Manual de procedimientos para el diagnóstico de bacterias atípicas en el laboratorio
Edición 2015

Grupo de trabajo Bacterias Atípicas SADEBAC

Coordinadora: María Estela Cadario

Aguerre Lorena
Bacteriología Especial
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
ANLIS -"Dr. Carlos G. Malbrán"
CABA

Cadario María Estela
Bacteriología Clínica
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
ANLIS -"Dr. Carlos G. Malbrán"
CABA

Cudmani Norma
Laboratorio de Salud Pública
Hospital Nestor Kirchner
San Miguel de Tucumán

Cuffini Cecilia
Lab. de Chlamydias y virus Papiloma humano. **Instituto de Virología "Dr** J.M.Vanella"-
Córdoba

Frutos María Celia
Lab. de Virus Linfotrópicos Humanos
Instituto de Virología "Dr. JM. Vanella"-
Córdoba

García Miriam Gabriela
Virología Infectología y Banco de sangre
Hospital General de agudos " Pedro Fiorito"
Buenos Aires

Origlia Javier A
Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
La Plata

Pérez María Celeste
Cultivo de Tejidos
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
ANLIS -"Dr. Carlos G. Malbrán"
CABA

Venuta María Elena
Laboratorio de ***Microbiología***
Hospital de Pediatría " Dr. Juan P Garrahan"
CABA

Capitulo 1

Legionelosis

Lic. Lorena Aguerre
(laguerre@anlis.gov.ar)

INDICE

Introducción 3
Agente etiológico 3
Ecología 3
Epidemiologia y transmisión 3
Periodo de incubación 4
Grupo de riesgo 4
Tratamiento 4-5
Clasificación de los casos según la relación epidemiológica 5
Casos agrupados 5
Casos relacionados 5
Casos esporádicos o aislados 5
Clasificación de los casos según el ámbito de aparición 5
Caso nosocomial 5
Caso asociado a viaje 5
Caso comunitario 5
Clasificación de casos asociados a viajes según su relación con alojamientos turísticos 6
Casos asociados 6
Casos esporádicos 6
Definición de casos 6
Criterios para el diagnostico de laboratorio 6
Caso sospechoso 6
Caso confirmado 6-7
Diagnostico y servicio de laboratorio 7
Características metodológicas de diagnostico para la detección de *Legionella* spp. 8
Procesamiento de especímenes 9
Espécimen 9-10
Transporte de muestras 10
Medios de cultivo 10-11
Medio BCYE 11
Tabla Medio BCYE con agregado de Antibiótico 11
Medio DGVP 11
Solución acida de lavado 12
Procesamiento de muestras 12
Tratamiento de especímenes para el aislamiento de *Legionella* 13
Inoculación de medios de cultivo 13-14
Incubación de cultivos 15
Cultivo e identificación de *Legionella* 15
Algoritmo para la identificación de Legionella 16
Determinación de *Legionella* spp. Por PCR 17-18
Preparación de improntas de *Legionella* para IFI 18-19
Determinación de Antígeno urinario por ELISA 19-20
Instructivo para el envío de muestras 21
Planilla epidemiológica 22-23

Bibliografía 24

Introducción

La enfermedad del legionario fue descripta en 1976 después de un importante brote de neumonía grave entre los asistentes a una convención de la Legión Americana en Filadelfia, Pensilvania. En total, hubo 182 casos que resultaron en 29 muertes y la hospitalización de 147 personas. En 1977, se aisló en el CDC, el agente etiológico responsable del brote y en 1979 fue identificado como un bacilo gram negativo fastidioso que se clasificó como un nuevo género y se denominó *Legionella pneumophila.*
La descripción del agente causal y el desarrollo de medios de cultivos para su crecimiento, permitieron el estudio retrospectivo de los brotes de la enfermedad respiratoria, y el aislamiento ambiental de *Legionella*. Actualmente el término genérico "legionelosis" se utiliza para describir estas infecciones bacterianas, que pueden variar en severidad desde una enfermedad leve, febril (Fiebre de Pontiac) a una neumonía de rápida evolución y potencialmente mortal (enfermedad del legionario). Resulta epidemiológicamente útil, agrupar los casos por la forma en que fueron adquiridos, como casos asociados a la comunidad, intrahospitalarios o asociados a viajes.

Agente Etiológico

El género *Legionella* está constituido por bacilos gram-negativos, no formadores de esporas, no encapsulados, Presentan un tamaño de 0,3 a 0,9 micrones de diámetro y 1,5 a 5 micrones de longitud. Pueden presentar formas filamentosas (de 20 micrones o más) después de cultivo *in vitro.*La familia *Legionellaceae* hasta el momento, está compuesta por más de 20 especies asociadas a enfermedad humana, pero desde el punto de vista clínico las especies más importantes son: *Legionella pneumophila*, *L. micdalei*, *L. longbeachae*, y *L. dumofii. L. pneumophila* es el agente involucrado en más del 90% de los casos de legionelosis. sin embargo, las infecciones causadas por otras especies podrían estar subdiagnosticadas. La especie filogenéticamente más cercana al género *Legionella* es *Coxiella burnetti,* el agente etiológico de la fiebre Q, que comparte muchas características con *L. pneumophila,* incluyendo el parasitismo intracelular y varios genes asociados con la virulencia.

Ecología

El principal reservorio de *Legionella* spp. es el agua y los ambientes hídricos. Numerosos estudios ambientales demostraron la presencia de varias especies de *Legionella*, incluyendo las especies patógenas en humanos, en ecosistemas acuáticos naturales y en fuentes artificiales de aguas templadas, como sistemas de plomería, calentadores, humidificadores, spas y torres de refrigeración.

Epidemiología y transmisión

La transmisión de *Legionella* es aérea y la vía de entrada al organismo humano es a través del sistema respiratorio por inhalación de aerosoles contaminados, pero también puede ser adquirida a través de microaspiración de aguas contaminadas. La transmisión

de persona a persona no se ha demostrado, ni se ha documentado la existencia de reservorios animales.

Periodo de incubación

Legionelosis: El período de incubación es generalmente entre 2-10 días, con un promedio de 5-6 días. El inicio de la neumonía es leve, similar a episodios neumónicos causados por otros organismos. A menudo no hay signos de afección respiratoria en las etapas tempranas de la enfermedad solo se observan síntomas que incluyen fiebre, rigores y mialgias. En el transcurso de la enfermedad aparece una tos no productiva, que sigue por un periodo de 4 a 6 días más, y que cursa con pequeñas cantidades de esputo purulento situación que puede intensificarse si la enfermedad progresa rápidamente. Algunas veces pueden aparecer síntomas no respiratorios tales como nauseas, vómitos, diarrea y delirio. En la enfermedad de los legionarios, las radiografías de tórax muestran zonas irregulares o focales de consolidación, que pueden evolucionar a la afectación bilateral y a la insuficiencia respiratoria.

Fiebre de Pontiac: Posee un corto periodo de incubación de 5 a 6horas y con mayor frecuencia de 24 a 48 horas. La enfermedad comienza con anorexia, malestar general, mialgia y cefalea. En el término de un día suele aparecer fiebre que se eleva rápidamente y se acompaña de escalofríos. La temperatura suele alcanzar de 39ºC a 40,5ºC. Son comunes la tos seca, el dolor abdominal y la diarrea. No ocasiona neumonía o muerte. La enfermedad es autolimitada, los pacientes se restablecen espontáneamente entre los 3 y 5 días sin tratamiento. Este síndrome clínico podría representar más bien una reacción al antígeno inhalado que una invasión bacteriana.

Grupo de Riesgo

La tasa de letalidad de la enfermedad alcanza hasta un 39%; la que en general, es más alta en personas inmunodeprimidas. Existe una propensión a desarrollar la enfermedad más elevada en hombres que en mujeres. Los grupos que tienen un mayor riesgo si se expone a la bacteria *Legionella* incluyen: personas de más de 50 años de edad, fumadores, personas con diabetes, personas con enfermedad pulmonar obstructiva crónica o enfermedad renal y personas con sistemas inmunes debilitados (por ejemplo , debido a cáncer o trasplante de órganos)

Tratamiento

Los agentes antimicrobianos con buena actividad intracellular utilizados para el tratamiento de legionelosis son los macrólidos, tetraciclinas, y las fluoroquinolonas. Actualmente, la utilización de azitromicina y levofloxacina esta respaldada por varios estudios observacionales recientes. La duración de la terapia antibiótica es de 7-10 días para

aquellos individuos que responden positivamente y se recomienda 21 días para pacientes con severa inmunosupresión. Algunos investigadores recomiendan la combinación de dos agentes activos en aquellos pacientes que no responden al tratamiento, sin embargo la efectividad de dichas combinaciones no han sido demostradas.
Otros agentes activos *in vitro*, como los betalactámicos, el cotrimoxazol y los aminoglucósidos, no son eficaces *in vivo* ya que se distribuyen mal intracelularmente o son inhibidos en los macrófagos. La determinación *in vitro* de la susceptibilidad a los antibióticos de *L. pneumophila*, puede arrojar resultados que no tienen una correlación clínica, ya que se trata de un patógeno con localización intracelular en la infección humana. La actividad intracelular de los antibióticos utilizados en el tratamiento de la infección por *L. pneumophila*, no siempre es conocida cuando se trata de infecciones inusuales causadas por otras especies del género *Legionella*.
Sin embargo, las fluoroquinolonas y los macrolidos han sido eficaces en el tratamiento de legionelosis por L*. micdalei, L, longbeacheae* y *L. dumoffii.*

Clasificación de los casos según la relación epidemiológica

• **Casos agrupados (brotes):** Aparición de dos o más casos, ocurridos en un intervalo de tiempo inferior a 6 meses, en personas que hayan frecuentado un mismo lugar en los 2 a 10 días anteriores a los primeros síntomas.

• **Casos relacionados:** Aparición de dos o más casos, ocurridos en un intervalo de tiempo superior a 6 meses, en personas que hayan frecuentado un mismo lugar en los 2 a 10 días anteriores a los primeros síntomas.

• **Caso esporádico o aislado:** Cuando se identifica un caso sin relación epidemiológica con ningún otro.

Clasificación de los casos según el ámbito de aparición

• **Caso nosocomial:** Cuando ocurre en una persona que ha permanecido los 10 días anteriores a la fecha de inicio de los síntomas en un establecimiento hospitalario se considera caso nosocomial confirmado. Si ha ingresado al menos un día en los 2 a 10 días anteriores al inicio de los síntomas se considera como caso nosocomial probable.

• **Caso asociado a viaje:** Cuando ocurre en una persona con antecedentes de haber viajado y pernoctado fuera de casa, una o más noches, en los 2 a 10 días anteriores al comienzo de los primeros síntomas.

• **Caso comunitario:** Cuando la infección se supone adquirida en la comunidad y no está asociada a hospital o viaje.

Clasificación de los casos asociados a viaje según su relación con alojamientos turísticos

• **Casos asociados (cluster) con un alojamiento:** Aparición de dos o más casos que han pernoctado o visitado el mismo alojamiento, en un período de dos años.

• **Casos esporádicos:** Cuando aparece un caso que ha pernoctado o visitado un alojamiento que nunca ha estado asociado con casos de legionelosis, o que el último caso de legionelosis asociado con el alojamiento ha ocurrido hace más de dos años.

Definición de caso

Sospechoso: Caso clínicamente compatible que cumpla al menos uno de los presuntos criterios de laboratorio sospechosos.
Confirmado Caso clínicamente compatible que cumpla al menos uno de los criterios de laboratorio confirmatorio.

Criterios para el diagnostico de laboratorio

1) **Sospechoso**

Compatible con la definición clínica de caso y/o resultado positivo en alguna de las siguientes pruebas de laboratorio, que se consideran presuntivas:

-Título alto (>1:256) de anticuerpos frente a *L. pneumophila* serogrupo 1 en un suero tomado en la fase convaleciente.

-Seroconversión (aumento del título de anticuerpos en cuatro veces o más, con un segundo título mínimo de 1:128), frente a cualquier especie o serogrupo de *Legionella pneumophila*, por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad (separados al menos 2-6 semanas).

Por seroconversión: cuadruplicada o aumento del título de anticuerpos para múltiples especies de *Legionella* usando un pool de antígenos.

Por detección de ácidos nucléicos de *Legionella* sp por PCR

2) **Confirmado**

Compatible con la definición clínica de caso y cualquiera de los diagnósticos microbiológicos considerados de confirmación:

Aislamiento de cualquier especie o serogrupo de *Legionella* a partir de secreciones respiratorias, tejido pulmonar, sangre u otros fluidos normalmente estériles.

Seroconversión (aumento del título de anticuerpos en cuatro veces o más, con un segundo título mínimo de 1:128) frente a *L. pneumophila* por inmunofluorescencia indirecta, en sueros tomados en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad.

Demostración de antígeno de *Legionella pneumophila* serogrupo 1, en orina por ELISA o RIA.

Diagnostico y Servicio de Laboratorio

Los métodos de laboratorio para el diagnóstico de legionelosis incluyen: Cultivo y aislamiento de la bacteria en medio sólido (método de referencia o *gold standard)*, identificación por espectrometría de masas. Detección de seroconversión en el titulo de anticuerpos de sueros correspondientes a la etapa aguda y de convalecencia, detección de antígeno urinario, detección de ADN de *Legionella* spp. por PCR y detección del microorganismo en tejidos o fluidos corporales por **inmunofluorescencia** directa. En la siguiente tabla se detallan las características de cada metodología.

Características metodológicas diagnosticas para la detección de *Legionella* spp.

Método	Tiempo de realización	Tipo de muestra	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	observaciones
Cultivo	3-7 días	STRI	10-80	100	Se debe confirmar la identificación de las colonias sospechosas. Detecta todas las especies y serogrupos
		sangre	< 10	100	Muy baja sensibilidad
Detección de antígeno urinario	1 hora	orina	70-80	>99	Solo detecta *L.pneumophila* serogrupo 1
Serología (Seroconversión)	3-10 semanas	suero	60-80	>95	Algunos equipos comerciales solo permiten detectar *L. pneumophila*
Inmunofluorescencia directa (IFD)	4 horas	STRI	25-70	>95	Prácticamente en desuso
PCR	4 horas	STRI	80-100	>90	No existen aun metodologías validadas
		sangre	30-50	>90	

PROCESAMIENTO DE ESPECIMENES

Cuando en una muestra clínica se investiga la presencia de *Legionella* se debe:

1. Evaluar el volumen de muestra recibido
2. Se aconseja priorizar el cultivo antes de otras determinaciones, las que se realizarán dependiendo de la cantidad de muestra recibida.

ESPECIMEN

A. Cantidad mínima de muestra requerida para el estudio.

1. Tejidos: Una muestra de no menos de 50 mg de material tisular es satisfactoria

2. Muestras no tisulares: Volumen mínimo de muestra 600 µl

B. Muestras Aceptadas

Esputo	*Esputo obtenido por expectoración*: Evaluar la calidad de la muestra (Volumen mínimo 600 µl) y seleccionar el mejor material para estudio según los siguientes criterios, si varios esputos del mismo paciente fueron remitidos en la misma fecha. - Primera expectoración de la mañana - Sanguinolento - Purulento - Observación microscópica: escasos microorganismos y numerosos polimorfonucleares
	Esputo obtenido por aspiración: Todas las muestras deben ser estudiadas
Aspirados	Nasotraqueal Endotraqueal Transtraqueal Punción percutánea de pulmón Endobronquial
Especimenes tomados con broncoscopio	Lavado bronquial Cepillado Biopsia
Biopsia	Transbronquial Por cirugía a cielo abierto Otras (Ej. Renal, hepática, etc.)

Fluidos	LCR Pericárdico Peritoneal Pleural
Heridas o materiales de absceso	Aceptado si el cultivo para gérmenes comunes es negativo
Válvulas cardíacas protésicas	
Necropsias	Pulmón Otros tejidos
Cortes de tejidos embebidos en parafina	Cortar los tejidos tan delgados como sea posible (<4 um) Fijar los cortes a 58º- 60ºC durante 15 min. Desparafinar por dos pasajes a través de xileno, seguido de dos lavados a través de alcohol absoluto y agua

Otros especimenes no listados: Consultar con el laboratorio previamente

Transporte de la muestra

Transportar los especimenes en recipientes estériles.
Agregar un pequeño volumen de agua destilada estéril, no bacteriostática, si es necesario, para evitar la desecación.
Refrigerar las muestras que no pueden ser procesadas dentro de los 30 minutos. Si el procesamiento se demora más de 24 horas, congelar el espécimen a -70ºC.

MEDIOS DE CULTIVO

BCYE Medio tamponado extracto de levadura, carbón, suplementado con pirofosfato férrico y α-cetoglutarato. Conservar de 2 a 8ºC.

