

SECCIÓN 3.3.

AVES

CAPÍTULO 3.3.1.

CLAMIDIOSIS AVIAR

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: la clamidiosis aviar (CA) está causada por una especie de *Chlamydia* en las aves. La taxonomía de la familia Chlamydiaceae ha sido revisada recientemente. El género *Chlamydia* actualmente incluye 11 especies reconocidas, y entre ellas se han aislado *C. psittaci*, *C. avium* y *C. gallinacea* de las aves.

Los brotes de CA en aves psitácidas y en granjas de aves de corral causan daños económicos considerables. La infección puede conducir a enfermedades sistémicas y ocasionalmente fatales en las aves. Los signos clínicos son generalmente inespecíficos y varían mucho en lo referente a la gravedad, dependiendo de la especie y la edad del ave y la virulencia de la cepa de *Chlamydia*, pero la dificultad respiratoria es el signo más habitual. Muchas aves, especialmente aves psitácidas y aves de corral más viejas, pueden no mostrar signos clínicos; sin embargo, a menudo pueden excretar el agente durante largos períodos de tiempo.

A nivel de laboratorio, se recomienda a manejar el microorganismo aplicando medidas especiales, que vendrán determinadas por un análisis de riesgo biológico (ver Capítulo 1.1.4 Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de animales), y en muchos países incluso es obligatorio, puesto que las cepas de clamidias aviarias pueden causar enfermedades graves (neumonía) y la muerte en seres humanos si no reciben tratamiento.

Identificación del agente: el método preferido para la identificación de CA ya no es el aislamiento del organismo. Considerando el tiempo necesario, la necesidad de muestras de alta calidad, el hecho de que algunas cepas nunca crecerán *in vitro* y el peligro para el personal de laboratorio, para un diagnóstico rápido, sensible y específico actualmente se recomiendan pruebas de amplificación de ácido nucleico (NAAT). Estos métodos incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real, la detección basada en microchips de ADN y la secuenciación del ADN. El aislamiento, tinción citológica de frotis de exudado o heces y de frotis de impresión de tejidos, la tinción inmunohistoquímica de preparaciones citológicas e histológicas y los enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura de antígenos pueden usarse si no se dispone de NAAT.

Pruebas serológicas: la mera serología no es particularmente útil para diagnosticar una infección actual por *Chlamydia* en las aves debido a la alta prevalencia de esta infección en aves y a la persistencia a largo plazo (hasta varios meses) de los anticuerpos anti-clamidia. En la mayoría de las especies de aves, hay una alta tasa de anticuerpos anti-clamidia. Por lo tanto, para determinar si un ave concreta está infectada, la serología debe usarse siempre junto con la detección de genes o antígenos, o se deben examinar muestras pareadas del suero. Una prueba positiva es evidencia de que el ave ha sido infectada por la bacteria, pero no necesariamente indica una infección activa. Pueden producirse falsos negativos en aves con infecciones agudas que se analicen antes de la seroconversión. El tratamiento con antibióticos también puede retrasar o disminuir la respuesta de anticuerpos.

Los principales métodos serológicos que se usan para detectar anticuerpos contra clamidias son: (1) varios métodos de aglutinación de corpúsculos elementales (EBA), (2) la prueba de fijación del complemento y (3) ELISA. Los ELISA son altamente sensibles y específicos cuando se usan proteínas/péptidos recombinantes como dianas de antígenos y detectan IgM, IgG e IgA.

Requisitos para las vacunas: No hay vacunas comerciales disponibles para el control de la clamidiosis en las aves de corral.

A. INTRODUCCIÓN

La clamidiosis aviar (CA) está causada por una infección con una especie de *Chlamydia* en las aves. En 2015, la taxonomía de la familia *Chlamydiaceae* fue revisada por Sachse *et al.* (Sachse *et al.*, 2015). El género *Chlamydia* actualmente incluye 11 especies reconocidas, a saber: *C. abortus* (ovejas, cabras, ganado), *C. caviae* (cobayas), *C. felis* (gatos), *C. muridarum* (ratón, hámster), *C. psittaci* (aves y otros), *C. pecorum* (ovinos, bovinos), *C. pneumonia* (humanos y otros), *C. suis* (cerdos), *C. trachomatis* (humanos) y dos especies recientemente establecidas aisladas de aves, *C. avium* y *C. gallinacea* (Sachse *et al.*, 2014). Si bien la mayoría de estos microorganismos son altamente específicos del huésped, *C. pneumonia* y *C. psittaci* tienen un rango de hospedadores más amplio. Se ha informado que este último afecta no solo a aves y humanos, sino también a ganado vacuno, ovejas, cerdos, caballos y otros animales.

Hasta hace muy poco, *Chlamydophila psittaci* se consideraba el único agente causal de la enfermedad en las aves. Originalmente denominada psitacosis, la ornitosis como concepto se introdujo posteriormente para diferenciar entre la enfermedad de aves domésticas y aves acuáticas salvajes de la de las psitácidas. Actualmente, ambos síndromes se consideran iguales (Andersen & Vanrompay, 2008). La primera separación se basó en la suposición de que, en los humanos, la ornitosis era una enfermedad más leve que la psitacosis. No obstante, debe quedar claro que en los humanos, la enfermedad contraída por contacto con pavos y patos a menudo es más grave que la contraída por contacto con psitácidas.

La infección de las aves por *C. psittaci* es frecuente en todo el mundo y se ha hallado en unas 465 especies de aves (Kaleta & Taday, 2003). Los brotes de CA en las psitácidas y en explotaciones avícolas causan considerables pérdidas económicas. La infección puede comportar una enfermedad sistémica y en ocasiones mortal en las aves. Los signos clínicos en general son inespecíficos y muy variables por lo que respecta a la gravedad, y dependen de la especie y de la edad del ave, así como de la cepa de clamidia. La CA puede producir letargo, hipertermia, secreciones anormales, rinorrea y lagrimeo, y una disminución de la puesta de huevos. La mortalidad es muy variable. En las aves domésticas, los signos clínicos más frecuentes son conjuntivitis, anorexia y pérdida de peso, diarrea, deposiciones amarillentas, sinusitis, biliverdinuria, rinorrea, estornudo, lagrimeo y dificultad respiratoria. En muchas aves, especialmente en las psitácidas y aves de corral viejas, se puede presentar sin signos clínicos; sin embargo, liberan el agente durante períodos largos de tiempo. En la necropsia de aves afectadas se observa con frecuencia esplenomegalia y hepatomegalia, inflamación fibrinosa de los sacos aéreos, pericarditis y peritonitis (Andersen & Vanrompay, 2008; Vanrompay, 2013). Las lesiones histológicas apuntan a la presencia de la infección, pero no son patognomónicas a menos que vayan acompañadas de la identificación de clamidias.

