



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Identificación *in silico* de epítopes inmunogénicos en fragmentos de la Proteína de Membrana Polimórfica (POMP90) en un aislado de *Chlamydia abortus* de origen mexicano”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

M. en CARN. FERNANDO DE JESÚS ALDAMA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Noviembre 2022



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“Identificación *in silico* de epítopes inmunogénicos en fragmentos de la Proteína de Membrana Polimórfica (POMP90) en un aislado de *Chlamydia abortus* de origen mexicano”

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

M. en CARN. FERNANDO DE JESÚS ALDAMA

COMITÉ DE TUTORES

**Dr. en C. Roberto Montes de Oca Jiménez
Dr. en C. Jorge Antonio Varela Guerrero
Dra. en C. Beatriz Arellano Reynoso**

**Tutor Académico
Tutor Adjunto
Tutor Adjunto**

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Noviembre 2022

“Lo bueno de la ciencia es que es cierta creas en ella o no”

Neil deGrasse Tyson

RESUMEN

El Aborto Enzoótico Ovino es una enfermedad infecto contagiosa provocada por la bacteria Gram negativa e intracelular obligada *Chlamydia abortus*; la cual, es una enfermedad de distribución mundial de potencial zoonótico ampliamente documentado. El diagnóstico de este agente suele ser complejo por su naturaleza intracelular, para ello se deben emplear pruebas como aislamiento y prueba de reacción en cadena de la polimerasa específica. Adicionalmente, para el diagnóstico en campo, se deben emplear pruebas serológicas lo que ahorra tiempos de toma y transporte de muestra al laboratorio. Sin embargo, algunas de estas pruebas que se comercializan en países de Europa tienen porcentajes de sensibilidad y especificidad bajos debido a las reacciones cruzadas que muestran los antígenos empleados frente a otros patógenos o especies del mismo género. Para lograr un diagnóstico más certero con este tipo de pruebas de serológicas, es necesario desarrollar prototipos con antígenos más específicos como las Pmp's, las cuales tienden a variar dependiendo la especie de la cual se sospecha, determinando *in silico* la presencia de epítomos específicos empleando nuevas tecnologías. El presente trabajo determinó de forma *in silico* la presencia de epítomos con potencial inmunogénico específicos contra *Chlamydia abortus* de dos fragmentos de la proteína PMP17G. Se realizó la clonación y secuenciación de los fragmentos y a partir del análisis de estos con el empleo de dos softwares bioinformáticos se detectó la presencia de epítomos contra *C. abortus* Pomp90-3 (ocho epítomos) y Pomp90-4 (un epítomo). El análisis *in silico* nos permitió predecir e identificar de manera eficiente epítomos específicos contra *C. abortus* en ambos fragmentos de la proteína, los cuales serán de utilidad para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y desarrollo de inmunógenos.

ABSTRACT

Ovine Enzootic Abortion is a contagious infectious disease caused by the Gram negative and obligate intracellular bacterium *Chlamydia abortus*; which is a worldwide disease with widely documented zoonotic potential. The diagnosis of this agent is usually complex due to its intracellular nature, for which tests such as isolation and specific polymerase chain reaction tests must be used. Additionally, for diagnosis in the field, serological tests must be used, which saves time in taking and transporting the sample to the laboratory. However, some of these tests that are marketed in European countries have low sensitivity and specificity percentages due to the cross-reactions that the antigens used show against other pathogens or species of the same genus. To achieve a more accurate diagnosis with this type of serological tests, it is necessary to develop prototypes with more specific antigens such as Pmp's, which tend to vary depending on the suspected species, determining *in silico* the presence of specific epitopes using innovative technologies. The present work determined *in silico* the presence of epitopes with specific immunogenic potential against *Chlamydia abortus* of two fragments of the PMP17G protein. The cloning and sequencing of the fragments was conducted and from their analysis with the use of two bioinformatic software, the presence of epitopes against *C. abortus* Pomp90-3 (eight epitopes) and Pomp90-4 (one epitope) was detected. The *in silico* analysis allowed us to efficiently predict and identify specific epitopes against *C. abortus* in both protein fragments, which will be useful for the development of diagnostic techniques and the development of immunogens.

ÍNDICE

No.	Contenido	Pag.
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1	Generalidades	5
2.2	Clasificación	6
2.2.1	Especies de <i>Chlamydia</i> spp. de interés veterinario	6
2.2.2	Especies de <i>Chlamydia</i> spp. que afectan a pequeños rumiantes	8
2.2.3	Candidatos para integrar como especies del género <i>Chlamydia</i> spp	10
2.3	Morfología	12
2.4	Ciclo de desarrollo	13
2.5	Factores de virulencia	14
2.6	Aborto Enzoótico Ovino	17
2.7	Transmisión	18
2.8	Diagnóstico	19
2.8.1	Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas	19
2.8.2	Aislamiento bacteriano	22
2.8.3	Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa	23
2.9	Tratamiento	24
2.9.1	Antibióticos	24
2.9.2	Inmunógenos	24
2.10	Nuevas tecnologías para el desarrollo de pruebas de detección de antígenos y prototipos vacunales	25
2.10.1	Inmunoensayos	26
2.10.2	Prototipos vacunales	26
2.10.3	Herramientas bioinformáticas	27
III.	JUSTIFICACIÓN	30
IV.	HIPÓTESIS	31