Composición

Buffer ACES

Ácido [N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico]	10.00 g
KOH	2.80 g
Carbón activado	1.50 g
Extracto de levadura	10.00 g
Agar	17.00 g
A-cetoglutarato (sal monopotásica)	1.00 g
Clorhidrato de L-cisteína disuelto en10 ml de H_2O	0.40 g
Pirofosfato férrico disuelto en 10 ml de H_2O	0.25 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Preparación

Esterilizar la L-cisteína y el pirofosfato férrico por filtración.
Disolver el buffer ACES en 900 ml de agua destilada a 50ºC.
Agregar el KOH, el carbón activado, el extracto de levadura y el α-cetoglutarato y mezclar bien.
Agregar 80 ml de agua destilada por las paredes del frasco.
Autoclavar a 121ºC, durante 15 minutos.
Enfriar a 50ºC.
Agregar 10 ml de las soluciones de L-cisteína y de pirofosfato férrico para completar un volumen de 1 litro.
Ajustar a pH 6.9
Verter en placas y conservar en bolsas plásticas selladas hasta 4 meses a 4ºC.

Medio BCYE con el agregado de antibióticos (BCYE +V)

Preparación

Preparar un litro de medio BCYE con los suplementos como se describió anteriormente.
Agregar antibióticos.
Sulfato de polimixina 80.000 U
Ajustar a pH 6.9
Conservar hasta 1 mes en bolsas plásticas a 4ºC.

Medio Wadoswsky-Yee modificado (DGVP)

Composición

Buffer ACES

Ácido [N-(2-acetamido)-2-aminoetanosulfónico]	10.00 g
KOH	2.90 g
Carbón activado	1.50 g
Extracto de levadura	10.00 g
Agar	17.00 g
A-cetoglutarato (sal monopotásica)	1.00 g
Clorhidrato de L-cisteína disuelto en 10 ml de H2O	0.40 g
Pirofosfato férrico disuelto en 10 ml de H2O	0.25 g
Agua destilada c.s.p.	1000 ml
Sulfato de polimixina	50.000 U
Hidrocloruro de vancomicina	1.00 mg
Glicina	3.00 g
Azul de bromotimol	10.00 mg
Púrpura de bromocresol	10.00 mg

Preparación

Preparar todos los ingredientes como se describió para el medio BCYE.
Autoclavar a 121ºC durante 15 minutos, dejar enfriar y agregar los ingredientes esterilizados por filtración.
Conservar las placas a 4ºC en bolsas plásticas selladas hasta 1 mes.

Solución ácida de lavado

Conservación a temperatura ambiente. Duración 1 año.

Preparar 0.2 N HCl. Agregar 2.0 ml de HCl 1N a 8.0 ml de agua destilada.
Preparar 0.2 N KCl. Disolver 1.5 g de KCl en 100 ml de agua destilada.

Solución de trabajo

0.2 N HCl	5.3 ml
0.2 N KCl	25.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

Mezclar los ingredientes y mezclar el pH. Ajustar el pH a 2.2 con HCl.
Esterilizar la solución de trabajo por filtración y fraccionar en alícuotas de 0.9 ml en tubos estériles. Agregar 5 o 6 perlas de vidrio. Utilizar técnica estéril.

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Procesamiento inicial del espécimen

Documentar la siguiente información:
- Datos del enfermo
- Fecha y hora en que fue tomada la muestra
- Resúmen de historia clínica

Colocar la muestra a 4ºC, antes de su procesamiento y mantenerla a la misma temperatura durante 7 días. Congelar el espécimen a -70ºC, si el ensayo directo (IFD) no se realiza dentro de las 24 horas de su recolección.

La prueba de detección directa y el cultivo deben realizarse sobre el mismo material

Si el volumen de muestra es insuficiente para cultivo e IFD, realizar el primero e informar al médico, material escaso para ensayo directo

TRATAMIENTO DE ESPECIMENES PARA EL AISLAMIENTO DE *Legionella*

Espécimen	Dilución
Siembra directa	
Aspirado transtraqueal	1:5
Aspirado bronquial con cepillo protegido	1:5
Aspirado pulmonar	1:5
Biopsia pulmonar	disgregar y dilución 1:5
Líquido pleural	centrifugar si > 1ml
LCR	centrifugar si > 1ml

Espécimen	Dilución
Siembra directa y posterior tratamiento ácido	
Esputo	1:10
Aspirado endo y nasotraqueales	1:10
Lavado bronquial y líquido de lavado	centrifugar si > 1ml
Cepillado bronquial	homogeneizar y centrifugar
Biopsia transbronquial	disgregar y dilución 1:10
Material de autopsia	disgregar y dilución 1:10

Inoculación de los medios de cultivo

Los medios deben estar a temperatura ambiente previo a la inoculación

Para especimenes normalmente contaminados: esputo, aspirados endo o nasotraqueales, lavado o cepillado bronquial, biopsia transtraqueal o material de autopsia.

Utilizar los siguientes medios: Agar sangre: 1 placa
Medio BCYE: 2 placas
Medio (BCYE +V): 2 placas
Medio selectivo (DGVP): 2 placas

Decontaminación del espécimen

Preparar una dilución 1:10 del espécimen en solución ácida
Agregar 0.1 ml del espécimen a un tubo con 0.9 ml de la solución ácida y perlas de vidrio.
Homogeneizar con vórtex por aproximadamente 5 segundos.
Incubar durante 4 min. a temperatura ambiente.
Después de incubar, sembrar inmediatamente en BCYE, BCYE +V y DGVP.

Centrifugar lavado bronquial y líquidos de lavado a 1500 rpm durante 15 min.
Separar el sobrenadante dejando sólo 2.0 ml. Conservar.
Homogeneizar el tubo original con vórtex durante 5-10 segundos hasta resuspender el sedimento

Preparar una dilución 1:10 del espécimen en MHB
Colocar 0.1 ml del espécimen en un tubo conteniendo 0.9 ml de caldo MH y perlas estériles.
Homogeneizar el tubo original con vórtex durante aproximadamente 5 segundos.
Los especimenes como el lavado broncoalveolar no necesitan ser diluidos.

Inocular los siguientes medios con pipeta Pasteur: Agar sangre: 1 gota (0.03 ml)
BCYE: 3 gotas (0.1 ml)
BCYE +V: 3 gotas (0.1 ml)
DGVP: 3 gotas (0.1 ml).
Sembrar en aislamiento

<u>Para aspirado transtraqueal, aspirado bronquial con cepillo protegido y aspirado del pulmón percutáneo</u>

Usar los siguientes medios: Agar sangre: 1 placa
BCYE: 1 placa
BCYE +V: 1 placa
DGVP: 1 placa

Preparar diluciones 1:5 del espécimen.
Retirar la mitad de caldo del tubo que contiene 0.9 ml de MH con las perlas de vidrio.
Agregar con pipeta aproximadamente 0.1 ml del espécimen.
Homogeneizar con vórtex durante aproximadamente 5 segundos.
Inocular los medios como se describe anteriormente.

<u>Para biopsia de pulmón y bronquial</u>

Usar los siguientes medios: Agar sangre: 1 placa
BCYE: 1 placa
BCYE +V: 1 placa
DGVP: 1 placa

<u>Para biopsia transbronquial</u>

Usar los siguientes medios: Agar sangre: 1 placa
BCYE:2 placas
BCYE +V: 2 placas
DGVP: 2 placas

Disgregar tejido, cortándolo en pequeños trozos.
Agregar 1 ml de caldo MH y volver a disgregar.
Agregar 0.2 ml del homogenato a un tubo con 0.9 ml de caldo MH.
Homogeneizar con vórtex por aproximadamente 5 segundos.
Inocular los medios como se indicó anteriormente.

<u>Para líquido pleural y LCR</u>

Usar los siguientes medios: Agar sangre: 1 placa
BCYE: 1 placa
BCYE +V: 1 placa

DGVP: 1 placa

Colocar el espécimen en tubo estéril de centrifuga de 15 ml.
Centrifugar a 1500 x g durante 15 min.
Descartar el sobrenadante a un segundo tubo dejando 2.0 ml y conservar.
Homogeneizar con vórtex el tubo original durante 5-10 segundos, resuspendiendo el sedimento.
Inocular los medios como se indicó anteriormente.

Incubación

Incubar placas inoculadas en las siguientes condiciones: Agar sangre: 35ºC en CO_2
BCYE : 35ºC en CO_2
BCYE +V: 35ºC en CO_2
DGVP: 35ºC en CO_2

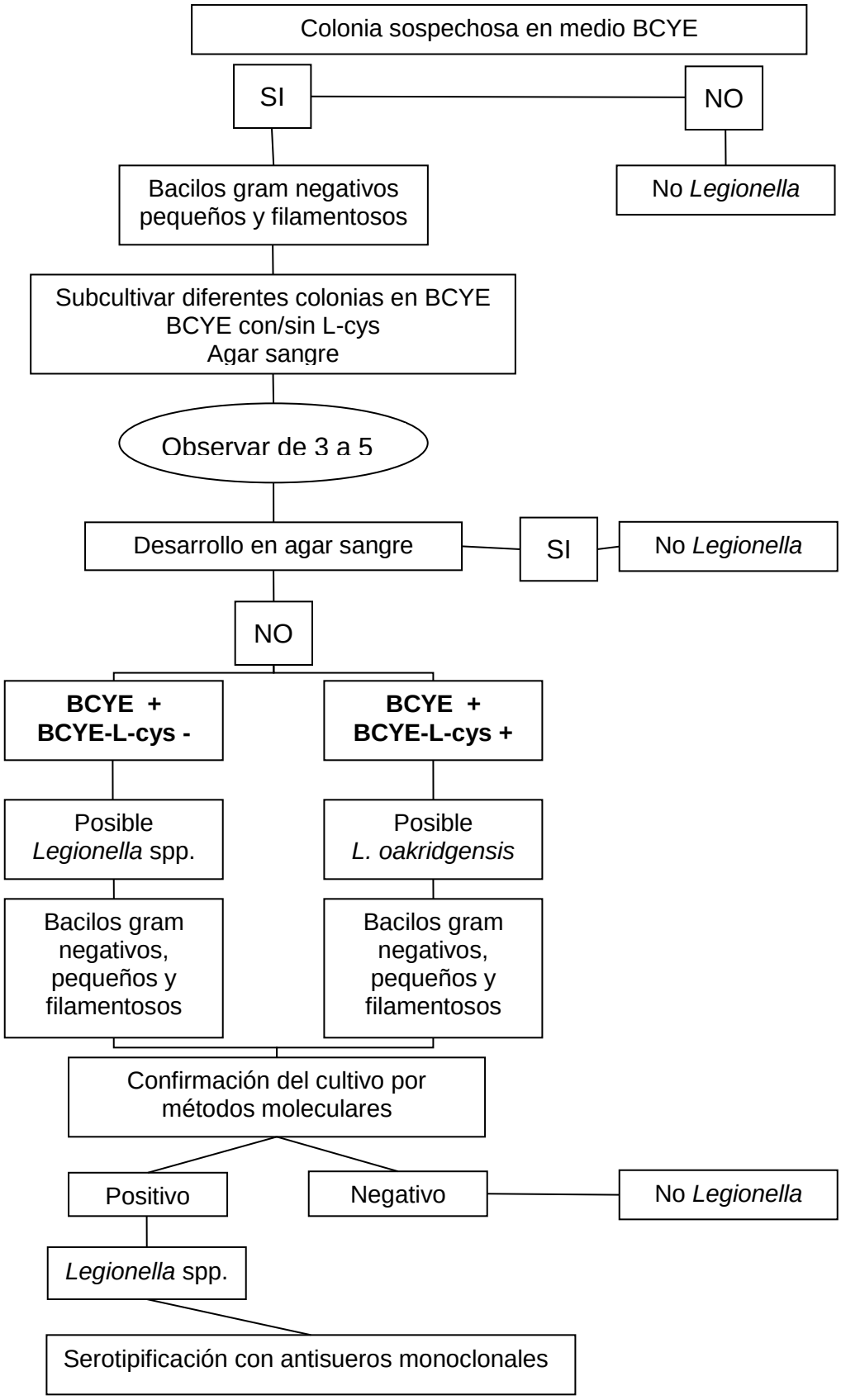
Cultivo e identificación de *Legionella* spp.

En el laboratorio clínico, *Legionella* spp. es presuntivamente identificada a nivel de género por su desarrollo y características culturales en agar BCYE u otro medio conteniendo L-cisteina y sales de hierro y falta de desarrollo en medios carentes de estos ingredientes.

Recomendaciones

Incubar los medios con humedad durante 14 días.
Examinar las placas cada 48 horas con microscopio de disección y realizar coloración de Gram de cualquier colonia sospechosa.

ALGORITMO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Legionella* spp.



Determinación de *Legionella* spp. por PCR

Extracción de DNA a partir de muestras respiratorias y cultivos

Preparación de la muestra

Centrifugar 1ml de muestra a 2000 X *g* durante 5 minutos.
Descartar el sobrenadante y llevar a volumen con PBS o agua estéril antes de la extracción de DNA. Diluir las muestra heterogéneas con buffer PBS y homogeneizar con vortex.
Alicuotar 1ml del homogeneizado para el análisis.

Extracción de DNA

Extraer el DNA utilizando un equipo de extracción comercial para muestras de tejido según las instrucciones del fabricante para muestras de tejidos.
El DNA extraído puede ser inmediatamente utilizado para la amplificación o puede ser conservado hasta 6 meses a -20ºC.

Controles

Utilizar controles positivos y negativos, preparados previamente y congelados, que se incluyen en el procedimiento de extracción.

Control positivo: Dilución en agua de aproximadamente 10 a 100 UFC de *Legionella pneumophila* ATCC 33152.

Control negativo: 20 µl de una muestra de lavado broncoalveolar negativa por cultivo y PCR para *Legionella.*

Amplificación del DNA

Oligonucleótidos: Los oligonucleótidos que se utilizan en la reacción de PCR amplifican un fragmento de 386 pb del gen 16S rDNA.

El oligonucleótido p1.2 (5´-AGGGTTGATAGGTTAAGAGC) se localiza en la posición 451 a 470 y el cp2.3 (5´-CCAACAGCTAGTTGACATCG) es complementario de las posiciones 836 a 817.

Reactivos

Reactivos	Volumen/ Volumen final
H_2O	26.7 µl
Buffer 10X	5 µl
$MgCl_2$ 50 mM	1.5 µl
dNTP	1 µl
Primer p1.2	5 µl
Primer cp2.3	5 µl
Taq DNA polimerasa	0.8 µl
Templado	5 µl
Volumen final	50 µl

Programa de amplificación

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95ºC	5 min
40 ciclos de:		
desnaturalización	94ºC	1 min
annealing	57ºC	1.5 min
extensión	72ºC	1 min
Extensión final	72ºC	10 min

Detección de los productos de amplificación

Electroforesis en gel de agarosa

Colocar 10 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 89 mM EDTA (pH 8.0).

El tamaño del fragmento de DNA es de 386 pb y se estima por comparación con marcadores de peso molecular.

Referencia: Cloud J, Carroll K, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation. 2000. J Clin Microbiol, 38: 1709-12

Preparación de improntas de *Legionella*.

Emulsificar las colonias en formol neutro al 10% esterilizado por filtración hasta una densidad correspondiente al 1 de la escala de McFarland.
Diluir 1:100 la suspensión anterior con formalina neutra 10%.
Colocar una gota de la suspensión diluida en un pocillo del portaobjetos.
Secar al aire.

Reactivos

Solución Salina buferada (PBS) pH 7.5
Solución Stock

Na_2PO_4 (anhidro grado reactivo)	13.8 g
NaH_2PO_4. H_2O	1.8 g
NaCl	85.0 g
H_2O c.s.p	1000.0 ml

Vencimiento 1 mes. Conservar a 2 a 8 ºC.

Solución de Trabajo (pH 7.5) 0.01 M; 0.85% NaCl

Solución stock	100.0 ml
Agua destilada c.s.p	1000.0 ml

Formalina Neutra

KH_2PO_4 (o NaH_2PO_4. H_2O)	4.0 g
Na2HPO4	6.5 g
Solución de formaldehído	100.0 ml
Agua destilada c.s.p	900.0 ml

Resultados

La condición de fuente de luz del microscopio óptico y el tipo determinarán la intensidad de fluorescencia en general y los títulos de punto final.
Leer pocillos de control primero para asegurar una interpretación correcta.