Hasta hace poco, se han diferenciado claramente dentro de las cepas *C. psittaci* nueve genotipos distintos en base al gen *ompA* que codifica la principal proteína de la membrana externa (MOMP). Siete de estos genotipos se considera que tienen lugar principalmente en un orden o clase específicos de aves y dos en hospedadores no aviares, es decir, el genotipo A en aves psitácidas, el B, en palomas, el C en patos y gansos, el D en pavos, el E en palomas, patos y otras aves, los E/B en patos, pavos y palomas, el F en periquitos, el WC en ganado vacuno, y M56 en roedores. La mayoría de genotipos aviares también se han identificado esporádicamente en cepas de casos de transmisión zoonótica al ser humano, sobre todo A, B y E/B (Heddema *et al.*, 2006; Vanrompay *et al.*, 2007). Mientras tanto, se han introducido subgrupos para tres de los genotipos más heterogéneos, es decir, A-VS1, A-6BC, A-8455, EB-E30, EB-859, EB-KKCP, D-NJ1 y D-9N, y se han sugerido genotipos provisionales para cubrir las cepas que previamente no eran tipificables (Sachse *et al.*, 2008).

Actualmente, los antibióticos son el único medio de control. *Chlamydia psittaci* es sensible a varios antibióticos: el fármaco de elección varía en función del país. La clortetraciclina, la doxiciclina y otras tetraciclinas son los más utilizados. El tratamiento tiene que mantenerse durante largos periodos de tiempo. En el caso de las aves mascota, se suelen recomendar 45 días (Vanrompay, 2013).

La evidencia sugiere que otras especies de clamidias, como *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. trachomatis*, *C. suis* y *C. muridarum* también pueden ser albergadas por aves (Guo *et al.*, 2016; Pantchev *et al.*, 2009), así como por las especies de aves *C. avium* y *C. gallinacea* descritas por Sachse *et al.*, en 2014. Su importancia epidemiológica aún no está clara, sin embargo *C. avium* y *C. gallinacea* parecen estar bastante extendidas en

palomas y psitácidas o aves de corral, respectivamente. La patogenicidad de estas dos especies recién introducidas aún no se ha investigado a fondo. En los estudios publicados hasta la fecha, no se han observado signos clínicos en pollos portadores de *C. gallinacea* (Guo *et al.*, 2016; Laroucau *et al.*, 2009), ni en la mayoría de los portadores de *C. avium* entre las palomas. Sin embargo, parece probable, según los datos actualmente disponibles, que *C. avium* puede causar enfermedad respiratoria en loros y palomas (Sachse *et al.*, 2014). Ahora se recomienda hacer un diagnóstico diferencial y utilizar métodos de diagnóstico que sean capaces de diferenciar entre *C. psittaci* y las otras especies que pueden afectar a las aves. Hasta la fecha, solo los métodos moleculares permiten esta distinción.

1. Riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad

Las cepas aviarias de clamidias pueden infectar al hombre y se deben manejar aplicando los procedimientos de bioseguridad y bioprotección adecuados (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). La evaluación y gestión del riesgo son fundamentales al llevar a cabo el diagnóstico de CA. Se recomienda pedir a un médico ocupacional información, comunicación y vigilancia sanitaria suficientes.

La mayoría de las infecciones tienen lugar por inhalación de aerosoles infecciosos. Aunque la enfermedad se conoce mejor en las aves psitácidas, la infección en aves de corral preocupa especialmente, porque la transmisión al ser humano es frecuente durante la manipulación y sacrificio de estas aves (Dickx *et al.*, 2010; Lagae *et al.*, 2014). El examen postmortem de las aves infectadas y la manipulación de los cultivos debe realizarse en cabinas de flujo laminar certificadas de Clase II siempre que sea posible, o con equipo protector adecuado. Deben aplicarse procedimientos adecuados de descontaminación de agentes zoonóticos, porque una mera exposición transitoria puede provocar la infección en el hombre. El período de incubación suele ser de 5–14 días, aunque se conocen períodos de incubación más largos. En el hombre, las infecciones varían desde una forma latente a una enfermedad sistémica grave con neumonía intersticial y encefalitis. En pacientes con un tratamiento adecuado, la enfermedad raramente es mortal; por tanto, son importantes el conocimiento del riesgo y un diagnóstico precoz. Típicamente, la infección en el hombre cursa con dolor de cabeza, escalofríos, malestar y mialgia, con o sin signos de implicación pulmonar. La manifestación pulmonar es corriente; no obstante, los resultados por auscultación pueden parecer normales o infravalorar el grado de la infección. El diagnóstico puede resultar difícil y, en el pasado por lo general se realizaba mediante la prueba de fijación del complemento (CF) en sueros pareados para detectar la presencia de anticuerpos anti-clamidia. Sin embargo, ciertos pacientes siguen siendo seronegativos aun habiendo estado hospitalizados por psitacosis; por lo tanto, la serología se está sustituyendo por pruebas de amplificación del ácido nucleico (NAAT), que también permiten la trazabilidad de las aves causales. Salvo contraindicaciones, la tetraciclina, la doxiciclina y la azitromicina son los compuestos más indicados en el caso de infección humana. La duración del tratamiento dependerá del antibiótico, pero, si es con tetraciclina, debe continuar por lo menos durante 14 días.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la clamidiosis aviar y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente						
PCR convencional	–	–	n/a	++	+	n/a
PCR en tiempo real	–	–	n/a	+++	++	n/a
Microchips de ADN	–	–	n/a	++	+	n/a
Tinción citológica	–	–	n/a	+	–	n/a

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Aislamiento en cultivo celular o huevos embrionados	–	–	n/a	++	+	n/a
IHC en tejido fijado	–	–	n/a	++	–	n/a
Detección de respuesta inmunitaria						
CF	+	+	n/a	+	+	n/a
ELISA	++	+	n/a	+	++	n/a

Clave: +++= método recomendado, validado para el propósito indicado; ++=método adecuado, pero puede precisar validación; +=puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan en gran medida su aplicación; -=no adecuado para este fin; n/a= no aplicable.
 PCR = reacción en cadena de la polimerasa; IHC = inmunohistoquímica; CF = fijación del complemento; ELISA = enzimoimmunoanálisis

1. Identificación del agente

El método de elección para la identificación de la CA ya no es el aislamiento del microorganismo. A menudo se utilizan otras técnicas debido al tiempo requerido, la necesidad de muestras de alta calidad, el hecho de que ciertas cepas nunca crecerán *in vitro* y el peligro que supone para el personal de laboratorio, para un diagnóstico rápido, sensible y específico, actualmente se recomiendan las NAAT. Estas incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real, la detección basada en microchips de ADN y la secuenciación del ADN. El aislamiento, la tinción citológica de frotis de exudado o heces y de frotis de impresión de tejidos, la tinción inmunohistoquímica de preparaciones citológicas e histológicas, y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) por captura de antígeno son técnicas que pueden utilizarse en caso de que no se disponga de NAAT.

Las muestras que se han de recoger dependen de los signos de la enfermedad. En los casos agudos, las muestras deben incluir exudados inflamatorios o fibrinosos del interior y la periferia de los órganos que presenten lesiones, secreciones oculares y nasales, frotis por impronta de hígado, sangre completa, y muestras de tejido de riñón, pulmón, pericardio, bazo e hígado. En los casos con diarrea, debe utilizarse el contenido del colon o las heces. En las aves vivas, las mejores muestras son los hisopos faríngeos y nasales. También deben tomarse muestras de heces, hisopos de la cloaca, raspado conjuntival y exudado peritoneal.