V.	OBJETIVOS	32
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	33
6.1	Microorganismos	33
6.2	Fragmentos del gen de la Proteína de la Membrana Polimórfica (POMP90)	33
6.3	Extracción de ADN de <i>Chlamydia abortus</i>	34
6.4	Identificación de los fragmentos 3 y 4 por reacción en cadena de la polimerasa	35
6.5	Clonación del gen de los genes de interés de <i>Chlamydia abortus</i> en <i>Escherichia coli DH5α</i>	35
6.5.1	Purificación de los fragmentos <i>pOMP-3</i> y <i>pOMP-4</i>	35
6.5.2.	Reacción de ligación al plásmido de clonaje pGEM®-T Easy	36
6.5.3	Preparación de cepas bacterianas quimiocompetentes de <i>Escherichia coli DH5α</i>	37
6.5.4	Trasformación de la cepas bacterianas quimiocompetentes de <i>Escherichia coli DH5α</i> con el vector de clonación pGEM®-T Easy recombinante por shock térmico	37
6.5.5	Selección de colonias de <i>Escherichia coli DH5α</i> transformadas	38
6.5.6	Banco de células de clones bacterianos recombinantes	38
6.5.7	Purificación y secuenciación de plásmidos recombinantes a partir de <i>Escherichia coli DH5α</i>	39
6.5.8	Purificación del plásmidos pGEM®-T Easy recombinantes	39
6.5.9	Análisis del plásmido pGEM®-T Easy recombinante por digestión enzimática	39
6.5.10	Identificación de epítomos con potencial inmunogénicos.	40
VII.	RESULTADOS	41
7.1	Análisis teórico de secuencias	41
7.1.1	Epítomos lineales de la proteína Pmp18D de <i>Chlamydia abortus</i>	42
7.1.2	Epítomos lineales de la proteína MOMP de <i>Chlamydia abortus</i>	43
7.1.3	Epítomos lineales de la proteína TARP de <i>Chlamydia abortus</i>	44
7.1.4	Epítomos lineales de la proteína CPAF de <i>Chlamydia abortus</i>	45

7.1.5	Epítomos lineales de la proteína GroEL de <i>Chlamydia abortus</i>	45
7.1.6	Epítomos lineales de la proteína MIP de <i>Chlamydia abortus</i>	46
7.1.7	Epítomos lineales del fragmento de la proteína POMP90-3 de <i>Chlamydia abortus</i>	47
7.1.8	Epítomos lineales del fragmento de la proteína POMP90-4 de <i>Chlamydia abortus</i>	47
7.2	Identificación molecular de los fragmentos POMP90-3 y POMP90-4 de la proteína de la membrana polimórfica de <i>Chlamydia abortus</i>	48
7.3	Clonación de los genes Pomp90-3 y Pomp90-4 de <i>Chlamydia abortus</i> en <i>Escherichia coli</i> DH5 α	49
7.4	Purificación de plásmidos recombinantes	50
7.5	Evaluación de los plásmidos pGEM [®] -T Easy recombinantes	50
7.5.1	Digestión enzimática de los plásmidos recombinantes	51
7.5.2	Reacción en Cadena de la Polimerasa de los plásmidos recombinantes	51
7.6	Secuenciación y análisis de los plásmidos recombinantes rOMP90-3 y rOMP90-4.	52
7.6.1	Análisis de secuencias del fragmento rOMP90-3 de <i>Chlamydia abortus</i>	53
7.6.2	Análisis de secuencias del fragmento rOMP90-4 de <i>Chlamydia abortus</i>	54
7.7	Predicción <i>in silico</i> de epítomos inmunogénicos	55
7.7.1	Identificación de epítomos inmunogénicos fragmento rOMP90-3	55
7.7.2	Identificación de epítomos inmunogénicos fragmento rOMP90-4 de <i>Chlamydia abortus</i>	58
VIII.	DISCUSIÓN	63
IX.	CONCLUSIONES	68
X.	SUGERENCIAS	69
XI.	BIBLIOGRAFÍA	70
XII.	ANEXOS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 20 regiones específicas en la proteína Pmp18D de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	42
Figura 2 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína MOMP de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	43
Figura 3 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 8 regiones específicas en la proteína TARP de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	44
Figura 4 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína CPAF de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	45
Figura 5 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína GroEL de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	46
Figura 6 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína MIP de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	46
Figura 7 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 9 regiones específicas en la proteína POMP90-3 de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	47
Figura 8 Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 3 regiones específicas en la proteína POMP90-4 de <i>Chlamydia abortus</i> . Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.	47
Figura 9 Identificación específica de los fragmentos 3 y 4 del gen de la proteína de la membrana polimórfica (POMP90) de <i>Chlamydia abortus</i> . Carril 1 y 8: Marcador de Peso Molecular, Carril: 2, 4 y 6. Fragmento 3 (245 pb) y Carril: 3, 5 y 7. Fragmento 4 (209 pb).	48
Figura 10 Identificación y selección de colonias transformadas con los vectores recombinantes. A) Colonias blancas que integraron el vector recombinante (círculos rojos). B) Colonias azules, integraron	49

un vector religado (círculos negros). Colonias satélite (círculos azules).