Lectura de los pocillos

Leer la intensidad de la fluorescencia de la siguiente manera

2 a 4+	Moderada a intensa fluorescencia verde manzana
1+	Fluorescencia definida pero tenue
Negativo	No fluorescencia

Protocolo para la determinación de Antígeno urinario para *Legionella* método ELISA

1). Antes de usar, todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente.
El buffer de lavado (20X), puede precipitado debido al frio. Para volver a la solución se debe dejar a temperatura ambiente. Es importante que para su uso el buffer este en estado de solución. Para diluir el buffer de lavado agregar al frasco 475 ml de ADDD.

2). Retirar tantos pocillos como se necesiten, más 2 para los controles
3). Adicionar 100 ul de control negativo en el primer pocillo
4). Adicionar 100 ul del control positivo en el segundo pocillo
5). Adicionar 100 ul de muestra el siguiente pocillo.
6). Incubar los Pocillos por 30 minutos a temperatura ambiente (15-25 Cº)
7). Lavar los Pocillos con el buffer 1X llenando y vaciando al menos 3 veces y secarlos 8). golpeando vigorosamente contra papel absorbente.
9).Agregar 2 gotas del conjugado por cada pocillo, incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
10). Lavar como en el punto 8
11). Agregar 2 gotas del cromógeno en cada pocillo incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. NO LAVAR
12). Agregar 2 gotas de solución STOP en cada pocillo. Tapar los pocillos con papel parafinado y mezclar por inversión.
13).Leer los resultados en lector de ELISA.

Resultados

Positivo: pocillo coloreado en amarillo
Negativo: pocillo sin color
Ambos pocillos deberán ser comparados contra el control negativo.

Interpretación de los resultados con lector de ELISA

Leer los pocillos con 450 nm y 620-650 nm

Positivo: Absorbancia mayor o igual a 0.15 OD
Negativo: lecturas menores a 0.15 OD

Instructivo general de envío de muestras para diagnostico de *Legionella* spp.

Consideraciones generales

Toda muestra remitida deberá estar acompañada de los siguientes datos:

Institución que deriva la muestra.

Resumen de historia clínica.

Profesional que deriva la muestra

e-mail y/o Teléfono de contacto del profesional que solicita el estudio.

Criterios generales para el rechazo de muestras

Se debe rechazar cualquier muestra en la que se observen las siguientes incidencias:

1. Defectos en la identificación de la muestra: etiquetado inadecuado o erróneo, o cumplimentación incorrecta de la información de envío requerida.

2. Muestras enviadas erróneamente, por ejemplo orina con una petición de esputo, o esputos con petición de antígeno.

3. Mal estado de conservación de la muestra: temperatura inadecuada, muestras en medio no apropiado, mala conservación (biopsias secas).

4. Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado

Sueros Para la realización de la técnica de IFI en suero se requiere un mínimo de 1ml del mismo obtenido de sangre por punción venosa, que debe mantenerse refrigerado a –20ºC hasta ser remitida al laboratorio de referencia. Enviar sueros pareados obtenidos como mínimo 2 y como máximo 6 semanas entre cada extracción. Los sueros pueden remitirse por separado, posterior al momento de extracción.	**Criterios de Rechazo de muestra:** El envío de un solo suero. Sueros sin refrigeración sueros hemolíticos o hiperlipémicos
Orina Para esta determinación se requiere al menos 20 ml de orina, preferentemente la primera de la mañana que se debe mantener a 4ºC hasta la recepción en el laboratorio de referencia.	**Criterios de Rechazo de muestra:** Muestras mal etiquetadas o recogidas en contenedores no estériles, muestras con volumen insuficiente para realizar la determinación.
cultivo y PCR **Secreciones respiratorias contaminadas**: esputo expectorado y muestras del tracto respiratorio inferior con microbiota del tracto respiratorio superior, como aspirados bronquiales o transtraqueales, y lavados o cepillados bronquiales. **Secreciones respiratorias no contaminadas**: muestras del tracto respiratorio inferior no contaminadas, como las obtenidas mediante cepillo telescopado y aspirado pulmonar transparietal. Tejidos: tejido pulmonar obtenido en biopsia o necropsia, o tejido de otros órganos. Otras muestras menos frecuentes: líquido pleural, LCR, sangre. **Transporte me muestras** Transportar los especímenes en recipientes estériles Agregar un pequeño volumen de solución fisiológica estéril, si es necesario para evitar la desecación. Enviar las muestras refrigeradas a 4 ºC . En caso de tejidos enviar no menos de 50mg de muestra. En caso de líquidos enviar no menos de 600 ul	**Criterios de Rechazo de muestra:** Defectos en la identificación de la muestra: Muestras enviadas erróneamente Mal estado de conservación de la muestra: Muestras derramadas por envase inadecuado o mal cerrado. Muestras sin refrigerar.

Ficha epidemiológica Legionelosis

1. DATOS DEL PACIENTE			
Nombre y Apellido			
DNI			
Domicilio real (Calle, Nº, localidad, Provincia)			
Sexo	F	M	Edad
Ocupación			
Empresa o Institución			
Medico tratante			
Email de contacto			
Teléfono de contacto			
2. INFORMACIÓN CLÍNICA			
2.1 FECHA INICIO DE LOS SÍNTOMAS			
2.2 FECHA DEL DIAGNÓSTICO			
2.3. DURACIÓN DE LA ENFERMEDAD (DÍAS)			
2.4 SIGNOS Y SINTOMAS			**OBSERVACIONES**
Fiebre (especificar pico febril ºC)	si	no	
Tos productiva (especificar fecha inicio)	si	no	
Tos no productiva	si	no	
Mialgias	si	no	
2.5 ANTECEDENTES			
Enfermedad hepática crónica	si	no	
Enfermedad o terapia inmunosupresora	si	no	
Diabetes	si	no	
Enfermedad pulmonar crónica (especificar)	si	no	
Tabaquismo	si	no	
2.6 DATOS CLÍNICOS			
Neumonía	si	no	
Hallazgos radiológico (completar)			
Hospitalización	si	no	
Hospital			
Fecha internación			
Fecha alta			
Estadía en unidad de cuidados intensivos	si	no	
Asistencia respiratoria mecánica y/o intubación	si	no	
Evolución			
Obito (especificar fecha y lugar)	si	no	

3. DATOS EPIDEMIOLÓGICOS			
Realizó viajes fuera del país durante el útimo mes?	si	no	
Especificar lugares de tránsito y destino y fechas			
Alojamiento de al menos una noche fuera de su domicilio durante los 10 días previos a la aparición síntomas (especificar fecha y lugar)	si	no	
Hospitalizado al menos 48 hs antes del inicio de síntomas (especificar fecha y locación)	si	no	
Visitó o trabajó en instituciones nosocomiales durante el período de exposición (especificar locación y fecha)	si	no	
Estuvo expuesto a fuentes, spas, humidificadores durante las dos semanas previas al inicio de los síntomas	si	no	
Estuvo expuesto a ambientes acuáticos recreacionales durante las dos semanas previas al inicio de los síntomas	si	no	
Estuvo expuesto a tierra (jardinería, construcción, producción, etc)	si	no	
4. TRATAMIENTO PROFILACTICO (indicar drogas, duración y dosis)			
5. TRATAMIENTO INDICADO (indicar drogas, duración y dosis)			
6. ESTUDIOS DE LABORATORIO SOLICITADOS			
Antígeno urinario	Si	No	
Cultivo	Si	No	
Detección de seroconversión	Si	No	
Detección de ADN de *Legionella* sp	Si	No	
7- MUESTRAS ENVIADAS AL LNR			
ORINA (especificar fecha de toma de muestra)			
Material respiratorio (especificar tipo de material y fecha de toma muestra)			
Suero fase aguda (especificar fecha de toma de muestra)			
Suero fase convaleciente (especificar fecha de toma de muestra)			

Bibliografia

Bartlett JG, Breiman RF, Mandell LA, File TM. Community-acquired pneumonia in adults: guidelines for management. The Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 1998; 26:811-838

Bartram J, Chartier Y, Lee JV, Pond K, Surman-Lee S. Legionella and the prevention of legionellosis. Geneva:WHO Press; 2007.

Boshuizen HC, Neppelenbroek SE, van Vliet H, Schellekens JF, den Boer JW, Peeters MF, et al. Subclinical Legionella infection in workers near the source of a large outbreak of legionnaires disease. J Infect Dis 2001; 184:515-518.

Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin Microbiol Rev 2002; 15:506-526.

Formica N, Yates M, Beers M, Carnie J, Hogg G, Ryan N, et al. The impact of diagnosis by legionella urinary antigen test on the epidemiology and outcomes of Legionnaires' disease. Epidemiol Infect 2001; 127:275-280.

Gutierrez F, Oritz V, Martinez C, Masia MM, Chiner E, Calpe JL. Legionnaires' disease in patients with human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 1995; 21:712-713

Diederen BM. Legionella spp. and Legionnaires' disease. J Infect 2008; 56:1-12.

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR. Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. N Engl J Med 1977; 297:1197-1203.

Messi P, Bargellini A, Anacarso I, Marchesi I, de Niederhausern S, Bondi M. Protozoa and human macrophages infection by Legionella pneumophila environmental strains belonging to different serogroups. Arch Microbiol 2013; 195:89-96.

Mykietiuk A, Carratala J, Fernandez-Sabe N, Dorca J, Verdaguer R, Manresa F, et al. Clinical outcomes for hospitalized patients with Legionella pneumonia in the antigenuria era: the influence of levofloxacin therapy. Clin Infect Dis 2005; 40:794-799

Plouffe JF, Breiman RF, Fields BS, Herbert M, Inverso J, Knirsch C, et al. Azithromycin in the treatment of Legionella pneumonia requiring hospitalization. Clin Infect Dis 2003; 37:1475-1480.

Sabria M, Pedro-Botet ML, Gomez J, Roig J, Vilaseca B, Sopena N, et al. Fluoroquinolones vs. macrolides in the treatment of Legionnaires' disease. Chest 2005; 3:1401-1405.

Uldum SA, Molbak K. Marre R, et al. PCR as a routine method for diagnosis of Legionnaires' disease. Legionella. Washington, DC:ASM Press; 2002. 213-215

Cloud J, Carroll K, Pixton P, Erali M, Hillyard DR. Detection of *Legionella* Species in Respiratory Specimens Using PCR with Sequencing Confirmation. 2000. J Clin Microbiol, 38: 1709-12

Eldestein,P.Detection of Antibodiesto Legionella in the manual of clinical Immunology. Rose, N,E de Macario, J fahey, H Friedman, G Penn (eds) 4th Ed 1992.

Capítulo 2

Mycoplasma pneumoniae

Bioq. María Estela Cadario
(mec135@yahoo.com.ar)

Bioq. Maria Elena Venuta
(mevenuta@yahoo.com.ar)

INDICE

Agente etiológico....27
Patogenia....27
Manifestaciones clínicas....27
Métodos diagnósticos....28
Métodos moleculares....28
Anexo toma de muestra....29
Enfermedades respiratorias....29
Enfermedades extrapulmonares....29
PCR anidada para detectar ADN de *Mycoplasma pneumoniae*....30
Aparatos de materiales fungibles....30
Solución tamponada de lisis....30
Preparación....30
Preparación de solución de trabajo de los cebadores....31
Preparación de mezclas de nucleótidos....31
Preparación de solución tamponada TAE....31
Microorganismos y ácidos nucleicos de referencia....31
Extracción de ADN....32
Procedimiento preliminar....32
Procedimiento de extracción....32
Condiciones de ciclado para PCR anidada....32-33
PCR simple B-actina humana....33
Secuencias....33
Procedimiento para la PCR B-actina humana....34
Mix de PCR B-actina....34
Lectura de resultados....34
Detección ed Anticuerpos de clase IgM para *Mycoplasma pneumoniae por inmunofluorescencia*....35
Precipitación de IgG y factor reumatoideo....35
Reacción de inmunofluorescencia....35
Resultados e Interpretación....35
Ficha acompañante *M. pneumoniae y C. pneumoniae*....36-37

Bibliografía....38-39

AGENTE ETIOLOGICO

Mycoplasma pneumoniae es una bacteria aerobia estricta, que tiene como único hospedero el ser humano. Pertenece a la clase ***Mollicutes***, familia ***Mycoplasmataceae***, género Mycoplasma .Como rasgos característicos de esta clase, son pleomórficos, de dimensiones pequeñas, con un genoma también pequeño, por lo que tiene una capacidad metabólica limitada y depende del hospedero para adquirir nutrientes. Son autoreplicativos y carecen de pared celular lo que le otorga las características de:

- No reaccionar a la coloración de Gram
- Resistencia a antibióticos betalactámicos y glicopéptidos
- Sensibilidad a variaciones de pH, temperatura, detergentes, etc

PATOGENIA

La transmisión es de persona a persona a través de aerosoles esparcidos por la tos y la necesidad de un contacto estrecho y continuado hace que las infecciones se den con mayor frecuencia en el ámbito familiar, guarderías o colegios.

Si bien se trata de un patógeno eminentemente extracelular, su supervivencia depende de una asociación íntima con las células del huésped, y ello esta mediado fundamentalmente a través de **la citoadhesina P1** y otras proteínas accesorias.

El daño celular ocurre sobre el epitelio de bronquios y bronquiolos por acumulación de peróxido de hidrógeno y radicales superoxidos producidos durante su metabolismo celular, ocasionando ciliostasis y destrucción del epitelio con inflamación peribronquial y perivascular.

Recientemente se ha reportado que en estos eventos patogénicos también participa una citotoxina conocida como **CARDS TX** *community-acquired respiratory distress syndrome* que la bacteria expresa como factor de virulencia. Dicha toxina es sintetizada in vivo, posee epitopes altamente inmunogénicos y exibe actividades biológicas específicas incluyendo la ribosilacion de ADP y vacuolizacion, induciendo una importante respuesta inflamatoria celular.

MANIFESTACIONES CLINICAS

Comienzo insidioso, gradual e inespecífico, con compromiso del estado general y sin hallazgos patognomónicos en la radiografía de tórax, por lo que es importante realizar diagnóstico diferencial de otras bacterias atípicas y virus respiratorios.

La presentación clínica varía según la edad, por lo que en niños menores de 5 años la neumonía es rara, siendo mas frecuentes los síntomas respiratorios altos y sibilancias, taquipnea, vómitos, coriza y coinfecciones virales. En niños mayores de 5 años son más frecuentes las neumonías y bronconeumonías con afección de varios lóbulos.

Si bien por lo general es de curso leve y autolimitado, revisten riesgo de compromiso pulmonar grave en pacientes con: Síndrome de Down, Anemia Falciforme, inmunosupresión y con infecciones concomitantes.

METODOS DIAGNÓSTICOS

Cultivo: tiene 100% de especificidad, pero es lento (t= 3 semanas), complejo y los requerimientos de esta bacteria hacen que su sensibilidad sea extremadamente baja (<60%). No obstante, la recuperación del microorganismo es escencial para realizar estudios epidemiológicos y de sensibilidad antibiótica, aunque reservada para laboratorios de referencia.

Detección de antígenos: es poco sensible e incluso produce reacciones cruzadas (Falsos resultados negativos y positivos)

Detección de anticuerpos: La detección de anticuerpos de clase IgM (**IFI, EIA**) es la única permitida con fines diagnósticos. Tiene valor diagnóstico presuntivo en adultos y niños. Es útil como tamizaje en estudios de brotes en comunidades cerradas. Presentan los siguientes inconvenientes:

- ✓ Pacientes inmunodeprimidos a veces no pueden generar una respuesta inmunológica medible.
- ✓ En adultos, la exposición repetida puede anular la respuesta inmune a IgM, mostrando resultados falsamente negativos y cuando hay respuesta la IgM puede persistir por meses o años generado falso resultados positivos.
- ✓ En pediatría la determinación de IgM tendría una buena correlación con infección aguda por *M. pneumoniae*, aunque solo ocurre en el 50% de los casos y también se eleva en enfermedades del colágeno. Además puede no aparecer hasta 2 semanas del comienzo de los síntomas, dificultando el diagnóstico

M**étodos moleculares**: son rápidos, altamente específicos y sensibles, detectan ADN o ARN de *M. pneumoniae* en muestras clínicas por PCR simple, PCR anidada simple, PCR anidada múltiple o PCR en tiempo real simple, o múltiple.

Existen diferentes *targets*, el más empleado con fines diagnósticos es el gen P1 que codifica para una proteína citoadherente inmunodominante, específica para *M. pneumoniae*. En nuevas técnicas de PCR múltiple en tiempo real se está utilizando también como secuencia blanco una región del gen que codifica para la CARDS Toxin. Además para el estudio de resistencia antibiótica se utilizan técnicas moleculares que amplifican 23S rRNA.

Estos métodos de no requieren bacterias viables y aplicables a pacientes de cualquier edad (lactantes) y condición (HIC) Los inconvenientes de estas técnicas son las contaminaciones (falsos positivos) y la presencia de inhibidores (falsos negativos) pero ambos pueden ser minimizados mediante la incorporación de controles internos y trabajando según las recomendaciones establecidas por expertos.