1.1. Métodos moleculares – detección de ácido nucleico

Chlamydia psittaci puede identificarse y subtipificarse utilizando: (1) PCR convencional específica de la especie; (2) PCR en tiempo real (revisado en Sachse *et al.*, 2009); (3) secuenciación de *ompA* (Sachse *et al.*, 2008); (4) tipificación de secuencia de múltiples locus (MLST) (Pannekoek *et al.*, 2010); y (5) microchips de ADN (Sachse *et al.*, 2005, 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, *C. psittaci* no es el único agente clamidial que se encuentra en las aves. Los nuevos agentes clamidiales descritos por Sachse *et al.* en 2014 deben tenerse en cuenta cuando una muestra aviar determinada es positiva en una prueba general de clamidia, p. ej., una PCR o inmunohistoquímica específica de *Chlamydiaceae*, pero negativa en una prueba específica de especie para *C. psittaci*. En tal caso, la secuenciación parcial o completa del gen *ompA* y el operón de ARNr, o bien otras PCR específicas de especie revelarán la identidad de la cepa. También se ha descrito la aparición de cepas de *Chlamydia* que filogenéticamente están entre *C. psittaci* y *C. abortus* (Van Loock *et al.*, 2003; Pannekoek *et al.*, 2010), y también debe considerarse como un posible diagnóstico diferencial.

Debe plantearse el uso de reactivos diseñados para estabilizar el ADN cuando se anticipa un retraso en el procesamiento de la muestra (DeGraves *et al.*, 2003). Las muestras de ADN se pueden preparar usando reactivos de bajo costo o kits comerciales.

1.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa convencional

Las técnicas de PCR han reemplazado el aislamiento para la detección de clamidias de tejido animal. Los riesgos de infección para el personal de laboratorio se evitan mediante la inactivación de la muestra antes de la prueba. La sensibilidad de las PCR convencionales generalmente excederá la del aislamiento. Las PCR actuales convencionales para la detección de *C. psittaci* se dirigen al ARNr 16S-23S o al gen *ompA* (revisado en Sachse *et al.*, 2009). La sensibilidad y la especificidad varían según la preparación de la muestra y la PCR, pero se consideran inferiores a las de las PCR cuantitativas en tiempo real. La sensibilidad aumenta al dirigirse a un segmento de ADN relativamente corto o al usar un procedimiento anidado. Sin embargo, existe mayor riesgo de contaminación si no se tiene extremo cuidado al manipular las reacciones (consulte el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

1.1.2. PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real se ha convertido en el método preferido en los laboratorios de diagnóstico por su rapidez, alto rendimiento, potencial de cuantificación y facilidad de estandarización (Sachse *et al.*, 2009). Esta tecnología requiere una sonda con marcador fluorescente y un equipo especial, lo que aumenta los costos. Su sensibilidad puede ser equivalente a la del sistema anidado, pero los problemas de contaminación y el trabajo se reducen ya que se basa en una reacción en un sistema cerrado.

Para la detección e identificación del ADN de *C. psittaci* se recomienda un enfoque jerárquico. Tal enfoque incluye una PCR de cribado específica de *Chlamydiaceae* basada en las secuencias de 23S-rRNA en casos positivos (DeGraves *et al.*, 2003; Ehrlich *et al.*, 2006; Everett *et al.*, 1999), seguida de una PCR específica de *C. psittaci* basada en secuencias de la proteína de membrana externa (*ompA*) (Pantchev *et al.*, 2009) o del gen *incA* (Ménard *et al.*, 2006). Las sondas de unión a surco menor (MGB) se utilizan para descartar reacciones cruzadas con *C. abortus*.

El protocolo del ensayo específico de *C. psittaci* basado en *ompA* (Pantchev *et al.*, 2009) se proporciona con más detalle a continuación. El ensayo se realiza como una amplificación dúplex que incluye un control de amplificación interno (IAC). Se determinó un límite de detección de 2 unidades formadoras de inclusión por mezcla de reacción.

- i) Los oligonucleótidos específicos de *C. psittaci* son los CppsOMP1-F (5'-CAC-TAT-GTG-GGA-AGG-TGC-TTC-A-3') y CppsOMP1-R (5'-CTG-CGC-GGA-TGC-TAA-TGG-3'), así como la sonda MGB® CppsOMP1-S (FAM-CGC-TAC-TTG-GTG-TGA-C-TAMRA). El sistema del IAC incluye los cebadores EGFP1-F (GAC-CAC-TAC-CAG-CAG-AAC-AC) y EGFP10-R (CTT-GTA-CAG-CTC-GTC-CAT-GC), así como la sonda TaqMan EGFP-HEX (HEX-AGC-ACC-CAG-TCC-GCC-CTG-AGC-A-BHQ1). El plásmido IC2 (a la venta) sirve de molde para el IAC.
- ii) La amplificación se lleva a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos en un termociclador Mx3000P o equipo comparable. Cada reacción de 25 µl contiene 12,5 µl de mezcla madre universal para PCR en tiempo real 2x. La concentración final de cada cebador de *C. psittaci* es 0,8 µM, de cada cebador IAC 0,4 µM, y de cada sonda 0,2 µM.
- iii) Se añade ADN molde del IAC (500 copias) a cada reacción antes de llegar al volumen final con agua.
- iv) Se emplean los siguientes parámetros de ciclado: ciclo de calentamiento inicial a 95°C durante 10 minutos (un solo paso de desnaturalización), 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto (hibridación y extensión).
- v) Debe emplearse el valor del ciclo umbral (Ct = Cq ciclo de cuantificación) calculado automáticamente mediante el programa. Valores de Cq de 35 o inferiores se consideran positivos. Valores de Cq superiores a 35 deben tratarse con cautela porque pueden indicar una reacción cruzada con microorganismos relacionados. En estos casos, las muestras respectivas deben volver a examinarse, preferiblemente mediante otra prueba utilizando dianas genómicas distintas (Ménard *et al.*, 2006; Opota *et al.*, 2015). Las muestras también se pueden volver a analizar en la PCR en tiempo real. En este caso, solo se considerarán verdaderamente positivas las muestras que den positivo repetidamente.

Se desarrollaron otros protocolos de PCR en tiempo real basados en *ompA* para diferenciar entre genotipos de *C. psittaci* (Geens *et al.*, 2005, Heddemma *et al.*, 2015). La última PCR también está validada para su uso en muestras humanas en caso de una infección zoonótica y, por lo tanto, es útil para rastrear cadenas de transmisión zoonótica.

Existen protocolos de PCR en tiempo real para la detección específica de *C. avium* (Zocevic *et al.*, 2013) y *C. gallinacea* (Laroucau *et al.*, 2015).

1.1.3. Microchips de ADN

Se ha observado que la tecnología de chips de ADN es una potente herramienta para el diagnóstico de infecciones por clamidias (Sachse *et al.*, 2005). La prueba para la detección e identificación de *Chlamydiaceae* spp. se basa en la amplificación, mediante PCR, del gen rARN 23S y la posterior identificación de *C. psittaci* y los otros agentes aviares *C. avium* y *C. gallinacea* mediante hibridación con sondas específicas de especie. Se ha validado y se ha comprobado que es adecuada para el diagnóstico sistemático (Borel *et al.*, 2008). Este enfoque metodológico permite la detección de infecciones mixtas por clamidias y la identificación de especies de clamidias inesperadas directamente a partir de muestras clínicas. Una versión extendida del microchip de ADN permite la genotipificación basada en *ompA* de cepas de *C. psittaci* y muestras clínicas (Sachse *et al.*, 2008).

