-267. 1982.
- 62.- Pether JVS, Noad ND, Lau YK, et al, - An outbreak of psittacosis in a boy's boarding school.- *J. Hyg.*, 92 337-343. 1984.
- 63.- Pother ME, Kaufmann AF, Beran B. - Psittacosis in human in the United States,,1975-1977.- *J. Infect. Dis* 140: 131-134. 1979.
- 64.- Pumarola A, Gatell JM, Beltran M et al. - Psitacosis Características clínicas y radiológicas de una serie de 13 casos.- *Med. Clin.*, 80: 345-348.1983.
- 65.- Regan RG, Dathan JR, Treharne JD, et al. - Infective endocarditis with glomerulonephritis associated with *Chlamydia psittaci* infection.- *Br. Heart J.*, 42: 349-352. 1979.

- 66.- Regnier B, Vachon F. - Pneumopathies graves á Chlamydia psittaci.- Ann. Med. Intren., 133: 178-181. 1982
- 67.- Reis J, Levi F, Kapfer F, et al. - Forme confusionnelle d'une encéphalite á Chlamydia psittaci .- Press. Med., 14: 87-89. 1985.
- 68.- Richmond SJ, Stirling P, Ashley CR, et al. - Virus  $\pm$  infecting the reticulate bodies of an aviar strain of Chlamydia psittaci.- FEMS. Microbiol. Lett., 14: 31-36. 1982.
- 69.- Saikku P. - An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of Chlamydia psittaci.- J. Infect. Dis 1985: 832: 151-157. 1985.
- 70.- Schachter J, Dawson CR. - Human Chlamydial infections.- Engl, J. Med., 298: 428-436. 1978.
- 71.- Schachter J. - Chlamydial infections I.- N. Engl. J. Med., 298: 428-435. 1978
- 72.- Schachater J. - Chlamydial infections II.- N. Engl. J. Med., 298: 490-495. 1978

- 73.- Schachter J. - Chlamydial infections III.- N. Engl. J. Med., 298: 540-549. 1978.
- 74.- Schachter J. - Chlamydia psittaci, "reemergece" of a forgotten pathogen.- N. Engl. J. Med., 315: 189-190. 1986.
- 75.- Schaffner W, Drutz DJ, Duncan GW, et al. -The clinical spectrum of endemic psittacosis.- Arch. Intern. Med., 119: 433-343. 1967.
- 76.- Schaffner W. - Psittacosis (ornithosis, parrot fever) En: Wyngaarden JB, Smith JH, ed Cecil Textbook. 17th. Philadelphia. WB Saunders Co. 1671-1672. 1985.
- 77.- Stenström R. - Psittacosis.- Br. Med. Bull., 171: 434-454. 1970
- 78.- Solans P, Linares J, Ariza J, et al. - Neumonia aguda de adquisición extrahospitalaria. Distribución etiológica de 415 casos.- Rev. Clin. Esp., 148: 367--371. 1980.
- 79.- Soriano E, Beltran M, Miro JM, et al. - Infecciones por Chlamydia psittaci.- Med. Clin., 75: 282-283. 1981

- 80.- Tamura A. - Electron microscopic observation on the structure of envelopes of mature elementary bodies - and developmental reticulate forms of Chlamydia psittaci.- J. Bacteriol., 105: 355-360. 1977
- 81.- Thomas J, Altman J. - A new Chlamydia psittaci strain TWAR, Isolate in acute respiratory tract infections.- N. Engl. J. Med., 315: 161-167. 1986.
- 82.- Treharne JD, Forsey JD. - Chlamydial serology.- Br. Med. Bull., 39: 194-202. 1984.
- 83.- Wang SP, Greyston JT, Kuo CC, et al . - Chlamydial - serology.- J. Clin. Microbiol., 1: 250-255.
- 84.- Ward C, Cooper D, Ward AM, et al. - Intractable endocarditis caused by Chlamydia psittaci.- Br. Med. Bull 4: 743-753. 1975.
- 85.- Ward C, Ward AM. - Acquired valvular heart diseases in patients who keep birds.- Lancet., 2: 743-745. 1974
- 86.- Ward AM. - Chlamydial classification development and structure.- Br. Med. Bull., 39: 109-115. 1983.

- 87.- Weiss E, Wilson NN, - Role of exogenous adenosine triphosphate in catabolic and synthetic activities of - Chlamydia psittaci.- J. Bacteriol., 97: 719-724. 1970
- 88.- White HJ, Rang RG, Soloff BL, et al. - Animal model of chlamydial infection.- Infect. Immun., 26: 728-735. 1979.
- 89.- White HJ, Blainey AD, Harrison KJ, et al. - Psittacosis.- Thorax., 36: 566-570. 1981.
- 90.- Wyrick PB. - Growth of Chlamydia psittaci in macrophages.- Infect. and Immunit., 3: 1054-1060. 1978.
- 91.- Woodland RM, Johnson AP. - Animal models of chlamydial infection.- Br. Med. Bull., 39: 175-179. 1983.
- 93.- Worns M. - Psittacosis-Ornithosis.- Enc. Med. Chirurgicale., 3033 D<sup>10</sup>
- 94.- Yöng EC, Chinn JS, Caldwell HD, et al. - Chlamydial infections in neonates and older children.- J. Clin. Microbiol. 10: 351-356. 1979.
- 95.- Yow EM, Brennan C, Levy S, et al. - Psittacosis.- Ann. J. Med. 27: 739-749. 1984.