Un resultado positivo de PCR a partir de una muestra respiratoria y o del órgano afectado (LCR, Biopsia renal, Biopsia de otros órganos, etc) con sintomatología clínica compatible se puede interpretar como infección reciente confirmada por M pneumoniae. Sin embargo, se sabe que la tasa de portación de ***M. pneumoniae*** en individuos sanos varía entre el 2,2 al 15% según algunos autores. Por otra parte se relaciona la cantidad de ADN encontrada con la gravedad del cuadro clínico. Además otros autores hablan de persistencia del *Mycoplasma pneumoniae* inferior al 1 % y de hasta 4 meses de duración. A pesar de todo esto se jerarquiza a la utilización de métodos moleculares como ***gold standard*** en el diagnóstico de este agente.

(Anexo) Toma de muestra para diagnóstico de *Chlamydia psittaci, Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae.*

Enfermedades respiratorias: HNF (Hisopado Nasofaríngeo); ANF (aspirado nasofaríngeo); AT (aspirado traqueal); BAL (lavado bronco alveolar); Biopsias del órgano afectado; LP líquido pleural, etc. Todos los materiales deben en lo posible ser colocados en el tubo con medio de transporte UTM. Agregar 500 microlitros de AT de cada muestra en cada tubo. Mantener las muestras refrigeradas y enviar del mismo modo. Las biopsias se deben enviar en recipientes estériles a los que se les agrega el contenido de 1 tubo de UTM. Conservar y enviar refrigeradas.

Enfermedades extrapulmonares (alteración del SNC; Síndrome febril prolongado, glomérulonefritis, Conjuntivitis, etc): Enviar junto a la muestra respiratoria, una muestra del órgano afectado (LCR; sangre entera; biopsia de riñón; hisopado ocular) y una muestra de sangre entera en tubo seco nuevo (PCR y detección de anticuerpos).
LCR: enviar como mínimo 0,5 ml. Es la única muestra que si poseen UTM no debe ser sembrada en el.

En presencia de Brotes por *Mycoplasma pneumoniae* en comunidades cerradas o de Brotes de psitacosis, enviar par de suero con diferencia de 21-28 días entre el primero y segundo. Mantenerlos y enviarlos de manera refrigerada.

Todas las muestras deben ser transportadas cumpliendo con las normas de BIOSEGURIDAD

PCR ANIDADA PARA DETECTAR ADN de *Mycoplasma pneumoniae*

Tesis de Maestría: **Optimización de una técnica de PCR para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* en muestras del tracto respiratorio.**
Bioq. María Estela Cadario Magíster en Microbiología Molecular. ANLIS "Carlos G. Malbrán" Universidad Nac. De San Martín.
(Fuente: "Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection in autopsy and open lung biopsy tissues by nested PCR." Talkington DF y colaboradores. *J.Clin.Microbiol, 1998; 36:1151-53)*

Aparatos y materiales fungibles

- Microcentrífuga Heal Force. Modelo Neofugue 13
- Termobloque Lab Line 65°
- Termobloque Lab Net 100°
- Ciclador térmico – MPI / M02
- Cuba marca: Hoefer Scientific Instrument - HE99X
- Peine marca : Hoefer Scientific Instrument - HE 91A-10-1,5
- Micropipetas para extracción de ADN Finnpipette digital vol.:5-40 µl y Eppendorf 100-1000µl..
- Micropipetas para preparar la mezcla de reacción Eppendorf 0-20µl, Eppendorf 10-100µl, Eppendorf 100-1000µl.
- Micropipeta para sembrar geles de agarosa marca Eppendorf 0-20µl.
- Tips con barrera marca Bio-Rad (cat.: 211-2011 y 211-2016).
- Tubos Eppendorf de pared fina Bio-Rad (Cat.: 223-9473) (capacidad: 200µl).
- Documentador de geles PG modelo T70 UV/Visible spectrometer c/ Cámara digital Olympus C5060 Wide Zoom

Solución tamponada de Lisis

10 mM TRIS pH 8, 3.

0, 45% Tween 20.

0, 45% Igepal CA-630

200 ug / ml Proteinasa K.

Preparación:

Pesar TRIS 0,121 g y colocarlo en 100ml de agua ultrapura (grado HPLC) marca Aldrich y llevar a pH 8 ,3. Colocar 60 ml de la solución anterior en un frasco estéril y agregar 270 µl de Tween 20, 270µl de Igepal y 0,012 g de proteinasa K pura. Disolver y fraccionar en 600 µl por vial. Conservar a -20ºC.

Cebadores o iniciadores (*primers)* utilizados en la PCR anidada: amplifican secuencias de ADN específicas de especie correspondientes al gen que codifica para la citoadhesina P1 de *Mycoplasma pneumoniae*

Secuencias:

P1-40: 5´ 39* ATT CTC ATC CTC ACC GCC ACC.63* 3´

P1-178: 5´ 177* CAA "TGC CAT CAA CCC GCG CTT AAC C.201* 3´

P1-285: 3´ 285* GTT GTC GCG CAC TAA GGC CCA CG.263* 5´

P1-331: 3´ 330* CGT GGT TTG TTG ACT GCC ACT GCC G306* .5´

Preparación de la solución de trabajo de los cebadores:

Preparar una solución madre 100 μM (se centrifuga durante 2 minutos a 16.000 g y se hidrata con agua ultra pura). Diluir 1/20 para llevar a una solución de trabajo de concentración final de 5μM.

- ✓ Enzima Taq polimerasa 50U INVITROGEN
- ✓ Solución tampón (*buffer*) de PCR 10X (Invitrogen)
- ✓ Cl2Mg 50mM (Invitrogen).
- ✓ Nucleótidos 100μM c/u INVITROGEN

Preparación de la mezcla de nucleótidos:

- ✓ Agregar 10 µl de cada uno de los nucleótidos 100 µM a 460 µl de agua ultra pura.
- ✓ Agarosa al 3,0% (BioRad cat.162-0134)

Preparación del gel de agarosa:

- ✓ Disolver 1,50 mg en 50 ml de solución tamponada TAE 1X.
- ✓ Solución tamponada TAE 50X pH:8,0

Fórmula

- ✓ Tris base (Tris acetate 40 mM)....242g
- ✓ Acido acético glacial..... 57,1 g
- ✓ Na2EDTA.2 H2O (EDTA 2 mM) 37,2g
- ✓ Agua destilada c.s.p.1000ml

Preparación de solución tamponada TAE 1X

se realiza una dilución 1/50 de la solución tamponada 50X con agua destilada . Se utiliza para la preparación del gel de agarosa al 2,5% y como solución tamponada de corrida dentro de la cuba de electroforesis.

- ✓ Gel Red ™ A (BIOTIUM –Gen Biotech 10,000X en agua) agregar 2,5 µl de una solución de GEL RED de 1 0,000X a 50 ml de agarosa al 3,0%.
- ✓ Solución tamponada de siembra (Sigma cat. G-2526). 3µl de reactivo + 10 µl de producto de PCR.
- ✓ Marcador de peso molecular 100pb (Promega cat-G-2101) 3µl de solución tamponada de siembra + 5 µl de marcador de peso molecular.

Microorganismos y ácidos nucleicos de referencia

1. ADN de *Mycoplasma pneumoniae* de referencia (ATCC 15531 D).

2. Cepa de *Mycoplasma pneumoniae* Malbrán 002. (Control positivo) Esta cepa no está caracterizada genéticamente, no se ha analizado previamente su cito adhesina. Fue adquirida para la producción de antígeno fijador de complemento.

Extracción de ADN

Procedimiento preliminar

Tomar muestras respiratorias (BAL, ANF, AT) en recipientes nuevos y con agua de inyectables. Para Hisopados nasal y faríngeo disponer de Hisopos (FLOQ *swabs* 503CS01 marca COPAN) o al menos hisopos de dacrón y medio de transporte UTM (330C marca COPAN). Dichas muestras deben ser conservadas de manera refrigerada (4ºC) hasta la extracción de ADN (72 hs). Una vez extraído el ADN se puede conservar a –20ºC hasta realizar la PCR. La ventaja del medio de transporte UTM es la viabilidad de la muestra para su posterior aislamiento en medio especial.

Las muestras respiratorias (BAL Liq. Pleural) con volumen superior a 3 ml y el LCR deben ser concentrados por centrifugación. Las condiciones de centrifugación seguidas son: muestras respiratorias centrifugar 5 minutos a 14000 RPM y LCR centrifugar 30 min a 14000 RPM. Se descarta el sobrenadante por simple volcado y se resuspenden los pellet en el volumen restante. Esa suspensión es la que se utilizara para la extracción.

Para Biopsias, se debe cortar una pequeña porción de aproximadamente 0,002g y colocar en tubo cónico nuevo estéril con 2 ml de buffer de lisis. Dejar a 56 o 65°C hasta que se disgregue el trozo de órgano. Luego tomar 200 microlitros de ese macerado y extraer ADN por columna como si fuera una muestra respiratoria.

Procedimiento de extracción

Agregar 400 µl del concentrado de la muestra a tubos de 1,5 ml de capacidad que contenían 600 µl de solución tamponada de lisis. Colocar en termo bloque a 65°C durante 2 horas. Pasar a otro termobloque a 100 °C 15 minutos para inactivar a la enzima proteinasa K. Conservar a –80ºC hasta el momento de realizar la PCR..

Otra forma

Extracción por columna con kit de Quiagen DNAeasy Blood and tissue Kit Cat N° 69504 (para 50 determinaciones). Realizar el procedimiento según el instructivo del KIT. Recordar siempre realizar el pre tratamiento de muestras respiratorias que tengan un volumen superior a 3 ml, LCR y Biopsias**.**

Mezcla de reacción.

Taq 2U	DNTP 2,0mM	Cl_2Mg 2 ,0 mM	Buffer 0.1 µM
P1-40 *0,02µM	P1-331* 0,02µM	P1-285** 0,2µM	P1-178** 0,2µM
Vol.final 50µl/tubo			

*Oligonucleótidos utilizados en la primera ronda

** Oligonucleótidos utilizados en la segunda ronda

Agregar 10 µl de extracto de ADN de la muestra a cada tubo con 40 µl de mezcla de reacción para la primera ronda y luego 5 µl del producto de la primera ronda de PCR a cada tubo correspondiente con 45µl de mezcla de reacción para la segunda ronda**.**

1 Condiciones de ciclado para la PCR anidada

1era ronda

1 ciclo de desnaturalización durante 1 min a 94°C	35 ciclos de desnaturalización durante 30 seg a 94°C*; "annealing"* durante 30 seg a 60º C; elongación durante 30 seg a 72ºC.	1 ciclo de extensión final durante 1 min a 72ºC

2da ronda

1 ciclo de desnaturalización durante 1 min a 94°C	40 ciclos de desnaturalización durante 30 seg a 94°C; *"annealing"* durante 30 seg a 60º C; elongación durante 30 seg a 72ºC.	1 ciclo de extensión final durante 1 min a 72ºC

Los productos de la primera y segunda ronda de la PCR se corren en un gel de agarosa al 3,0% (ver reactivos).
Condiciones de corrida del gel: 60 minutos a 110 voltios
Los tamaños de las bandas característicos son de 281 pb para la primera ronda y de 107pb para la 2º ronda.

PCR simple de β-actina humana .

Se debe correr a cada ADN extraído de muestras respiratorias para la detección de *Mycoplasma pneumoniae*
Reactivos
Idem a los utilizados para la PCR anidada de *Mycoplasma pneumoniae* exceptuando los cebadores que se describen a continuación.
Cebadores. Pertenecen a un equipo de reactivos para RT-PCR (Titan One Tube RT-PCR Kit Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania).

Secuencias

derecho 5′-CCA-AGG-CCA-ACC-GCG-AGA-AGA-TGA-C 3´

reverso 3´-AGG-GTA-CAT-GGT-GGT-GCC-GCC-AGA-C 5´.

El tubo nº 5 del equipo comercial contiene la mezcla lista para usar. La concentración total de iniciadores en el tubo nº 5 es de 20µM y su volumen total de 20 µl. Agregar 2 µl del reactivo a cada tubo que contiene 48 µl de la mezcla total de reacción para la PCR.

Control positivo β-actina humana

Extracto de ADN obtenido a partir de tubo con 500.000 células fibroblastos humanos "PTP" en 20 µl de solución tamponada de fosfatos pH 7,2 (Servicio de Cultivo de tejidos del INEI-ANLIS Dr Carlos G. Malbrán). Agregar 10 µl (250.000 células totales) a un tubo con 600 µl de solución tamponada de lisis. El procedimiento para la extracción y purificación del ADN fue el mismo que se aplicó a las muestras.

Procedimiento

Mezcla de reacción para la PCR de β-actina humana.

Taq 2U	DNTPS 2,0mM	Cl_2Mg 2 ,0 mM	Buffer 0.1 µM
Cebadores 0,4µM	Vol.final 50µl/tubo		

Agregar 10 µl de cada uno de los extractos obtenidos por lisis en la mezcla de reacción

Condiciones de ciclado para la PCR de β-actina humana

• 1 ciclo de desnaturalización durante 1 min a 94°C	• 35 ciclos de: desnaturalización durante 30 seg a 94°C; *"annealing"* durante 30 seg a 60ºC; elongación durante 30 seg a 72ºC.	• 1 ciclo de extensión final durante 1 min a 72ºC

Los productos de PCR se revelan en un gel de agarosa al 2,0 % con Gel Red (Genbiotech)

Condiciones de corrida del gel:	
20 minutos a 120 voltios	El tamaño de la banda a observar es de 500pb.

Mix PCR Beta actina (única ronda)

Buffer 10X	5 ul
DNTPs	5 ul
CL2Mg	4 ul
P1+2	0,4 ul
Taq	0,5 ul
H2O	23,5 ul
Molde	10 ul
Vol final	50 ul

Cebadores P1+2=180 ul H2O + 10 ul B1 +10 ul B2

Lectura de resultados:

Positivo: una banda de los productos de la segunda ronda de PCR anidada para *Mycoplasma pneumoniae* de 107 pb.
Negativo: ausencia de banda de 107 pb y presencia de banda de 500 pb del producto obtenido por PCR para β actina.
Presencia de inhibidores: ausencia de banda de 107 pb en el producto de PCR anidada para *Mycoplasma pneumoniae* y ausencia de banda de 500pb en el producto obtenido por PCR para β actina.

Interpretación de resultado

El resultado positivo de una PCR anidada en muestras respiratorias tiene valor diagnóstico siempre que la muestra respiratoria provenga de un paciente que presente un cuadro clínico compatible. Existe persistencia y /o portación asintomática.

Detección de Anticuerpos de clase IgM para *Mycoplasma pneumoniae por* inmunofluorescencia.

Reactivos

- ✓ Improntas marca BION MP 1212 .
- ✓ Sueros controles positivo y negativo
- ✓ Reactivo precipitante de Inmunoglobulinas G marca Bion GBR-9982
- ✓ Buffer PBS PH:7.6 (1 X)
- ✓ Anti- Human -IgM FICT marca BION CCM 9974 lista para usar.
- ✓ Azul de Evans diluído 1/30.000 en buffer PBS PH:7.6 (1 X)
- ✓ Glicerina Buffereada PH:8.4

Aparatos

- ✓ Centrifuga (X1000g)
- ✓ Micropipeta 0.5 - 10 µl
- ✓ Micropipeta 40 a 200 µl
- ✓ Incubador a 35-37°C

Procedimiento

Precipitación de IgG y factor reumatoideo

Proceder según lo indicado en el inserto del reactivo precipitante. En éste caso, agregar 5 µl de suero a 45 µl de reactivo precipitante. Mantener a temperatura ambiente 30 min. Otra opción es dejar 12 horas a 4º C. Centrifugar durante 10 minutos a (14.000 rpm).
Tratar a los controles positivo y negativo de la misma manera

Reacción de Inmunofluorescencia

- ✓ Diagramar el esquema de la impronta ubicando al control positivo, al control negativo y a las muestras.
- ✓ Agregar 15 µl del sobrenadante de los controles positivo, negativo y muestras en los pocillos correspondiente.
- ✓ Incubar durante 1 hora 30 min. en cámara húmeda a 37 ºC.
- ✓ Lavar tres veces durante 10 min. con solución tamponada PBS PH:7.6.
- ✓ Secar al aire.
- ✓ Agregar 10 µl de anti IgM a todos los pocillos.
- ✓ Incubar durante 30 min. en cámara húmeda a 37ºC.
- ✓ Lavar tres veces con solución tamponada PBS PH: 7.6 durante 10 min.
- ✓ Secar al aire.
- ✓ Montar con glicerina tamponada pH 8.0.
- ✓ Observar al microscopio de luz fluorescente con un objetivo de 20 y 40X.