1.2. Visualización directa – tinción citológica

Las clamidias se pueden detectar en frotis de hisopos cloacales o conjuntivales y en frotis de impresión de tejidos (pulmón, hígado, bazo, riñón y sacos aéreos si hay suficiente material disponible) mediante tinción citológica como la de Giemsa, Giménez, Giménez modificada, Ziehl-Neelsen y Macchiavello (Campbell *et al.*, 2015). La técnica de Giménez modificada es la que se usa con mayor frecuencia (Andersen & Vanrompay, 2008). Sin embargo, ninguna de estas tinciones detecta específicamente las clamidias. Todas son menos sensibles que los métodos de detección de antígenos basados en anticuerpos o los NAAT específicos. Por lo tanto, el uso de una tinción citológica está perdiendo popularidad.

1.2.1. Tinción de Giménez modificada

i) Reactivos:

a) Solución 1

Se añaden H₂O destilada (450,0 ml) y fenol (5,0 ml) a fucsina básica (2,5 g) y etanol al 95% (50 ml). Se incuba 48 horas a 37°C. Se filtra y se guarda en la oscuridad a temperatura ambiente.

b) Solución 2

Na₂HPO₄ (11,65 g); NA₂HPO₄.H₂O (2,47 g); H₂O destilada, pH 7,5 (hasta un litro).

c) Solución 3

Solución 1 (20,0 ml) y Solución 2 (25,0 ml). Se deja reposar 10 minutos, se filtra y se usa.

d) Solución 4

Ácido cítrico al 0,5%.

e) Solución 5

Verde rápido (Fast green) (0,2 g); H₂O destilada (100 ml); y ácido acético glacial (0,2 ml).

f) Solución 6

Solución 5 (20,0 ml) y H₂O destilada (50,0 ml).

ii) El procedimiento para los frotis es el siguiente:

a) Se fijan en metanol durante 5 minutos.

b) Se tiñen con Solución 3 durante 10 minutos y se lavan con agua del grifo.

- c) Se tiñen con la solución de contraste 6 durante 2 minutos.
 - d) Se lavan con agua del grifo y se secan al aire.
- iii) El procedimiento para los cortes en parafina es el siguiente:
- a) Se elimina la parafina y se hidratan con H₂O destilada.
 - b) Se tiñen con Solución 3 durante 10 minutos y se lavan con agua del grifo.
 - c) Se sumergen en la Solución 4 hasta que el corte no suelte más color rojo. Se lavan con agua del grifo.
 - d) Se tiñen con la solución de contraste 6 mediante 20 inmersiones.
 - e) Se sumerge la preparación en dos cambios de alcohol al 95%, con cinco inmersiones en cada caso. Se deshidratan, se clarifican y se montan.

Nota: también está disponible un procedimiento más corto con carbol fucsina “listo para usar” (1/10 en agua destilada), ácido acético (0,1%) y contratinción con verde malaquita (0,8%) (Vanrompay *et al.*, 1992). Las clamidias aparecen rojas sobre un fondo verde.

1.3. Aislamiento en cultivo celular

1.3.1. Tratamiento de las muestras para el aislamiento

El manejo adecuado de las muestras clínicas es necesario para evitar la pérdida de infectividad de las clamidias durante el envío y la conservación. Se desarrolló un medio especial que consiste en sacarosa/fosfato/glutamato (SPG) para rickettsias y que ha demostrado ser satisfactorio para el transporte de muestras de campo de *Chlamydia*. El medio recomendado para clamidias consiste en tampón SPG: sacarosa (74,6 g/litro); KH₂PO₄ (0,52 g/litro); K₂HPO₄ (1,25 g/litro); ácido L-glutámico (0,92 g/litro) y albúmina sérica bovina - fracción V (1 g/litro), que se puede esterilizar por filtración. A esto se suman la estreptomina, la vancomicina (25–100 µg / ml), la anfotericina B y la gentamicina (50 µg/ml cada una). La adición de antibióticos reduce el efecto de la contaminación, incluso cuando las muestras se envían a temperatura ambiente. El microorganismo permanece viable durante varios días incluso en ausencia de conservación por refrigeración. Este medio también se puede usar como diluyente de laboratorio y para congelar clamidias.

Las muestras contaminadas deben pretratarse antes de usarse para inocular cultivos celulares. Existen tres métodos básicos: tratamiento con antibióticos, tratamiento con antibióticos junto con centrifugación a baja velocidad (Andersen y Vanrompay, 2008) y tratamiento con antibióticos con filtración (Andersen & Vanrompay, 2008). Se pueden usar varios antibióticos que no inhiban la clamidia. Las muestras se homogeneizan en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, que contenga un máximo de lo siguiente: estreptomina, vancomicina (100 µg/ml cada una) y gentamicina (50–200 µg/ml). Se puede agregar anfotericina B o nistatina (50 µg/ml cada una) para controlar la levadura y el crecimiento fúngico. Deben evitarse la penicilina, la tetraciclina y el cloranfenicol, ya que inhiben el crecimiento de clamidias. En algunos casos, como por ejemplo, muestras fecales porcinas, el tratamiento con penicilina G (500 IE/ml) puede ser útil.

Cuando la contaminación es leve, las muestras deben homogeneizarse en la solución antibiótica antes de la inoculación en cultivos de tejidos. Las muestras a menudo se dejan reposar en la solución de antibiótico durante 24 horas a 5°C antes de la inoculación. Las muestras muy contaminadas, como las muestras fecales, deben homogeneizarse en antibióticos y luego centrifugarse a 500 **g** durante 20 minutos. La capa superficial y la capa inferior se descartan. El sobrenadante se recoge y se vuelve a centrifugar. El sobrenadante final se usa para la inoculación. Las muestras se deben pasar a través de un filtro que de promedio tenga 450–800 µm de tamaño de poro si la contaminación persiste.

Los cultivos celulares son el método más cómodo para el aislamiento de *C. psittaci*. Las líneas celulares más comunes son las células de riñón de mono Búfalo verde (BGM), McCoy, HeLa y mono verde africano (Vero), y las células L (Vanrompay *et al.*, 1992). Las células se cultivan como monocapas usando medios de cultivo tisular estándar que contengan un 5–10% de suero fetal bovino y antibióticos que no sean inhibidores de clamidias (como se ha descrito previamente). Cuando se selecciona un sistema de cultivo celular es importante recordar que:

- i) Las clamidias se pueden identificar mediante la inmunofluorescencia directa o indirecta o por otras técnicas de tinción adecuadas.

- ii) El inóculo se suele centrifugar sobre la monocapa para aumentar su infectividad.
- iii) La muestra puede requerir un pase a los 4–5 días para aumentar la sensibilidad del aislamiento.
- iv) Se debe examinar la muestra dos o tres veces en cada pase; y
- v) Las clamidias pueden ser infecciosas para el hombre.