Lectura de resultados.
Se deben observar células infectadas pleomórficas con fluorescencia fuerte y completa (*M.pneumoniae*),

Interpretación de resultados.
Positivo: presencia de varias estructuras verde fluorescente fuerte (>+++) y completa (en membrana e interior).
Negativo: ausencia de fluorescencia o fluorescencia incompleta o débil.

2 FICHA ACOMPAÑANTE DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE Mycoplasma pneumoniae y Chlamydia pneumoniae

1.- **DATOS DEL PACIENTE**

Apellido y nombre……

edad: sexo: Protocolo N°.....

Domicilio:..... Localidad.....

Provincia.....CP……. Tel…….

2.- **DATOS DEL CENTRO ASISTENCIAL**

Nombre de la Institución:……

Domicilio-……..Localidad……

Provincia……CP……Tel/Fax……..

Nombre del Médico:……e.-mail…….

3.- **DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Ocupación……

Contacto con aves sanas Si □ No □ Aves enfermas Si □ No □

Contacto con familiar con infección respiratoria . Si □ No □ N/C

Internación previa con infección respiratoria Si □ No □ N/C

Fecha de internación previa...../...../.....

4.- **DATOS CLÍNICOS Y RESULTADOS DE ESTUDIOS AL INGRESO**

Fecha de inicio de síntomas...../...../..... Fecha de internación...../...../.....

DIAGNÓSTICO CLÍNICO : IRAB (NAC) Si □ No □

IR ALTA Si □ No □ HANTAVIRUS Si □ No □

EXTRAPULMONARES Si □ No □ Alteraciones del SNC □

Síndrome febril prolongado (SFP) □ Alteraciones renales □ Otras □

Patología de base Si □ No □ Nombrar…….

- **LABORATORIO AL INGRESO**

Hemograma GR: N□ B□ Leucocitos: N□ E□ Neutrófilos E□ Linfocitos E□

Plaquetas N□ B □ Enzimas Hepáticas N□ E□ % Sat. de Oxigeno

- **OTROS**

IMAGEN DE RX DE TÒRAX…….

TIPO DE NAC…….

5.- **MUESTRAS**

Fecha de extracción……/……/…….

INFECCIONES RESPIRATORIAS: HNF □; ANF □; BAL □

Sueros 1º □ 2º □

MANIFESTACIONES EXTRAPULMONARES: LCR □ Sangre □ Biopsia □
Sueros 1º □ 2º □

DIFERENCIAL HANTAVIRUS: sangre entera en tubo seco nuevo 1º □ 2º □

l

Firma y sello del médico tratante:

Servicio: Bacteriología Clínica- Departamento de Bacteriología.
Tel. 4303- 1807/11 (int.116). Tel. directo- fax: 4301- 9346

Bibliografía

1. Dorigo-Zetsma JW et al. *Results of molecular detection of Mycoplasma pneumoniae among patients with acute respiratory infection and in their household contacts reveals children as human reservoirs.* J Infect Dis 2001; 39: 1184-86.
2. Foy H et al. *Mycoplasma pneumoniae infections in patients with immunodeficiency syndromes: report of four cases*. J Infect Dis 1973; 127: 388-393.
3. Narita M. *Detection of Mycoplasma pneumoniae DNA in cerebrospinal fluid and local immune response*. Clin Infect Dis 2000; 30: 405-6.
4. Koskiniemi M. *CNS manifestations associated with Mycoplasma pneumoniae infections: summary of cases at the University of Helsinki and review*. Clin Infect Dis 1993; 17 (Suppl 1): S52-S57.
5. Behan PO et al. Neurological aspects of mycoplasmal infection. Acta Neurol Scand 1986; 74: 314- 322.
6. Rautonen J et al. *Prognostic factors in childhood acute encephalitis*. Pediatr Infect Dis J 1991; 10: 441-6.
7. Domenech c et al. *Role of Mycoplasma pneumoniae in pediatric encephalitis*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28: 91-94.
8. Waites KB; Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen* Clin Microbiol Rev 2004; 17: 697-728.
9. Martínez MA et al. *Detection of Mycoplasma pneumoniae in adult community-acquired pneumonia by PCR and serology*. J. Med Microbiol 2008; 57: 1491-1495.
10. Souliou E et al. *Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumonia respiratory tract infections in children.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2007; 26: 513-515.
11. Cadario,ME. "*Optimización de una técnica de PCR para la detección de Mycoplasma pneumoniae en muestras del tracto respiratorio"* Tesis de Maestría en Biología Molecular Universidad Nacional de San Martín, 2002.
12. Cadario ME et al. *Extrapulmonary manifestations due to Mycoplasma pneumoniae*. 105th ASM General Meeting, Atlanta, Junio de 2005.
13. Laso MC et al. *Mycoplasma pneumoniae detection with PCR in renal tissue of a patient with acute glomerulonephritis*. Pediatr Nephrol 2006; 21: 1483-1486.
14. Talkington D et al. *Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection in autopsy and open-lung biopsy tissues by nested-PCR*. J.Clin. Microbiol. 1998; 36: 1151-1153
15. Xiao-yan He et al. *"Investigation of Mycoplasma pneumoniae infection in pediatric population from 12,025 caseswith respiratory infection"* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2013; 75: 22-27
16. Hsin-Yu Chang et al. *"Comparison of real-time polymerase chain reaction and serological test for the confirmation of Mycoplasma pneumoniae infection in children with clinical diagnosis of atypical pneumonia"* J. Microbiol. Immunol. Infect. 2014; 47: 137-144
17. Thurman KA et al. *"Detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, and Legionella spp. In clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay"* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2011; 70: 1-9
18. Welti M et al. *"Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoploasma pneumoniae in respiratory tract secretion"* Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2003; 45: 85-95
19. Waring A L,et al." Development of a genomicsbased PCR assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* in a large outbreak in New York State". J Clin Microbiol 2001; 39: 1385-90. (15%)
20. Dorigo-Zetsma J W, et al."Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections in children". J Clin Microbiol 1999; 37: 14-7. (0%)

21. Dorigo-Zetsma J W,et al." Results of molecular detection of *Mycoplasma pneumoniae* among patients with acute respiratory infection andin their household contacts reveals children as human reservoirs." J Infect Dis 2001; 183: 675-8: 2638-42 (en UC FLU 14% en adultos)
22. Kleemola S R, et al." Rapid diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection: clinical evaluation of a commercial probe test". J Infect Dis 1990; 162: 70-5.(s/ NAC grave, NAC, otras resp. PCR cuantitativa)
23. Skakni L, et al." Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction". J Clin Microbiol 1992; 30: 2638-43. ($<10^2$ UFC en asintomáticos y $> 10^2$ en pac. con neumonía)
24. Camilo Palmas S, y cols. "Portación faríngea de *Mycoplasma pneumoniae* en niños chilenos". Rev Chil Infect 2005; 22 (3): 247-250. (2,2%)
25. Foy Hjordis M. "Infections Caused by Mycoplasma pneumoniae and Possible Carrier State in Different Populations of Patients". Clin Infect Dis. (1993) 17 (Supplement 1): S37-S46 (Persistencia hasta 4 meses)

Capitulo 3

Chlamydia psittacci

Bioq. Maria Estela Cadario
(mec135@yahoo.com.ar)
MV. Javier A Origlia
(javieroriglia@fcv.unlp.edu.ar)

Chlamydia pneumoniae

Dra. M Cecilia Cuffini
(ccuffini@fcm.unc.edu.ar)
Dra. M Celia Frutros
(mariaceliafrutos@gmail.com)
(

Chlamydia psittacci

INDICE

Introducción 42
Hábitat, patogenia, significado clínico 42-43
PCR múltiple anidad (PCR MA) para detección de ADN 44
Preparación de solución de trabajo de cebadores 45
Preparación de muestras de nucleotidos....45
Microorganismos y ácidos nucleicos de referencia 45
Extracción de ADN 46
Procedimiento preliminar 46
Procedimiento de extracción 46
Mezcla de reacción 46
Resultados 47
PCR anidada para la detección de ADN de *C. psittaci* ompA....47
Reactivos 47-48
Secuencias de primers 48
Preparación de solución de trabajo de cebadores 48
Preparación de muestras de nucleotidos 48
Control positivo 49
Extracción de ADN 49
Condiciones de PCR anidada 50
Detección de anticuerpos IgG para Chlamidophila spp. por inmunofluorescencia 50
Reacción de inmunofluorescencia 51
Lectura de resultados 51
Diagnostico molecular para la detección de C. psittaci en muestras de aves 52
Ficha acompañanate de muestras para el estudio de Psitacosis 53-55
Flujograma del LNR para psitacosis humana 56
Flujograma del LNR para psitacosis aviar 57

Bibliografía 58

Chlamydia psittaci

INTRODUCCIÓN

El género *Chlamydia* que pertenece al orden *Chlamydiales la familia Chlamydiaceae*.Los géneros que más frecuentemente infectan al hombre son *Chlamydia trachomatis,* (3 serovariedade*s), Chlamydia pneumoniae (Twar), Chlamydophila psittaci* (9 serovariedades A- F en aves, WC desde gatos y M56 desde otros mamíferos).

Otra bacteria genéticamente relacionada con Chlamydia cuyo reservorio es una Acantamoeba y se la llamó *Parachlamydia acanthamoebae.* Posteriormente se describieron probables chlamydias, *Protochlamydia naegleròphila, Sinkania negevensis, Waddlia Chondrophila* y una posible chlamydia llamada *Rabdochlamydia classificans. (2).*Todas son bacterias intracelulares obligadas. Presentan dos estadios en su ciclo de replicación, cuerpo reticulado CR (intracelular) y cuerpo elemental CE (infectiva y extracelular).

HABITAT; PATOGENIA; SIGNIFICADO CLÍNICO

Es una enfermedad de denuncia obligatoria que requiere un diagnóstico rápido para erradicar la fuente y prevenir nuevos casos.

Los síntomas clínicos más frecuentes son fiebre alta, cefalea, mialgia, tos seca, y dificultad respiratoria (neumonía). Ocasionalmente presentan manchas rosadas

Inespecíficas en la piel, diarrea, vómitos y dolor abdominal (alteraciones en bazo e hígado) y muy raramente se han detectado miocarditis, endocarditis, encefalitis, síndrome de dificultad respiratoria grave del adulto y falla multiorgànica. (3)

El ciclo de infección comienza con la exposición del individuo a heces, orina, secreciones o vísceras de animales infectados (aves y mamíferos como reservorios). Los aerosoles poseen los cuerpos elementales (CE) ingresan por vía respiratoria y son capturados por las células del sistema retículo endotelial. Los fagosomas pasan a sangre y pulmón donde se producen daños (necrosis) en el parénquima. Además, estos pueden afectar a otros órganos según la capacidad inmune del paciente y la virulencia de la cepa. Las más frecuentes y virulentas son las asociadas a psitácidos.

Las infecciones por clamidias provocan cambios en el metabolismo celular, aumentan la glucolisis, la respiración y la apoptosis provocando inflamación. (4)

Pueden presentarse casos aislados o en un brote (misma fuente). Hasta el momento nosotros no hemos podido documentar ningún caso de contagio entre personas. En un estudio de brote, consideramos *caso probable* a paciente con enfermedad respiratoria y nexo epidemiológico (contacto con aves sanas o enfermas) y *no caso* al individuo con nexo epidemiológico pero sin manifestaciones clínicas. Obviamente se requiere de métodos microbiológicos para confirmar los casos probables. Desde el punto de vista de

notificación a las autoridades de Salud Pública, la vieja definición de casos humanos basada en pruebas serológicas ha sido el principal motivo de subregistro. Actualmente la definición de caso confirmado desde el laboratorio se brinda a partir de métodos moleculares que son más específicos, extremadamente sensibles y además permiten determinar genotipos. Este genotipo, se utiliza para establecer la probable fuente causal del caso o brote. (2)

El período de incubación es comúnmente de una a dos semanas pero puede prolongarse hasta un mes. Su comienzo es insidioso. La radiografía de tórax puede presentar una imagen unilateral (consolidación, infiltrados bilaterales, nodulares, miliares o intersticiales, Desde el laboratorio uno puede determinar alteraciones hematológicas que se producen en una leucopenia en el 25% de los casos, anemia y coagulación intravascular diseminada menos frecuentemente. Aumentan la proteína C reactiva así como las enzimas hepáticas en la forma más severa.

Los métodos de diagnóstico microbiológico se agrupan en directos, son el aislamiento de la bacteria a partir de muestras respiratorias (esputo, aspirados, líquido pleural, biopsia de pulmón, bazo, sangre coagulada, tomadas en el período agudo de la enfermedad y antes del tratamiento antibiótico, es confiable y permite la obtención de bacterias viables. Anteriormente, el cultivo se hacía inoculando ratones y saco vitelino de embriones de pollos de seis días de edad. En la actualidad se utiliza cultivo celular .Algunas de las líneas celulares apropiadas y documentadas son: Buffalo Green Monkey (BGM), Mc Coy, HELA, VERO y L 929. (2). El efecto citopatico se identifica por inmunofluorescencia (IFI) con anticuerpo monoclonal. La limitación del aislamiento para *C psittaci* es el requerimiento de bioseguridad de tipo III y la desventaja respecto de los métodos moleculares es la devolución tardía (al menos una semana) del resultado.

La detección del genoma mediante la PCR anidada múltiple (PCRAM) amplifica una porción del mismo que codifica para la proteína OMPA o la subunidad 16 S del ARN ribosomal.

La emergencia de la PCR en tiempo real, secuenciación y microarrays, nos permiten no solo conocer la especie sino también genotipificar. No existen métodos moleculares comerciales. La limitación estaría en el modo de toma de muestra y conservación hasta la extracción de ADN. (2)

Los métodos indirectos, siguen siendo utilizados y detectan anticuerpos totales en pares de sueros (Fijación de complemento). Antes se usaban de modo frecuente, pero en la actualidad se los emplea en estudios puntuales de comparación de técnicas. La mayoría de los laboratorios utilizan detección de anticuerpos de clase IgG por IFI, Microinmunofluorescencia (MIF) o ELISA en pares de sueros tomados el primero en el período agudo (recomendamos desde el dìa 7 al 14) y el segundo tomado 21 días posterior al primero (convaleciente). Esto nos permite determinar la conversión serológica (negativo a positivo) o la cuadruplicación de título (aumento de cuatro veces).

La IFI es un buen método de tamizaje, sensible pero poco específica de especie. Hay cruzamiento de anticuerpos entre especies de *Chlamydia*, por lo tanto uno puede confirmar una infección reciente pero no especie. Existen diversos reactivos comerciales, algunos realizados con líneas celulares (LLCMK2 con *Chlamydia trachomatis* LGV) otros con cultivo en saco vitelino de cada una, de las especies. Los resultados que emergen de técnicas moleculares o aislamiento con sintomatología clínica compatible confirman una infección por *C. psittaci*.

Metodología utilizada para el diagnóstico en humanos.

PCR Múltiple anidada (PCRMA) para detectar ADN de *Chlamydia psitacci y Chlamydia pneumoniae*

Aparatos y materiales fungibles

- ✓ Microcentrífuga Heal Force. Modelo Neofugue 13
- ✓ Termobloque Lab Line 65°
- ✓ Termobloque Lab Net 100°
- ✓ Ciclador térmico – MPI / M02
- ✓ Cuba marca: Hoefer Scientific Instrument - HE99X
- ✓ Peine marca : Hoefer Scientific Instrument - HE 91A-10-1,5
- ✓ Micropipetas para extracción de ADN Finnpipette digital vol.:5-40 µl y Eppendorf 100-1000µl..
- ✓ Micropipetas para mezcla de reacción Eppendorf 0-20µl, 10-100µl, 100-1000µl.
- ✓ Micropipeta para sembrar geles de agarosa marca Eppendorf 0-20µl.
- ✓ Tips con barrera marca Bio-Rad (cat.: 211-2011 y 211-2016).
- ✓ Tubos Eppendorf de pared fina Bio-Rad (Cat.: 223-9473) (capacidad: 200µl).
- ✓ Documentador de geles PG modelo T70 UV/Visible spectrometer c/ Cámara digital Olympus C5060 Wide Zoom

Reactivos Solución tamponada de lisis.

10 mM TRIS pH 8, 3.

0, 45% Tween 20.

0, 45% Igepal CA-630

200 ug / ml Proteinasa K.

Preparación: pesar TRIS 0,121 g y colocarlo en 100ml de agua y llevar a pH 8 ,3. Colocar 60 ml de la solución anterior en un frasco estéril y agregar 270 µl de Tween 20, 270µl de Igepal y 0,012 g de proteinasa K pura. Disolver y fraccionar en 600 µl por vial. Conservar a -20ºC.
Agua ultrapura (grado HPLC) marca Aldrich
Cebadores o iniciadores (*primers)* utilizados en la PCR anidada: amplifican secuencias de ADN específicas de especie correspondientes al gen que codifica para la 16SrRNA
Secuencias:

Primera ronda: Chlamydia grupo (chlamydia y chlamydophila) 16S rRNA.
PGCh (5'-3') **ACG GAA TAA TGA CTT CGG**
P-a-GCh (5'-3') **TAC CTG GTA CGC TCA ATT**
(Concentración en mix 0,2 µl)

Segunda ronda: detecta por separado C. pneumoniae y C. psittaci 16S rRNA.
pchpn-ps(5'-3') **ATA ATG ACT TCG GTT GTT ATT**
p-a-chpn (5'-3')**CGT CAT CGC CTT GGT GGG CTT**
p-achps (5'-3') **TGT TTT AGA TGC CTA AAC AT**

Preparación de la solución de trabajo de los cebadores:

Preparar una solución madre 100 μM (se centrifuga durante 2 minutos a 16.000 g y se hidrata con agua ultrapura). Diluir 1/10 para llevar a una solución de trabajo de concentración final de 10 μM.

- ✓ Enzima Taq polymerase recombinant INVITROGEN
- ✓ Solución tampón (*buffer*) de PCR 10X
- ✓ Cl2Mg 50mM INVITROGEN
- ✓ dNTP 100μM c/u INVITROGEN

Preparación de la mezcla de nucleótidos: agregar 10 µl de cada uno de los nucleótidos 100 µM a 460 µl de agua ultrapura. Agarosa al 2,5 % (BioRad cat.162-0134)

Preparación del gel de agarosa: disolver 2,0 en 100 ml de solución tamponada TAE 1X. Solución tamponada TAE 50X pH: 8,0

Fórmula

Tris base (Tris acetate 40 mM) …242g
Acido acético glacial..... 57,1 g
Na2EDTA.2 H2O (EDTA 2 mM) 37,2g
Agua destilada..... c.s.p.1000ml

Preparación de solución tamponada TAE 1X se realiza una dilución 1/50 de la solución tamponada 50X con agua destilada. Se utiliza para la preparación del gel de agarosa al 2,5% y como solución tamponada de corrida dentro de la cuba de electroforesis.

- Gel Red ™ A (BIOTIUM –Gen Biotech 10,000X en agua) agregar 2,5 µl de una solución de GEL RED de 1 µg/ml a 50 ml de un gel de agarosa al al 3,0%
- Solución tamponada de siembra (Sigma cat. G-2526). 3µl de reactivo + 10 µl de producto de PCR.
- Marcador de peso molecular 100pb (Promega cat-G-2101) 3µl de solución tamponada de siembra + 5 µl de marcador de peso molecular.

Microorganismos y ácidos nucleicos de referencia.

ADN de C psitacci (Cps 1) (Extracto antígeno Ornitosis Boeringer) (Bioq. M Estela Cadario Bacteriología Clínica Malbrán)

ADN de C pneumoniae (Extracto a partir improntas C. pneumoniae de marca BION) BIOq. M Estela Cadario - Bacteriología Clínica Malbrán)

ADN de C pneumoniae y C psittaci (Extracto a partir improntas Chlamydias species de marca FOCUS) Bioq. M Estela Cadario - Bacteriología Clínica Malbrán)

Extracción de ADN

Procedimiento preliminar

Tomar muestras respiratorias (BAL, ANF, AT) en recipientes nuevos y con agua de inyectables. Para Hisopados nasal y faríngeo disponer de Hisopos (FLOQ *swabs* 503CS01 marca COPAN) o al menos hisopos de dacrón y medio de transporte UTM (330C marca COPAN). Dichas muestras deben ser conservadas de manera refrigerada (4ºC) hasta la extracción de ADN (72 hs). Una vez extraído el ADN se puede conservar a –20ºC hasta realizar la PCR. La ventaja del medio de transporte UTM es la viabilidad de la muestra para su posterior aislamiento en medio especial.
Las muestras respiratorias (BAL Liq. Pleural) con volumen superior a 3 ml y el LCR deben ser concentrados por centrifugación. Las condiciones de centrifugación seguidas son: muestras respiratorias se deben centrifugar 5 minutos a 14000 RPM y LCR centrifugar 30 min a 14000 RPM. Se descarta el sobrenadante por simple volcado y se resuspenden los pellet en el volumen restante. Esa suspensión es la que se utilizara para la extracción.
Para Biopsias, se debe cortar una pequeña porción de aproximadamente 0,002g y colocar en tubo cónico nuevo estéril con 2 ml de buffer de lisis. Dejar a 56 o 65°C hasta que se disgregue el trozo de órgano. Luego tomar 200 microlitros de ese macerado y extraer ADN por columna como si fuera una muestra respiratoria.

Procedimiento de extracción

Agregar 400 µl del concentrado de la muestra a tubos de 1,5 ml de capacidad que contenían 600 µl de solución tamponada de lisis. Colocar en termo bloque a 65°C durante 2 horas. Pasar a otro termobloque a 100 °C 15 minutos para inactivar a la enzima proteinasa K. Conservar a –80ºC hasta el momento de realizar la PCR..

Otra forma

Extracción por columna con kit de Quiagen DNAeasy Blood and tissue Kit Cat N° 69504 (para 50 determinaciones). Realizar el procedimiento según el instructivo del KIT. Recordar siempre realizar el pre tratamiento de muestras respiratorias que tengan un volumen superior a 3 ml, LCR y Biopsias**.**

Mezcla de reacción. 1era ronda

Taq 1,25 U	DNTP 2,0 mM	Cl_2Mg 2 ,5 mM	Buffer 0.1 µM
P-*GCh* 0,2µM	P-a-*GCh* 0,2µM		Vol Final 50 µl

Mezcla de reacción. 2da ronda

Taq 1,25 U	DNTP 2,0mM	Cl_2Mg 2 ,5 mM	Buffer 0.1 µM
P-*Chpn-ps* 1-40 *0,4µM	P-a-*Chps* * 0,4µM	P-a-*Chpn* * 0,08µM	Vol Final 50 µl

Agregar 5 µl de extracto de ADN de la muestra a cada tubo con 45 µl de mezcla de reacción para la primera ronda y luego 5 µl del producto de la primera ronda de PCR a cada tubo correspondiente con 45µl de mezcla de reacción para la segunda ronda.

Condiciones de ciclado para la PCR anidada

1era y 2da ronda

1 ciclo de desnaturalización durante 2 min. a 95 °C	35 ciclos de desnaturalización durante 1 min. a 94°C*; "annealing"* durante 30 seg. a 55º C; elongación durante 1 min. a 72ºC.	1 ciclo de extensión final durante 1 min. a 72ºC

Los productos de la primera y segunda ronda de la PCR se corren en un gel de agarosa al 2,0% (ver reactivos).
Condiciones de corrida del gel: 20 minutos a 120 voltios
Los tamaños de las bandas característicos son de 436 pb *Chlamydia* grupo en primera ronda y 221 pb *Cpn* y 127 pb *Cps* para la segunda ronda.

RESULTADOS:

Positivo para *C ps*: presencia de banda de 127 pb
Positivo para *C pn*: presencia de banda de 221 pb.

Negativo: ausencia de bandas de PCR Chlamydias con resultado positivo de PCR de β-actina humana

Indeterminado: ausencia de bandas en PCRMA y PCR de β-actina humana

PCR ANIDADA PARA DETECTAR ADN de *Chlamydia psittaci (ompA)*

(Referencia: "Detection and differentiation of chlamydiae by nested-PCR". Sachse K, Hotzel H. Methods Mol Biol 2002;216:123–36.*1998;36:1151-53.*

Aparatos y materials fungibles

- Microcentrífuga Heal Force. Modelo Neofugue 13
- Termobloque Lab Line 65°
- Termobloque Lab Net 100°
- Ciclador térmico – MPI / M02
- Cuba marca: Hoefer Scientific Instrument - HE99X
- Peine marca : Hoefer Scientific Instrument - HE 91A-10-1,5
- Micropipetas para extracción de ADN Finnpipette digital vol.:5-40 µl y Eppendorf 100-1000µl..
- Micropipetas para preparar la mezcla de reacción Eppendorf 0-20µl, Eppendorf 10-100µl, Eppendorf 100-1000µl.
- Micropipeta para sembrar geles de agarosa marca Eppendorf 0-20µl.
- Tips con barrera marca Bio-Rad (cat.: 211-2011 y 211-2016).
- Tubos Eppendorf de pared fina Bio-Rad (Cat.: 223-9473) (capacidad:200µl).
- Documentador de geles PG modelo T70 UV/Visible spectrometer c/ Cámara digital Olympus C5060 Wide Zoom

Reactivos

Solución tamponada de lisis.

10 mM TRIS pH 8,3.
0,45% Tween 20.
0,45% Igepal CA-630
200 ug / ml Proteinasa K.

Preparación: pesar TRIS 0,121 g y colocarlo en 100ml de agua y llevar a pH 8 ,3. Colocar 60 ml de la solución anterior en un frasco estéril y agregar 270 µl de Tween 20, 270µl de Igepal y 0,012 g de proteinasa K pura. Disolver y fraccionar en 600 µl por vial. Conservar a -20ºC.

- Agua ultrapura (grado HPLC) marca Aldrich
- Cebadores o iniciadores (*primers)* utilizados en la PCR anidada: amplifican secuencias de ADN específicas correspondientes al gen ompA de (región conservada) *Chlamydia* y (región variable)*Chlamydia psittaci*

Secuencias de primers:

CHOMP191: 5´ GCI YTI TGG GAR TGY GGI TGY GCI AC 3´

CHOMP371: 5´ TTA GAA ICK GAA TTG IGC RTT IAY GTG IGC IGC 3´

CHOMP336: 5´ CCR CAA GMT TTT CTR GAY TTC AWY TTG TTR AT 3´

218PSITT: 5´ GTA ATT TCI AGC CCA GCA CAA TTY GTG 3´

Preparación de la solución de trabajo de los cebadores:

Se prepara solución stock 100 µM. Luego se prepara solución de trabajo a 10 µM.

- Enzima Taq polymerase recombinant INVITROGEN
- Solución tampón (*buffer*) de PCR 10X INVITROGEN
- Cl2Mg 50 mM INVITROGEN
- DNTPs 10µM c/u INVITROGEN ó INVITROGEN

Preparación de la mezcla de nucleótidos: agregar 10 µl de cada uno de los nucleótidos 100 µM a 60 µl de agua ultra pura.

- Agarosa al 2 % (BioRad cat.162-0134)

Preparación del gel de agarosa: disolver 2 g en 100 ml de solución tamponada TBE 1X.

- Solución tamponada TBE 50X pH:8,0

Fórmula

Tris base (Tris acetate 40 mM).242g

Acido acético glacial... 57,1 g

Na2EDTA.2 H2O (EDTA 2 mM) 37,2g

Agua destilada.....c.s.p.1000ml .

Preparación de solución tamponada TAE 1X se realiza una dilución 1/50 de la solución tamponada 50X con agua destilada . Se utiliza para la preparación del gel de agarosa al 2% y como solución tamponada de corrida dentro de la cuba de electroforesis.

- Gel Red ™ A (BIOTIUM –Gen Biotech 10,000X en agua) agregar 4 µl de una solución de GEL RED de 10,000X a 100 ml de agarosa al 2 %
- Solución tamponada de siembra (Sigma cat. G-2526). 3µl de reactivo + 10 µl de producto de PCR.

- Marcador de peso molecular 100pb (Promega cat-G-2101) 3µl de solución tamponada de siembra + 5 µl de marcador de peso molecular.

- Control positivo

2. ADN de *Chlamydia psittaci* obtenido a partir de raspado de improntas de marca FOCUS para microinmunofluorescencia.(suspensión de cuerpos elementales crecidos en saco vitelino de Chlamydia psittaci, Chlamydia pneumoniae y Chlamydia trachomatis)

Nota: Debido a que *Chlamydia psittaci* está considerada como arma biológica, no es posible adquirir las cepas de referencias (ATCC).

Extracción de ADN idem PCRMA

Mezcla de reacción.

Mix 1ra ronda

Reactivos	***Volumen para 1 tubo (µl)***
ADD	33.5
Buffer 10x	5
DNTPs 10 mM	1
$MgCl^2$ 50mM	1.25
CHOMP191 10 pmoles	2
CHOMP371 10 pmoles	2
Taq DNA pol	0.2
Vol. Final mix	45

Colocar 5 µl de ADN (muestra) y 45 µl de mix, obteniendo un volumen final de la reacción de 50 µl.

Mix 2a ronda

Reactivos	***Volumen para 1 tubo (µl)***
ADD	34.3
Buffer 10x	5
DNTPs 10 mM	1
$MgCl^2$ 50mM	1.5
CHOMP218 10 pmoles	2
CHOMP336 10 pmoles	2
Taq DNA pol	0.2
Vol. Final mix	45

Colocar 5 µl de ADN (templado de la 1ª ronda) y 45 µl de mix, obteniendo un volumen final de la reacción de 50 µl.

Condiciones de ciclado para la PCR anidada

1ra ronda

1 ciclo de desnaturalización durante 30 seg a 95°C	35 ciclos de desnaturalización durante 30 seg a 95°C; *"annealing"* durante 30 seg a 50º C; elongación durante 30 seg a 72ºC.	1 ciclo de extensión final durante 5 min a 72ºC

2a ronda

1 ciclo de desnaturalización durante 30 seg a 95°C	40 ciclos de desnaturalización durante 30 seg a 95°C; *"annealing"* durante 30 seg a 50º C; elongación durante 30 seg a 72ºC.	1 ciclo de extensión final durante 5 min a 72ºC

Los productos de segunda ronda de la PCR se corren en un gel de agarosa al 2% (ver reactivos).
Condiciones de corrida del gel: 30 minutos a 120 voltios
Positivo: presencia de banda de los productos de la segunda ronda de tamaño 385 pb.
Esta PCR se debe utilizar solamente con fines de confirmar *C psittaci*. Además sus productos se pueden purificar (kit para purificar productos de PCR) y luego enviar a secuenciar para establecer GENOTIPOS.

Detección de Anticuerpos IgG para *Chlamydia* spp. por inmunofluorescencia.

Reactivos	Aparatos
Improntas marca BION CH 4212 (Chlamydia) Sueros controles positivo y negativo Buffer PBS PH: 7.6 (1 X) Anti- Human -IgG FICT marca SIGMA (F3517) (Titular cada cuatro meses) Azul de Evans diluído 1/30.000 en buffer PBS PH: 7.6 (1 X) Glicerina Buffereada PH: 8.4	Micropipeta 0.5 - 10 µl Micropipeta *40* a 200 µl Incubador a 35-37°C

Diluciones del suero en PBS pH 7,6 1X

Diluir c.s. de suero en PBS para obtener títulos de 40, 80, 160, 320, 640 En éste caso, para la primer| dilución agregar 10 ul de suero a 390 ul de PBS. Posteriormente realizar diluciones al medio. Elegir cuantas diluciones uno podrá sembrar respetando siempre la mínima y máxima
Tratar a los controles positivo y negativo de la misma manera.

Reacción de Inmunofluorescencia

Realizar el esquema de la impronta ubicando al control positivo, al control negativo y a las muestras.
Recordar que cuando se determinan anticuerpos de clase IgG y se poseen el par de sueros, se deben procesar ambos en paralelo.
Agregar 15 µl de la dilución de los controles positivo, negativo y muestras en los pocillos correspondiente.
Incubar durante 30 minutos en cámara húmeda a 37 ºC.
Lavar tres veces durante 10 min. con solución tamponada PBS PH:7.6.
Secar al aire.
Agregar 10 µl de anti IgG-Human-FICT (dil.1:40 en azul de Evans) a todos los pocillos.
Incubar durante 30 min. en cámara húmeda a 37ºC.
Lavar tres veces con solución tamponada PBS PH:7.6 durante 10 min.
Secar al aire.
Montar con glicerina tamponada pH 8.0.
Observar al microscopio de luz fluorescente con un objetivo de 20X y 40X.

Lectura de resultados.

Se deben observar inclusiones fluorescentes características (*Chlamydophilas* spp) Cuerpos Reticulados (CR) y elementales (CE).

Interpretación de resultados.

Positivo: presencia de estructuras verde fluorescente fuerte (>+++) detalladas anteriormente (CR y CE).
Negativo: ausencia de fluorescencia o fluorescencia débil (++).