Estos condicionamientos pueden cumplirse con los viales pequeños de fondo plano y con cierre (3,7 ml, 15 x 45 mm) o los frascos que contienen cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Se inoculan varios viales con cada muestra, normalmente cuatro o seis, para permitir la fijación y tinción a distintos tiempos y para hacer pases nuevos a los 6 días de la inoculación en el caso de las muestras que sean aparentemente negativas. Cuando se analizan muchas muestras, se pueden utilizar placas con 24 pocillos, que tienen la ventaja de ahorrar trabajo. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la contaminación cruzada entre muestras puede ser un problema.

Las clamidias se pueden aislar en células que se están dividiendo normalmente, pero es preferible utilizar células que no se dividen, porque estas pueden suministrar más nutrientes para el crecimiento de las clamidias. Además, las células quiescentes se pueden observar durante periodos de tiempo más prolongados. La división de la célula hospedadora se puede inhibir por agentes citotóxicos, como cicloheximida, que puede añadirse al medio a razón de 0,5–2,0 µg/ml al mismo tiempo que la inoculación de la monocapa (Andersen & Vanrompay, 2008). Se logra un efecto citostático similar que potenciará el crecimiento de la mayoría de cepas de clamidia utilizando medio de cultivo tisular sin suero.

La unión de las clamidias a las células se incrementa cuando el inóculo se centrifuga sobre la monocapa a 2.000–3.500 *g* durante 30–90 minutos a 37°C. Tras un periodo de incubación de 2 horas a 37°C y en un 5% de CO₂, el inóculo se elimina y se reemplaza con medio de cultivo de tejidos sin suero y con cicloheximida, y los cultivos se incuban a 37–39°C. Los cultivos se examinan para detectar clamidias a intervalos regulares utilizando un método de tinción apropiado. Normalmente se hace el día 2 o 3, así como el día 4 o 5. Los cultivos que parecen negativos al quinto día se recogen y se vuelven a inocular en medio nuevo. Cuando se hacen pases sucesivos de clamidias, se deben pasar tanto las células como el medio de cultivo, y se debe evitar la congelación y descongelación para romper las células, ya que esto destruiría las clamidias.

Antes de teñir los cultivos, primero se elimina el medio, se lavan con PBS y se fijan con acetona o metanol durante 2–10 minutos. El tiempo de fijación del cultivo depende del recipiente de cultivo utilizado. Como la acetona ataca a la mayoría de los plásticos, puede ser preferible utilizar una mezcla de 50% de acetona y 50% de alcohol metílico. Se pueden emplear varios métodos de tinción para demostrar las inclusiones de las clamidias. El método preferido es la inmunofluorescencia directa (Andersen & Vanrompay, 2008). Se aplica a las células infectadas un antisuero contra clamidias conjugado con fluoresceína y se incuba 30 minutos en una cámara húmeda a 37°C. A continuación se lavan los cubres tres veces con PBS, se montan de inmediato y se examinan. Las inclusiones de clamidias emiten fluorescencia de color verde. Existen preparaciones comerciales de conjugados muy específicos que emplean anticuerpos monoclonales (MAbs). También se pueden preparar sueros policlonales, pero es importante que sean antisueros específicos y de título alto. Los antisueros policlonales se pueden obtener en conejos, cobayas, ovejas o cabras. Los conjugados se preparan utilizando técnicas estándar (Andersen & Vanrompay, 2008). Las inclusiones de clamidias también se pueden demostrar mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta y de inmunoperoxidasa (Andersen & Vanrompay, 2008). Se puede hacer tinción directa mediante las técnicas de Giménez (véase el apartado B.1.2.1), de Giemsa, de Ziehl–Neelsen, o de Machiavello. A diferencia de la inmunofluorescencia, estas técnicas tienen la ventaja de que permiten el uso de microscopios estándar de fondo claro.

1.4. Aislamiento en huevos embrionados

Para el aislamiento primario de clamidias todavía se utilizan los embriones de pollo. Las muestras deben manipularse y pre-tratarse con antibióticos, como se describe en el apartado B.1.3. El procedimiento estándar de inoculación consiste en inocular hasta 0,5 ml de inóculo en el saco vitelino de un embrión de 6–7 días libre de patógenos específicos (Andersen & Vanrompay, 2008). Los huevos se incuban a 39°C mejor que a 37°C, ya que la multiplicación de las clamidias es mucho mejor a temperaturas más altas. Generalmente la multiplicación del microorganismo causa la muerte del embrión a los 3–10 días. Si no ocurriera la muerte, se hacen dos pases adicionales antes de dar como negativa una muestra. Las infecciones por clamidias producen una congestión vascular típica de las membranas del saco vitelino. Los sacos se recogen y se homogeneizan para hacer una suspensión al

20% en tampón SPG, y se pueden congelar para mantener la cepa, o se inoculan en huevos o en cultivos celulares.

El microorganismo puede identificarse preparando un antígeno de un saco vitelino infectado y examinándolo mediante la tinción directa de los frotis con colorantes apropiados o utilizando el antígeno en una prueba serológica. Los cultivos celulares en monocapa se pueden inocular con la suspensión del saco vitelino y observar la presencia de inclusiones de clamidias por inmunofluorescencia directa 48–72 horas más tarde. Las inclusiones típicas son cuerpos intracitoplásmicos, redondos, o con forma de sombrero. En el caso de algunas cepas virulentas, las inclusiones se rompen con facilidad y el antígeno de las clamidias se dispersa por el citoplasma.

1.5. Detección de antígeno

1.5.1. Tinción inmunohistoquímica

Se puede utilizar una tinción inmunohistoquímica para detectar clamidias en preparaciones citológicas o histológica y es una herramienta indispensable para demostrar la asociación de agentes clamidiales a lesiones anatomopatológicas en los tejidos. Esta técnica es más sensible y específica que la tinción histoquímica. La detección de antígeno puede llevarse a cabo utilizando anticuerpos anti-*Chlamydia* comerciales dirigidos contra LPS o MOMP (proteína principal de membrana externa),

Es muy importante la elección del anticuerpo primario. Se han utilizado anticuerpos tanto policlonales como monoclonales. Debido a que el formol afecta a los antígenos de las clamidias, es recomendable que los anticuerpos policlonales se obtengan contra clamidias purificadas e inactivadas con formol. La cepa de clamidia utilizada no es importante, pues los anticuerpos reaccionarán principalmente con los antígenos específicos de grupo. También deben seleccionarse MAb que reaccionen con clamidias fijadas con formol. Se puede utilizar un panel de MAb específicos de grupo.

1.5.2. Enzimoanálisis

El ELISA ha sido ampliamente introducido en formato de kits comerciales para su utilización en el diagnóstico de la clamidiosis humana. Estos kits detectan el antígeno del lipopolisacárido (LPS) (antígeno de grupo) y detectan todas las especies de *Chlamydiaceae*. Se han probado varios de estos kits para detectar clamidias en aves (Vanrompay *et al.*, 1994), pero ninguno ha sido autorizado para la detección de *C. psittaci*. Un problema con algunas de estas pruebas es que el LPS de las clamidias comparte algunos epítomos con otras bacterias gramnegativas, y estos epítomos pueden originar reacciones cruzadas, dando lugar a un gran número de falsos positivos. En algunos kits elaborados más recientemente, este problema se ha reducido o eliminado mediante una selección cuidadosa de los MAb utilizados. Tales preparaciones, sin embargo, carecen aún de sensibilidad porque se requieren centenares de microorganismos para dar una reacción positiva. La opinión de los técnicos es que se puede realizar un diagnóstico de la CA cuando se obtiene un resultado fuertemente positivo mediante una reacción ELISA en aves con signos de psitacosis. Un resultado positivo en un ave individual sin signos de enfermedad no se considera relevante debido al número falsos positivos e indica la necesidad de llevar a cabo más pruebas utilizando métodos diferentes.