Diagnóstico molecular para detección de *C. psittaci* en muestras de aves

Tipos de muestras: Hisopado cloacal, conjuntival, materia fecal, órganos obtenidos en la necropsia (pulmón, saco aéreo, hígado, bazo)
Para la toma de hisopados, se recomienda utilizar Hisopos FLOQ Swab (COPAN Cód. 503CS01) y colocarlos en tubos con medio de transporte, preferentemente UTM COPAN. Como alternativa se pueden utilizar hisopos de rayón o dacrón y colocarlos en tubos estériles. Las muestras de órganos deben ser colocadas en tubos con medio de transporte, preferentemente UTM COPAN (refrigerar), o recipientes estériles (refrigerado o congelado).
Las muestras deben ser enviadas refrigeradas y en condiciones de bioseguridad adecuadas.

Extracción de ADN por columna con kit de Quiagen DNAeasy Blood and tissue Kit Cat N° 69504 o similar (para 50 determinaciones). Realizar el procedimiento según el instructivo del KIT.

I) PCR en Tiempo Real para Familia *Chlamydiaceae*

Secuencia blanco: *23S rRNA*

Técnica de referencia: Ehricht R.et al." Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies" Mol. and Cell Probes, 2006; 20:60–63.

Cebadores:

Ch23S-F 5´-CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T-3´

Ch23S-R 5´-ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC-3´

Sonda:

Ch23S-p FAM-5´-CTC ATC ATG CAA AAG GCA CGC CG-3´-TAMRA

Protocolo de ciclado:

95°C 10 minutos

45 ciclos: 95°C 15 segundos, 60°C por 60 segundos.

Positivos: CT<38,5

II) PCR en Tiempo Real específica para *Chlamydia psittaci*,

Secuencia blanco: gen *ompA*,

Técnica de referencia: Pantchev A. et al. "New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples". The Veterinary Journal, 2009; 181: 145–150

Cebadores:

CppsOMP1-F 5´-CACTATGTGGGAAGGTGCTTCA-3´

CppsOMP1-R 5´-CTGCGCGGATGCTAATGG-3´

Sonda:

CppsOMP1-S FAM-5´-CGCTACTTGGTGTGAC-3´-TAMRA (Sonda MGB)

Protocolo de ciclado: 95°C 10 minutos

45 ciclos: 95°C 15 segundos, 60°C por 60 segundos

FICHA ACOMPAÑANTE DE MUESTRAS PARA EL ESTUDIO DE Psitacosis

1.- **DATOS DEL PACIENTE**

Apellido y nombre……

edad: **sexo:** **Protocolo N°.....**

Domicilio:..... Localidad.....

Provincia.....CP……. Tel…….

2.- **DATOS DEL CENTRO ASISTENCIAL**

Nombre de la Institución:……

Domicilio-……..Localidad……

Provincia……CP……Tel/Fax……..

Nombre del Médico:……e.-mail…….

3- **DATOS DEL CENTRO ASISTENCIAL animal**

Nombre de la Institución……

Domicilio-……..Localidad……

Provincia……CP……Tel/Fax……..

Nombre del Médico Veterinario:……
e.-mail…….

3.- **DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Ocupación……

Contacto con aves sanas Si □ No □ Aves enfermas Si □ No □
Loro □ Catitas □ Cotorra Australiana □ Otros……

Lugar de adquisición: Veterinaria □ Pajarería □ Venta ambulante □ Otros □
Localidad……Provincia……
Síntomas Clínicos del ave……
Contacto familiar con Psitacosis o infección respiratoria. Si □ No □ N/C

4.- **DATOS CLÍNICOS Y RESULTADOS DE ESTUDIOS AL INGRESO (Humano)**

Fecha de inicio de síntomas...../...../..... Fecha de internación...../...../.....

DIAGNÓSTICO CLÍNICO : PSITACOSIS Si □ No □ IRAB (NAC) Si □ No □

IR ALTA Si □ No □ HANTAVIRUS Si □ No □

EXTRAPULMONARES Si □ No □ Alteraciones del SNC □

Síndrome febril prolongado (SFP) □ Alteraciones renales □ Otras □

Patología de base Si □ No □ Nombrar…….

- **LABORATORIO AL INGRESO**

Hemograma GR: N□ B□ Leucocitos: N□ E□ Neutrófilos E□ Linfocitos E□

Plaquetas N□ B □ Enzimas Hepáticas N□ E□ % Sat. de Oxigeno

- **OTROS**

IMAGEN DE RX DE TÒRAX…….

TIPO DE NAC…….

5.- **MUESTRAS (Humanas)**

Fecha de extracción……/……/…….

INFECCIONES RESPIRATORIAS: Esputo□; HNF □; ANF □; BAL □

Sueros 1º □ 2º □

MANIFESTACIONES EXTRAPULMONARES: LCR □ Sangre □ Biopsia □
Sueros 1º □ 2º □

DIFERENCIAL HANTAVIRUS: Sueros 1º □ 2º □

l

MUESTRAS (animal)

Concurrir al Centro de Zoonosis de su localidad para la toma y envío de muestras al Instituto de Zoonosis Luis Pasteur.
Av. Díaz Vélez 4821 CP 1405 CABA. Tel 011-4958-9941/9914
E mail: lbiológico@yahoo.com.ar

Fecha de extracción……/……/…….
Animales vivos:
Hisopado Ocular □; Hisopado Cloacal □;
Animales muertos:
Remitir el cadáver congelado o refrigerado

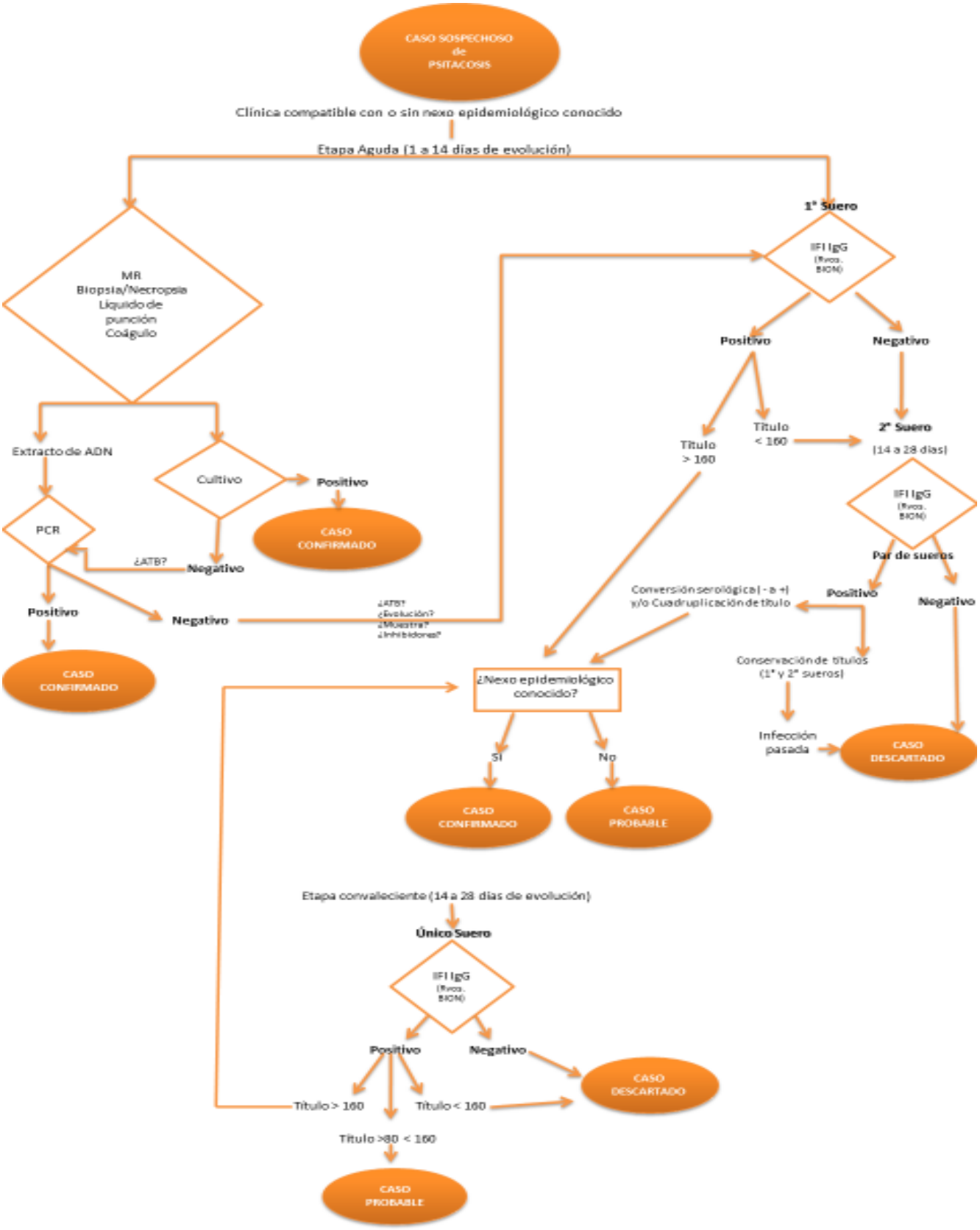
Firma y sello del médico tratante:

Servicio: Bacteriología Clínica- Departamento de Bacteriología.
Tel. 4303- 1807/11 (int.116). Tel. directo- fax: 4301- 9346
Instituto de Zoonosis Luis Pasteur. Dpto Diagnóstico y Producción de productos biológicos. Tel 011-4958-9941/9914

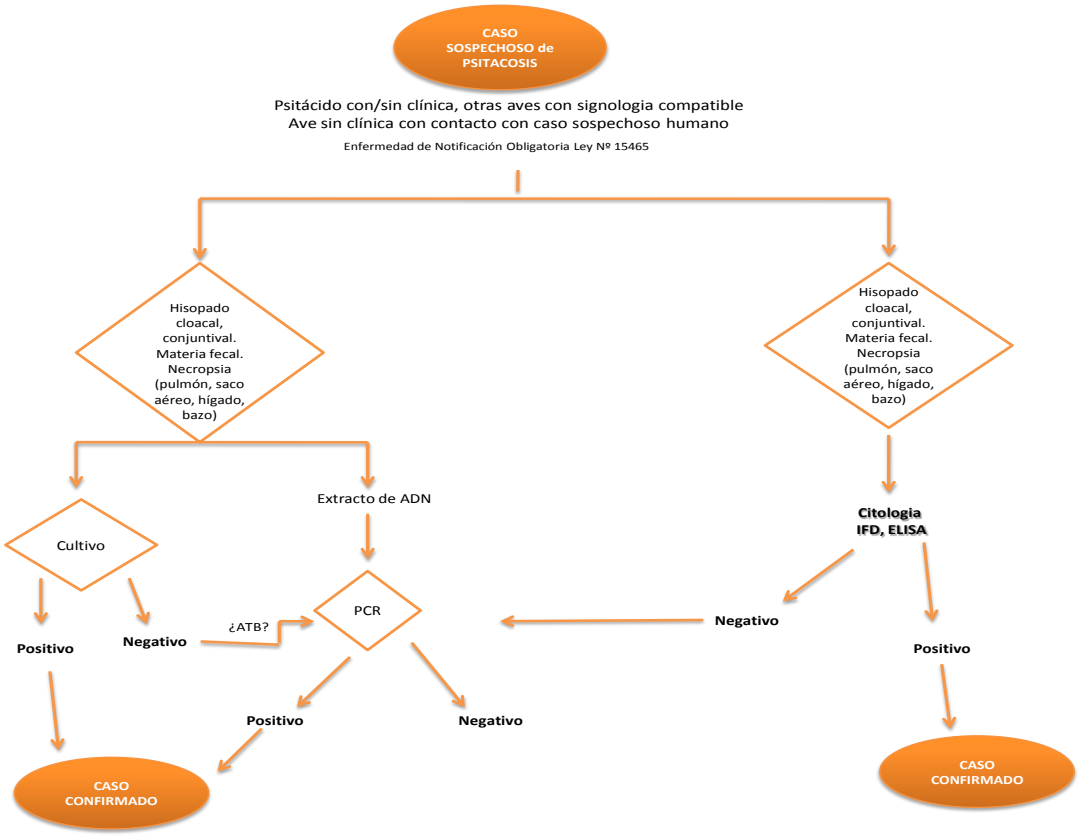
Bibliografía

1. Trudy O. Messmer, Stephen K. Skelton, Jhon F. Morones, Hary Daugharty, and Barry S. Field. Application of Nested, Multiplex PCR to Psitacosis outbreaks" Journal Clinical Microbiology, Aug,.1997, p.2043-2046 Vol. 35"
2. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DS, Jolley KA, Keijzers WC, Vretou E, Maiden MC, Vanrompay D, van der Ende A. Multilocus sequence typing of Chlamydia reveals an association between Chlamydia psittaci genotypes and host species. PLoS ONE. 2010; 5:e14179
3. Sachse K, Hotzel H. Detection and differentiation of Chlamydiae by nested PCR. Methods Mol Biol. 2003;216:123-36
4. Stephens RS, Myers G, Eppinger M, Bavoil PM. Divergence without difference: phylogenetics and taxonomy of Chlamydia resolved. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 55:115-9.
5. Heddema ER, van Hannen EJ, Duim B, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Pannekoek Y. Genotyping of Chlamydophila psittaci in human samples. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1989–90.
6. Harkinezhad T, Geens T, Vanrompay D. Chlamydophila psittaci infections in birds: a review with emphasis on zoonotic consequences. Vet Microbiol. 2009; 135:68-77.

FLUJOGRAMA DEL LNR PARA LA CONFIRMACIÓN DE CASOS EN PSITACOSIS HUMANA



FLUJOGRAMA DEL LNR PARA LA CONFIRMACIÓN DE CASOS EN PSITACOSIS AVIAR



Chlamydia pneumoniae

INDICE

Agente etiológico 60
Epidemiología de *C. pneumoniae* Biovariedades y Genotipos 60-61
Patogenia 61
Trasmisión 61-62
Características moleculares 62-63
Métodos diagnósticos 63
Características moleculares 62-63
Nested PCR *C. pneumoniae* 63
Extracción de ADN 64
Reactivos 65
Condiciones de ciclado 66
Revelado de PCR para *Chlamydia pneumoniae* 66
Interpretacion de resultados fragmento *Pste* del gen *rpoB* para *Chlamydia pneumoniae* 67-68
Ficha acompañante de psitacosis 69-71
Ficha acompañante de *M. pneumoniae y C. pneumoniae* 72-73

Bibliografía 74-75

Agente etiológico:

Chlamydia pneumoniae es el nombre actual de la anteriormente denominada cepa TWAR de la especie *C. psittaci*, tal denominación provenía de las letras de identificación de los laboratorios que realizaron los dos primeros aislamientos: cepa TW-183 aislada de la conjuntiva de un niño en Taiwán en 1965 (1) y cepa AR-39 proveniente de un aislamiento faríngeo de un estudiante de la Universidad de Washington con faringitis en 1983; pero estudios posteriores de homología de ácido desoxirribonucleico (ADN) y microscopía electrónica demostraron que correspondía a la especie *C. pneumoniae*.(2)

C. pneumoniae presenta una distribución universal y estudios seroepidemiológicos han demostrado que más del 60% de la población adulta mundial presenta anticuerpos dirigidos a este patógeno, lo que corrobora el hecho de que la mayoría han sido expuestos a este patógeno en algún momento de su vida y que las reinfecciones son comunes principalmente en personas de edad avanzada, ya que los anticuerpos contra *C. pneumoniae* no protegen frente al desafío de una nueva infección (3).

Epidemiología de *C. pneumoniae*

Biovariedades y Genotipos

La clasificación en biovariedades se basa fundamentalmente en diferencias en las secuencias nucleotídicas de los genes *16S rRNA*, *23S rRNA*, *ompA* y rango de hospedero.

Las biovariedades: humana, equina y marsupial, cuyos hospederos naturales son el hombre, los caballos y el koala respectivamente (Everett et al, 1999), esta última también ha sido descrita en anfibios y reptiles del continente Australiano (Bodetti et al, 2002).

Los datos sobre la determinación del genotipo de las cepas humanas y animales de *C. pneumoniae* son limitados. Para los fines de genotipificación se utiliza como blanco a la región variable IV del gen *ompA,* por ser la región de mayor variabilidad logrando caracterizar a 4 genotipos (Bodetti et al, 2002; Cochrane et al, 2005; Kutlin et al, 2007).

El genotipo A, de distribución cosmopolita, aislado en humanos y animales (reptiles y anfibios). El genotipo B solo fue detectado en equinos en el Reino Unido en 1990. El

genotipo C fue aislado en cuadros respiratorios de marsupiales y anfibios en Australia. El genotipo D solo detectado en anfibios en USA en el año 2000 (Bodetti et al, 2002).