2. Pruebas serológicas

La mera serología no es particularmente útil para diagnosticar una infección actual por *Chlamydia* en aves debido a la alta prevalencia de esta infección en las aves y a la persistencia a largo plazo (hasta varios meses) de anticuerpos anti-clamidia. En la mayoría de las especies de aves, existe una alta tasa de antecedentes de anticuerpos anti-clamidia. Por lo tanto, para determinar si un ave en concreto está infectada, la serología debe usarse siempre junto con la detección del antígeno o del gen, o se deben examinar muestras pareadas de suero (Vanrompay, 2013). Sin embargo, el examen obligatorio de sueros pareados elimina la serología como prueba inmediata de relevancia clínica. Una prueba positiva es evidencia de que el ave ha sido infectada por la bacteria, pero no necesariamente indica una infección activa. Pueden producirse falsos negativos en aves con infecciones agudas que se analicen antes de la seroconversión. El tratamiento con antibióticos también puede retrasar o disminuir la respuesta de anticuerpos. Los principales métodos serológicos que se utilizan para detectar anticuerpos contra clamidias son: (1) varios métodos de aglutinación de corpúsculos elementales (EBA), (2) CF y (3) ELISA.

La EBA detecta principalmente anticuerpos IgM y, por lo tanto, puede detectar infecciones tempranas. Un resultado negativo no garantiza que un ave esté libre de infección porque la sensibilidad de la prueba es bastante baja. La CF directa detecta IgG aviar pero no IgM, por lo que las infecciones recientes pueden pasar

desapercibidas. Sus desventajas son que: (1) no se dispone de antígenos comerciales para la prueba, (2) la prueba no puede usarse para analizar sueros de especies de aves cuyas inmunoglobulinas no fijan el complemento, (3) solo es relativamente sensible, (4) no se puede usar para diferenciar entre anticuerpos IgG e IgM, y (5) es bastante laboriosa cuando hay que analizar un gran número de muestras. La CF modificada es más sensible pero tiene las mismas desventajas que la CF.

La CF está siendo reemplazado cada vez más por ELISA altamente sensibles y específicos basados en el uso de proteínas recombinantes (Verminnen *et al.*, 2006) o antígenos peptídicos (Sachse *et al.*, 2009). Los ELISA pueden detectar IgM, IgG e IgA aviares siempre que se use el conjugado correcto específico del isotipo.

2.1. Fijación del complemento directa modificada para *Chlamydia*

Para la CA, se utiliza una prueba de CF directa modificada que difiere de la CF directa en que a la dilución de complemento se añade suero normal no calentado de pollo sin anticuerpo contra las clamidias. El suero normal incrementa la sensibilidad de la CF, de modo que puede usarse para analizar sueros de especies aviares cuyos anticuerpos normalmente no fijan complemento de cobaya.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) El suero debe inactivarse por calor a 60°C durante 30 minutos antes de su uso.
- ii) A continuación, el suero se diluye a 1/5 en solución salina tamponada con veronal (barbiturato) (VBS).
- iii) Se preparan diluciones a la mitad del suero diluido en placas de microtitulación de fondo redondeado de 96 pocillos.
- iv) Se diluye complemento de cobaya en VBS antes de la adición del antígeno y se usan 2 unidades hemolíticas complementarias.
- v) Los sueros suplementados con un 5% de suero de pollo fresco, el complemento y el antígeno se hacen reaccionar en las placas y se incuban durante 1 hora a 37°C (un procedimiento alternativo aceptable es la incubación durante la noche a 4 °C).
- vi) Se agrega una suspensión al 2–4% de glóbulos rojos lavados sensibilizados.
- vii) Las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C y se centrifugan durante 5 minutos a 600 g.

Cuando se usan antígenos para CF comerciales y reactivos para CF listos para usar, se deben aplicar las instrucciones del fabricante.

Controles recomendados para verificar las condiciones de prueba:

- i) Control positivo: un suero control que dé una reacción positiva;
- ii) Suero de control negativo: un suero de control que dé una reacción negativa;
- iii) Control anti-complementario (control del suero): diluyente + suero problema inactivado + complemento + sistema hemolítico;
- iv) Control de antígenos: diluyente + antígeno + complemento + sistema hemolítico;
- v) Control del sistema hemolítico: diluyente + sistema hemolítico;
- vi) Control del complemento: diluyente + titulación del complemento + antígeno + sistema hemolítico.
- vii) Se debe verificar la ausencia de actividad anti-complementaria en cada suero; los sueros anticomplementarios deben ser excluidos del análisis.

Una muestra que produce 100% de hemólisis en la dilución 1/5 es negativa y una muestra que produce 25–100% de hemólisis es positiva.

2.1.2. Preparación del antígeno para la CF

El método más sencillo comienza con el crecimiento de las clamidias en un cultivo celular. Los dos métodos que se describen a continuación producen antígenos que pueden utilizarse en pruebas de micro-CF. Los procedimientos son muy similares: ambos incluyen el crecimiento de las clamidias en cultivo celular, la inactivación de las mismas, la purificación parcial del

antígeno, la rotura mecánica y la dilución en un tampón apropiado. El método elegido dependerá del equipo disponible.

El primer procedimiento (Grimes, 1985) comienza con la recogida de las clamidias y de los restos del tapiz celular cuando se aprecia un efecto citopático. El cultivo se inactiva añadiendo fenol a una concentración final de 1%, incubando 24 horas a 37°C y concentrando por centrifugación a 10.000 **g** durante 1 hora. El sedimento se diluye al 10% de su volumen original utilizando VBS, pH 7,2, que contenga fenol al 1% y glicerol al 1%.

El sedimento se homogeneiza a continuación en un omnimixer al máximo de velocidad, durante tres períodos de 1 minuto en baño de hielo. Para eliminar los restos, el homogenizado se centrifuga 15 minutos a 100 **g**. Algunos procedimientos sugieren calentar el antígeno en ese momento con agua hirviendo durante 30 minutos. El sobrenadante se conserva y se diluye a la concentración deseada.

En el segundo procedimiento para la producción de antígeno para la prueba de CF (Bracewell & Bevan, 1986), el antígeno se prepara a partir de células L infectadas con una cepa de *C. psittaci*. Se elimina el medio de cultivo y las células se calientan 40 minutos a 56°C. Las células se lisan en agua destilada, las clamidias se liberan por ultrasonificación y la preparación se hace isotónica con VBS. El antígeno se analiza frente a un suero de oveja convaleciente y se usa como 2 unidades en la prueba de micro-CF.

Existen varios procedimientos para la preparación del antígeno a partir de sacos vitelinos infectados, algunos de ellos muy elaborados. Sin embargo, con el siguiente procedimiento resulta relativamente fácil preparar un antígeno crudo a partir de saco vitelino infectado que funciona bien en la prueba directa de CF modificada. Se utiliza una cepa de clamidia adaptada al huevo para inocular huevos embrionados de 6–7 días de gallina a través del saco vitelino. Se recogen los sacos vitelinos de embriones que mueran entre los 3 y 7 días post-inoculación y la mezcla se diluye a 1/3 en PBS, tampón Tris, o medio de cultivo, y luego se esteriliza en autoclave durante 20 minutos. La suspensión se enfría y se homogeneiza cuidadosamente. Se recomienda utilizar un homogeneizador de tejidos de alta velocidad durante 3–5 minutos. Después de la homogeneización, se añade fenol a una concentración final del 0,5% (se prepara una reserva de fenol al 5% y se añade 1 ml por cada 9 ml de antígeno). La preparación de antígeno se mantiene en reposo durante 3 días y, a continuación, se usa el sobrenadante después de centrifugar 20 minutos a 1.000 **g**. El antígeno se puede conservar durante largos períodos de tiempo a 4°C.

2.2. ELISA de proteína principal recombinante de membrana externa

El ELISA de proteína principal recombinante de membrana externa (MOMP) (Verminnen et al., 2006) se puede aplicar a sueros de pollo y pavo pretratados con caolín para eliminar la actividad de fondo. Los títulos de anticuerpos específicos de MOMP se determinan usando un protocolo de ELISA estándar y placas de micropocillos recubiertas con MOMP recombinante. Se añade suero diluido a 1/100 a los pocillos recubiertos. La MOMP recombinante se expresa en células COS7 transfectadas con pcDNA4: MOMPHis (Vanrompay et al., 1999). En resumen, las células COS7 se cultivan en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 3,7 g de bicarbonato de sodio/litro, L-glutamina 1 mM y suero fetal bovino al 10%. La transfección con ADN de plásmido se realiza mediante el método de dietilaminoetil dextrano. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, la producción de MOMP recombinante se comprueba mediante una tinción de inmunofluorescencia indirecta usando MAbs específicos de serovar y de género. La MOMP recombinante marcada con la etiqueta His se purifica mediante cromatografía de afinidad y la concentración de proteína se determina mediante el ensayo de proteína con ácido bicinonínico. Para la determinación de títulos de anticuerpos, se usan diluciones de 1/2000 y 1/4000 de anticuerpo IgG (H + L) anti-pollo/pavo biotinilado y estreptavidina conjugada con peroxidasa, respectivamente. Los resultados son positivos si la absorbancia excede el valor de corte de la media de los sueros de control negativo más tres veces la desviación estándar.

2.3. Otras pruebas

Otras pruebas son la prueba de inmunodifusión en medio sólido, la prueba de aglutinación con látex (LA), la prueba de la aglutinación de los corpúsculos elementales (EBA) (Grimes & Arizmendi, 1996) y la prueba de micro-inmunofluorescencia (MIFT). La inmunodifusión es menos sensible que la prueba de la CF. La prueba de la LA detecta anticuerpos contra *C. psittaci* y es rápida y fácil de realizar (Grimes et al., 1993). Las bolas de látex se recubren con antígeno purificado de la clamidia, se mezclan cuidadosamente con el suero problema en una placa de vidrio, y se rotan durante 2 minutos para favorecer la aglutinación. La prueba se lee contra un fondo oscuro. Los sueros que dan reacción positiva deben analizarse de nuevo con bolas no recubiertas para eliminar la posibilidad de

aglutinación inespecífica. Las pruebas de la LA y de la CF directa se correlacionan en un 72,5% de las pruebas con sueros pareados. La prueba de la LA tiene una sensibilidad del 39,1% y una especificidad del 98,1% con respecto a la prueba de la CF directa (Grimes *et al.*, 1993). La prueba detecta tanto la IgG como la IgM, pero es mejor para la IgM. Se ha sugerido su empleo para detectar infecciones recientes o activas. La prueba de la EBA detecta solamente la IgM y es indicativa de una infección actual. La prueba de la MIFT es rápida y fácil de realizar; sin embargo, no siempre están disponibles los sueros antiespecie conjugados con fluoresceína.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

Hasta la fecha, no hay vacunas comerciales contra la clamidiosis aviar, aunque la vacunación con un plásmido de ADN recombinante que contiene el gen *ompA* de *C. psittaci* proporcionó protección significativa (parcial) en pavos (Verminnen *et al.*, 2010) y periquitos (Harkinezhad y Schautteet, 2009), ambos libres de patógenos específicos e infectados experimentalmente. La vacunación con ADN tiene la ventaja de que puede usarse en presencia de anticuerpos maternos (Van Loock *et al.*, 2004) y el antígeno se procesa de la misma manera que durante una infección natural, dando como resultado respuestas inmunitarias humerales y celulares.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSEN A.A. & VANROMPAY D. (2008). Chapter 16, Chlamydiosis. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens, Fifth Edition*, Dufour-Zavala L., ed. The American Association of Avian Pathologists (AAAP), Jacksonville, Florida, USA.

BOREL N., KEMPF E., HOTZEL H., SCHUBERT E., TORGERSON P., SLICKERS P., EHRLICH R., TASARA T., POSPISCHIL A. & SACHSE K. (2008). Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay – a validation study. *Mol. Cell. Probes*, **22**, 55–64.

BRACEWELL C.D. & BEVAN B.J. (1986). Chlamydiosis in birds in Great Britain. 1. Serological reactions to chlamydia in birds sampled between 1974 and 1983. *J. Hyg. (Camb.)*, **96**, 447–451.

CAMPBELL T.W. (2015). Normal avian cytology. *In: Exotic Animal Hematology and Cytology, Fourth Edition*, Campbell T.W., ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA and Oxford, UK, 219–227.

DEGRAVES F.J., GAO D. & KALTENBOECK B. (2003). High-sensitivity quantitative PCR platform. *Biotechniques*, **34**, 106–115.

DICKX V., GEENS T., DESCHUYFFELEER T., TYBERGHEN L., HARKINEZHAD T., BEECKMAN D.S., BRAECKMAN L. & VANROMPAY D. (2010). *Chlamydophila psittaci* zoonotic risk assessment in a chicken and turkey slaughterhouse. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 3244–3250.

EHRLICH R., SLICKERS P., GOELLNER S., HOTZEL H. & SACHSE K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell Probes*, **20**, 60–63.

EVERETT K.D.E., HORNING L.J. & ANDERSEN A.A. (1999). Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 575–580.

GEENS T., DEWITTE A., BOON N. & VANROMPAY D. (2005). Development of a *Chlamydophila psittaci* species-specific and genotype-specific real-time PCR. *Vet. Res.*, **36**, 1–11.

GRIMES J.E. (1985). Direct complement fixation and isolation attempts for detecting *Chlamydia psittaci* infection of psittacine birds. *Avian Dis.*, **29**, 837–877.

GRIMES J.E. & ARIZMENDI F. (1996). Usefulness and limitations of three serologic methods for diagnosing or excluding chlamydiosis in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **209**, 747–750.

GRIMES J.E., PHALEN D.N. & ARIZMENDI F. (1993). *Chlamydia* latex agglutination antigen and protocol improvement and psittacine bird anti-chlamydial immunoglobulin reactivity. *Avian Dis.*, **37**, 817–824.