Debido a la similitud entre las secuencias humanas y animales, Mitchell et al, 2010 sobre la base de 21 regiones polimórficas propuso que los aislamientos de *C. pneumoniae* se corresponden a cinco genotipos (A-E). Estos cinco genotipos mostraban una distribución geográfica distinta entre los aislamientos estudiados.

El genotipo A era común entre los animales australianos. Genotipo B fue detectado en los aislamientos africanos. El genotipo C de distribución mundial era el genotipo más comúnmente identificado. El genotipo D era exclusivo de los aislamientos indígenas australianos y el E era el genotipo de *C. pneumoniae* más variable y comprendía la única cepa detectada en equinos del Reino Unido. Sin embargo debido a la dificultad y costo de este ensayo, esta clasificación se la utilizó solo en este estudio.

Patogenia

C. pneumoniae es un patógeno respiratorio, causante de infecciones respiratorias altas y bajas. Constituye la tercera causa de neumonía adquirida en la comunidad (NAC) en adultos, con frecuencias que fluctúan entre 3,4% y 15%. Las infecciones son más frecuentes en adultos mayores y en pacientes que presentan patología respiratoria crónica, lo que otorga a los cuadros una mayor letalidad. Actualmente ha sido asociado a enfermedades crónicas como el Asma, Alzheimer, Sarcoidosis, Esclerosis múltiple y Aterosclerosis (ATE), aunque todavía estas últimas relaciones son controvertidas entre los investigadores (Cuffini et al, 2006).

Transmisión

C. pneumoniae se trasmite de persona a persona por gotitas o fómites al estornudar o toser, por lo que constituye un patógeno de gran capacidad de dispersión (Rodolakis y Yousef Mohamad, 2010). No está confirmada la transmisión de animal a humano y viceversa.

C. pneumoniae comienza infectando las células epiteliales de las vías respiratorias y monocitos. La capacidad de infectar monocitos posibilita la diseminación a localizaciones anatómicas alejadas del aparato respiratorio.

No existe variación estacional en la incidencia de esta infección; se puede presentar en forma epidémica o endémica. Las epidemias afectan al 60 a 80 % de la población, predominan en personas jóvenes y en particular en comunidades cerradas.

Inicialmente *C. pneumoniae* fue considerado un patógeno exclusivamente humano; sin embargo, varios estudios demostraron que esta bacteria también causa infecciones oculares, respiratorias y urogenitales en una amplia variedad de especies animales, incluyendo koalas, caballos, ranas y reptiles (Berger et al, 1999; Bodetti et al, 2002; Cochrane et al, 2005; Hotzel et al, 2001; Jacobson et al, 2004; Storey et al, 1993; Mitchell et al, 2010).

En la región central de nuestro país se realizó por primera vez la caracterización genética de *C. pneumoniae* revelando la presencia del genotipo A en muestras de humanos, reptiles, aves y mamíferos no humanos cuyas secuencias estuvieron estrechamente asociadas entre sí. En aves en cautiverio de esta región se identificó la tradicionalmente estudiada *C. psittaci*, sin embargo, se halló por primera vez y con mayor frecuencia a *C. pneumoniae* (Frutos et al, 2015). Además, se evidenció una exacerbación de la respuesta inmune en trabajadores de un centro recreativo en contacto rutinario con reptiles infectados por *C. pneumoniae* (Frutos et al, 2014).

El hallazgo exclusivo de *C. pneumoniae* en humanos con enfermedad respiratoria y la detección de estas bacterias en animales de compañía incautados en domicilios particulares plantea la existencia de posibles ciclos zoonóticos y por lo tanto la necesidad de empezar a considerar la inclusión de estas bacterias en el diagnóstico diferencial de las infecciones respiratorias en nuestra región.

Características moleculares

C. pneumoniae presenta un genoma compuesto por 1.2 Mega bases y presenta 688 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs). La relación de transiciones: transversiones se ha determinado a 2.7:1 para sinónimo SNPs, 1.4:1 para nonsynonymous SNPs, 1: 1,07 para los SNPs en las regiones intergénicas y 1:2 para los genes de ARN. SNPs de todas

las clases se distribuyeron homogéneamente por todo el genoma (Rattei y col. 2007). Esta bacteria comprende 21 genes, todos los cuales con transcriptos. Diez de las proteínas han sido detectadas en los Corpúsculos elementales y ocho de ellas se expresan entre las 36 y 48 horas post infección. *C. pneumoniae* presenta en su membrana externa un gran número de proteínas denominadas *Pmps*, proteína de 15-kDa rica en cisteína (*crpA*), Porina b (*porB*), Proteína de 9-kDa (*omp3*), Proteína de 60 kDa (*omp2*) y 4 Dominios Variables (VD) de la Proteína Mayor de Membrana (*MOMP*) codificadas por una familia de genes polimórficos.

El análisis por Western blot de la respuesta serológica muestra ausencia de reactividad a *rpoβ* y *omp3* de *C. pneumoniae* y reactividad cruzada con *omp2* de *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* y solo los Dominios Variables (VD) 2 y 3 fueron específicos.

Métodos diagnósticos

Aunque la serología ha sido por largo tiempo el método de elección para detectar la respuesta inmune a una infección por *C. pneumoniae*, se han desarrollado métodos basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa para detectar la presencia del ADN bacteriano en aspirado nasofaríngeo, hisopado faríngeo y en biopsias. El aislamiento en cultivos celulares es aún considerado el método patrón (6), pero resulta difícil aislar ciertas bacterias como *C. pneumoniae* porque son muy exigentes, sin embargo se logra detectar su ADN a partir de muestras clínicas.

Métodos moleculares: Nested PCR *C. pneumoniae.*

Objetivo. Detectar en muestras clínicas el ADN específico de *C. pneumoniae.* El protocolo utiliza como blanco de amplificación el fragmento *Pst*I del genoma de *C. pneumoniae*. En una primera reacción, con iniciadores o "primers" desarrollados por Campbell et al, 1998 se obtiene un producto de amplificación de 474 pb. En una segunda reacción, anidada, se utilizan los iniciadores diseñados por Maas et al, 1998 obteniéndose un fragmento de 128 pb.

Muestras humanas

Aspirado nasofaríngeo

Hisopado faríngeo

Muestras de tejidos

Extracción de ADN:

1.- "Kit" comercial según instrucciones del fabricante

2.- método fenol cloroformo

- Agregar 1 volumen (200 μl) de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) al ADN obtenido de la etapa anterior
- Agitar en vórtex por 30 seg
- Centrifugar a 10. 000 r.p.m. x 5 min
- Tomar la fase superior (acuosa) y colocar en tubo nuevo
- Agregar 1 volumen (200 μl) de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1)
- Agitar en vórtex por 15 seg
- Centrifugar a 10. 000 r.p.m. x 5 min
- Tomar la fase superior (acuosa) y colocar en tubo nuevo
- Repetir paso 1 al 7 si fuese necesario
- Agregar 1/10 Vol. (20 μl) de Acetato de Sodio 3M pH 5,2 y 500 μl de ETOH absoluto
- Guardar a –20 C durante 2 horas ó más
- Centrifugar a 13.000 r.p.m. durante 20 minutos
- Lavar con 200 µl de ETOH 70% y agitar brevemente en vórtex solo para lavar
- Centrifugar 5 minutos a 13. 000 r.p.m.
- Remover ETOH 70%
- Secar el pellet en la estufa (Aproximadamente 30 min)
- Resuspender en 70 μl de H2O ultra pura

Las condiciones para optimizar la PCR que amplifica el fragmento PstI de C. pneumoniae se detallan a continuación:

Reactivos

Iniciadores o cebadores para la primera PCR:

HL1 5' GTT GTT CAT GAA GGC CTA CT 3'.

HR1 5'TGC ATA ACC TAC GGT GTG TT 3'

Iniciadores o cebadores para la segunda PCR:

N-1 5' AGT TGA GCA TAT TCG TGA GG 3'

N-2 5' TTT ATT TCC GTG TCG TCC AG 3'

Concentraciones de los reactivos y características del programa de la PCR

2.1 PRIMERA REACCION (Campbell et al, 1998)

REACTIVO	**1X (µl)**
H_2O	16
5X BUFFER	10
$MgCl_2$(25mM)	5
dNTP(200uM)	5
HL1(10µM)	2
HR1(10µM)	2
----------DNA	*Taq*
polimerasa	0.5 (5u/ul)

Repartir 40 µl por tubo + Templado 10

SEGUNDA REACCION (Maas et al, 1998)

REACTIVO 1X(µl)

H_2O	26
5 X BUFFER	10
$MgCl_2$(25 mM)	5
dNTP(200µM)	5
N1 (10µM)	2
N2 (10µM)	2

DNA *Taq* polimerasa 0.5 (5u/ul)

Repartir 49 µl por tubo + Templado 1 µl de la primera reacción.

Condiciones de Ciclado

Ciclado:

Desnaturalización 4 min a 94ºC

35 ciclos de:

Desnaturalización 1 min a 94ºC

Hibridación 1 min a 53ºC

Elongación 1 min a 72ºC

Elongación final 7 min a 72ºC

Revelado de PCR para *C. pneumoniae*:

Para visualizar el producto amplificado se prepara un gel de agarosa (1,5%) en buffer TBE 1X con bromuro de etidio (0,5 ug/ml) y se revela en un transiluminador de luz UV (Figura 1 y 2).

Interpretación de resultados de PCR. Fragmento *PstI* del gen *rpoβ C. pneumoniae:*

Se consideran negativas aquellas muestras que en el revelado de la amplificación, no se observa la banda correspondiente a 128pb y se consideran positivas cuando se observa la banda de 128pb.

A las muestras que resultaron negativas se les agregan controles positivos internos (100 UFI/ml) con el fin de determinar la presencia de inhibidores de la reacción y también se puede realizar la PCR a β-globina.

La sensibilidad de la PCR optimizada en nuestro laboratorio es de 1 UFI, y al evaluar su especificidad no se observa productos amplificados a partir de los inóculos de las otras especies chlamydiales.

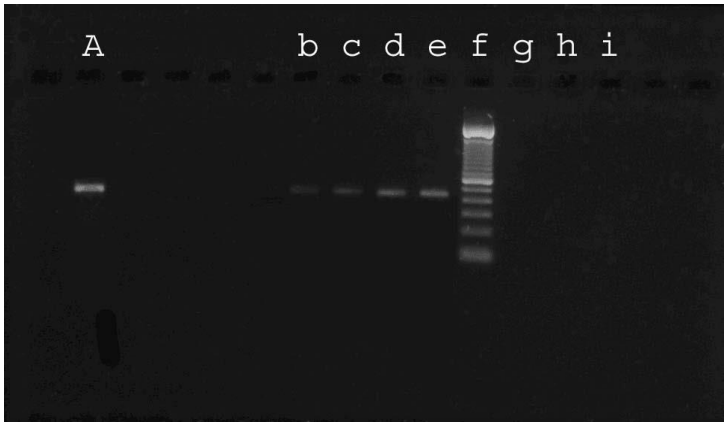


Figura 1: Se observan las bandas de 474 pares de bases del producto amplificado de la secuencia del fragmento *PstI* de *C. pneumoniae* correspondiente a la curva de sensibilidad (calles b al e: 0,1 a 1000 UFI); el control de DNA (100pb) en la calle f y los controles de las especies *C. trachomatis, C. pecorum* y *C. psittaci (1000UFI)* en las calles g a i. La calle A corresponde a una positiva para *C. pneumoniae*.

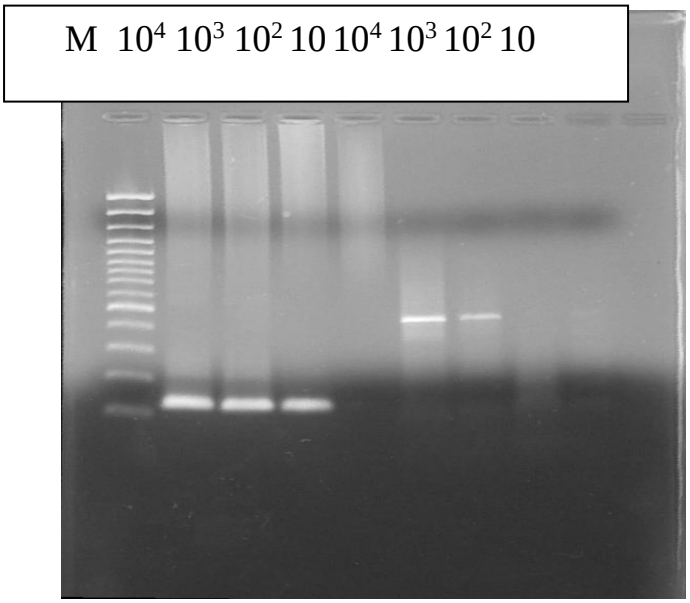


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa que muestra la sensibilidad analítica de la PCR para la amplificación de *PstI* de *C. pneumoniae* anidada con iniciadores externos HL1 y HL2 e internos N1 y N2 (parte izquierda del gel). En la parte superior se indica el Nº de corpúsculos elementales de la cepa AR-39, por reacción de PCR. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Bibliografia

Gordon F. B., A.L. Quan. 1965. Occurrence of glycogen in inclusion of the psittacosis-LGV-trachoma group. J. Infect. Dis.115:186-196.

Grayston J. T., L. A. Campbell, C. C. Kuo, C. H. Mordhorst, P. Saikku, D. H. Thom, S. P. Wang. 1990. A new respiratory tract patogen: *C.pneumoniae* strain TWAR. J. Inf. Dis. 161:618-625.

Saikku P., Leinonen M., K. Mattila, M. R. Ekman, M. S. Nieminen, P. H. Makela, V. Vatomen.1988. Serological evidence of an asociation of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute miocardyal infarction. Lancet. 2:983-986.

Berger L, Volp K, Mathews S, Speare R, Timms P. *Chlamydia pneumoniae* in a free-ranging giant barred frog (*Mixophyes iteratus*) from Australia. J Clin Microbiol 1999; 37:2378-2380.

Bodetti T, Jacobson E, Wan C. Molecular evidence to support the expansion of the host range of *Chlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. Syst Appl Microbiol. 2002; 25:146-152.

Campbell LA, Perez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT**.** Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:434-9.

Cochrane M, Walker P, Gibbs H, Timms P. Multiple genotypes of *Chlamydia pneumoniae* identified in human carotid plaque. Microbiol 2005; 151:2285-2290.

Cuffini C, Guzmán LA, Villegas N, Alonso CE, Riera LM, Rodríguez Fermepín M. Isolation of *Chlamydophila pneumoniae* from Atheromas of the Carotid Artery and their antibiotics susceptibility profile. Microbiol Clín 2006; 24:81-85.

Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order Chlamydiales, proposal of Parachlamydiaceae fam. nov. and Simkaniaceae fam. nov. each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the order Chlamydiales, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. Int J Syst Bacteriol 1999; 49:415-440.

Frutos MC, Monetti M, Ré VE, Cuffini CG. Molecular evidence of *Chlamydia pneumoniae* infection in reptiles in Argentina. Rev Arg Microbiol 2014; 46(1):45-48.

Frutos MC, Monetti MS, Gallo Vaulet L, Cadario ME, Rodriguez Fermepin M, Ré VE, Cuffini CG. Genetic diversity of *Chlamydia* among captive birds from central Argentina. Avian pathol 2015; 44(1):50-56.

Hotzel H, Grossmann E, Mutschmann F, Sachse K. Genetic characterization of a *Chlamydophila pneumoniae* isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars. Syst Appl Microbiol 2001; 24:63-66.

Jacobson ER, Heard D, Andersen AA. Identification of *Chlamydophila pneumoniae* in an emerald tree boa, *Corallus caninus*. J Vet Diagn Invest 2004; 16:153-154.

Mass M, Bartels C, Engel PM, Mamat U, Sievers HH. 1998. Endovascular presence of viable *Chlamydia pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 31:827-2.

Mitchell C, Hutton S, Myers G, Brunham R, Timm, P. *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions. PLoS Pathog 2010; 6(5):e1000903. doi:10.1371/journal.ppat.1000903.

Rattei T, Ott S, Gutacker M, Rupp J, Maass M, Schreiber S, Solbach W, Wirth T, Gieffers J. Genetic diversity of the obligate intracellular bacterium *Chlamydophila pneumoniae* by genome-wide analysis of single nucleotide polymorphisms: evidence for highly clonal population structure. BMC Genomics 2007; 8:355-366.

Rodolakis, A. Yousef Mohamad, K. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. Vet Microbiol 2010; 27: 140 (34):382-391.

Storey C, Lusher M, Yates P, Richmond S. Evidence for *Chlamydia pneumoniae* of non-human origin. J Gen Microbiol 1993; 139:2621-2626.