GUO W., LI J., KALTENBOECK B., GONG J., FAN W. & WANG C. (2016). *Chlamydia gallinacea*, not *C. psittaci*, is the endemic chlamydial species in chicken (*Gallus gallus*). *Sci. Rep.*, **6**, 19638.

HARKINEZHAD T. & SCHAUTTEET K. (2009). Protection of budgerigars (*Melopsittacus Undulatus*) against *Chlamydophila psittaci* challenge by DNA vaccination. *Vet. Res.*, **40**, 61.

- HEDDEMA E., VAN HANNEN E.J., BONGAERTS M., DIJKSTRA F., TEN HOVE R.J., DE WEVER B. & VANROMPAY D. (2015). Typing of *Chlamydia psittaci* to monitor the epidemiology and to aid in the control of Psittacosis, The Netherlands, 2008–2013. *Eurosurveillance*, **20**, pii: 21026.
- HEDDEMA E.R., VAN HANNEN E.J., DUIM B., VANDENBROUCKE-GRAULS C.M. & PANNEKOEK Y. (2006). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* in human samples. *Emerg. Infect. Dis.*, **12**, 1989–1990.
- KALETA E.F. & TADAY E.M. (2003). Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.*, **32**, 435–462.
- LAGAE S., KALMAR I., LAROUCAU K., VORIMORE F. & VANROMPAY D. (2014). Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J. Med.*, **63**, 399–407.
- LAROUCAU K., AAZIZ R., MEURICE L., SERVAS V., CHOSSAT I., ROYER H., DE BARBEYRAC B., VAILLANT V., MOYEN J.L., MEZIANI F., SACHSE K. & ROLLAND P. (2015). Outbreak of psittacosis in a group of women exposed to *Chlamydia psittaci*-infected chickens. *Eurosurveillance*, **20**, pii: 21155.
- LAROUCAU K., VORIMORE F., AAZIZ R., BERNDT A., SCHUBERT E. & SACHSE K. (2009). Isolation of a new chlamydial agent from infected domestic poultry coincided with cases of atypical pneumonia among slaughterhouse workers in France. *Infect. Genet. Evol.*, **9**, 1240–1247.
- MÉNARD A., CLERC M., SUBTIL A., MÉGRAUD F., BÉBÉAR C. & DE BARBEYRAC B. (2006). Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *J. Med. Microbiol.*, **55**, 471–473.
- OPOTA O., JATON K., BRANLEY J., VANROMPAY D., ERARD V., BOREL N., LONGBOTTOM D. & GREUB G. (2015). Improving the molecular diagnosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* infection with a species-specific duplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.*, **64**, 1174–1185.
- PANNEKOEK Y., DICKX V., BEECKMAN D.S.A., KEIJZERS W.C., VRETOU E., VANROMPAY D. & VAN DER ENDE A. (2010). Multi Locus Sequence Typing of *Chlamydia* reveals host species jumps by *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus*. *PLoS One*, **5**, e14179.
- PANTCHEV A., STING R., BAUERFEIND R., TYCZKA J. & SACHSE K. (2009). New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet. J.*, **181**, 145–150.
- SACHSE K., BAVOIL P.M., KALTENBOECK B., STEPHENS R.S., KUO C.C., ROSSELLÓ-MÓRA R. & HORN M. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst. Appl. Microbiol.*, **38**, 99–103.
- SACHSE K., HOTZEL H., SLICKERS P., ELLINGER T. & EHRLICH R. (2005). DNA microarray-based detection and identification of *Chlamydia* and *Chlamydophila*. *Mol. Cell Probes*, **19**, 41–50.
- SACHSE K., LAROUCAU K., HOTZEL H., SCHUBERT E., EHRLICH R. & SLICKERS P. (2008). Genotyping of *Chlamydophila psittaci* using a new DNA microarray assay based on sequence analysis of *ompA* genes. *BMC Microbiol.*, **8**, 63.
- SACHSE K., LAROUCAU K., RIEGE K., WEHNER S., DILCHER M., CREASY H.H., WEIDMANN M., MYERS G., VORIMORE F., VICARI N., MAGNINO S., LIEBLER-TENORIO E., RUETTGER A., BAVOIL P.M., HUFERT F.T., ROSSELLÓ-MÓRA R. & MARZ M. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, **37**, 79–88.
- SACHSE K., VRETOU E., LIVINGSTONE M., BOREL N., POSPISCHIL A. & LONGBOTTOM D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections (review). *Vet. Microbiol.*, **135**, 2–21.
- VAN LOOCK M., LAMBIN S., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.M. & VANROMPAY D. (2004). Influence of maternal antibodies on *Chlamydophila psittaci*-specific immune responses in turkeys elicited by naked DNA. *Vaccine*, **22**, 1616–1623.
- VAN LOOCK M., VANROMPAY D., HERRMANN B., VANDER STAPPEN J., VOLCKAERT G., GODDEERIS B.M. & EVERETT K.D. (2003). Missing links in the divergence of *Chlamydophila abortus* from *Chlamydophila psittaci*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 761–770.
- VANROMPAY D. (2013). Chapter 24, Avian Chlamydiosis. In: Diseases of Poultry, Thirteenth Edition, Swayne D., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V.L., eds. Wiley-Blackwell Publishing, Hoboken, New Jersey, USA.

VANROMPAY D., COX E., VOLCKAERT G. & GODDEERIS B. (1999). Turkeys are protected from infection with *Chlamydia psittaci* by plasmid DNA vaccination against the major outer membrane protein. *Clin. Exp. Immunol.*, **118**, 49–55.

VANROMPAY D., DUCATELLE R. & HAESEBROUCK F. (1992). Diagnosis of avian chlamydiosis; specificity of the modified Gimenez staining on smears and comparison of the sensitivity of isolation in eggs and three different cell cultures. *J. Vet. Med. [B]*, **39**, 105–112.

VANROMPAY D., HARKINEZHAD T., VAN DE WALLE M., BEECKMAN D., VAN DROOGENBROECK C., VERMINNEN K., LETEN R., MARTEL A. & CAUWERTS K. (2007). *Chlamydomphila psittaci* transmission from pet birds to humans. *Emerg. Infect. Dis.*, **13**, 1108–1110.

VANROMPAY D., VAN NEROM A., DUCATELLE R. & HAESEBROUCK F. (1994). Evaluation of five immunoassays for detection of *Chlamydia psittaci* in cloacal and conjunctival specimens from turkeys. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1470–1474.

VERMINNEN K., VAN LOOCK M., HAFEZ H.M., DUCATELLE, R., HAESEBROUCK F. & VANROMPAY D. (2006). Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Chlamydomphila psittaci* antibodies in turkey sera. *Vet. Res.*, **37**, 623–632.

VERMINNEN K., BEECKMAN D., SANDERS N., DE SMEDT S. & VANROMPAY D. (2010). Vaccination of turkeys against *Chlamydomphila psittaci* through optimised DNA formulations and administration. *Vaccine*, **28**, 3095–3105.

ZOCEVIC A., VICARI N., GASPARINI J., JACQUIN L., SACHSE K., MAGNINO S. & LAROUCAU K. (2013). A real-time PCR assay for the detection of atypical strains of *Chlamydiaceae* from pigeons.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la clamidiosis aviar (puede consultarse la lista más actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la clamidiosis aviar.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.