- Figura 11** Evaluación de la presencia de los plásmidos recombinantes de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4 después de la purificación. Carril 1 y 6, marcador de peso molecular. Carril 2 y 3, pGEM T- easy Pomp90-3. Carril 4 y 5 pGEM T- easy Pomp90-4 50
- Figura 12** Identificación de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4 a través de digestión enzimática con enzimas de restricción *NcoI* y *NdeI*. Carril 1, 5 y 8, marcador de peso molecular. Carril 2-4, pGEM T- easy (3015 pb) y rOMP90-3 (245 pb). Carril 4 y 5 pGEM T- easy Pomp90-4 (209 pb). 51
- Figura 13** Identificación específica de los fragmentos rOMP3 y rOMP4 por PCR a partir de las purificaciones de los plásmidos recombinantes. Carril 1, 6 y 11, Marcador de peso molecular. Carril 2-5 *Pomp90-3* (245 pb). Carril 7-10 *Pomp90-4* (209 pb). 52
- Figura 14** Alineación de la secuencia del fragmento rOMP90-3 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (Query) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (Sbjct). 53
- Figura 15** Alineación de la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-3 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (Query) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (Sbjct). 53
- Figura 16** Alineación de la secuencia del fragmento rOMP90-4 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (Query) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (Sbjct). 54
- Figura 17** Alineación de la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-4 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (Query) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (Sbjct). 54
- Figura 18** Epítomos predichos (ocho secuencias) por el programa “*BepiPred 2.0*” en la secuencia correspondiente al fragmento rOMP90-3, de tamaños variables (enmarcados en rojo). 56
- Figura 19** Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rOMP90-3 de *C. abortus*. Representación gráfica de cómo se estructuran teóricamente los epítomos discontinuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de ésta. 58

- Figura 20** Epítomos predichos (11 Epítomos) por el programa “*BepiPred 2.0*” en la secuencia correspondiente al fragmento rOMP90-4 (enmarcado en rojo). **59**
- Figura 21** Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*. Representación gráfica de cómo se estructuran teóricamente los epítomos discontinuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de esta. **60**

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1 Proteínas empleadas para la predicción <i>in silico</i> de epítomos inmunogénicos reportadas en el GenBank.	41
Cuadro 2 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína Pmp18D de <i>Chlamydia abortus</i> .	42
Cuadro 3 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína MOMP de <i>Chlamydia abortus</i> .	43
Cuadro 4 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína TARP de <i>Chlamydia abortus</i> .	44
Cuadro 5 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína CPAF de <i>Chlamydia abortus</i> .	45
Cuadro 6 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína CPAF de <i>Chlamydia abortus</i> .	46
Cuadro 7 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína CPAF de <i>Chlamydia abortus</i> .	46
Cuadro 8 Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína POMP90-3 de <i>Chlamydia abortus</i> .	47
Cuadro 9 Epítomo predicho, regiones específicas de tamaños variables predicha dentro de la proteína POMP90-4 de <i>Chlamydia abortus</i> .	47
Cuadro 10 Epítomos, secuencias de aminoácidos (residuos) predichos en el fragmento rOMP90-3 de <i>Chlamydia abortus</i> .	55
Cuadro 11 Cuatro epítomos discontinuos predichos en el fragmento rOMP90-3 de tamaños variables, específicos de <i>Chlamydia abortus</i>	57
Cuadro 12 Epítomo, secuencias de aminoácidos (residuos) predicho en el fragmento rOMP90-4 de <i>Chlamydia abortus</i> .	59
Cuadro 13 Tres epítomos discontinuos predichos en el fragmento rOMP90-4 de tamaños variables específicos de <i>Chlamydia abortus</i> .	60

I. INTRODUCCIÓN

El Aborto Enzoótico Ovino (AEO) es una enfermedad ocasionada por el patógeno intracelular obligado *Chlamydia abortus* (*C. abortus*); causante de pérdidas económicas considerables cuando se establece dentro de un rebaño ovino. Considerada una enfermedad de distribución mundial; la cual, ha sido reportada en diferentes zonas de América (Rojas *et al.*, 2018; Di Paolo *et al.*, 2019), Asia (Esmaeili *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Arif *et al.*, 2020), África (Djellata *et al.*, 2019; Benaissa *et al.*, 2020; Selim *et al.*, 2021) y Europa (Spičic *et al.*, 2015; Tejedor-Junco *et al.*, 2018; Santoro *et al.*, 2019), exceptuando Australia (Jelocnik *et al.*, 2019) y Nueva Zelanda (García-Seco *et al.*, 2016), países catalogados como libres de AEO por la *World Organization for Animal Health* antes *Office International des Epizooties* (WOAH, 2018).

En países de Europa como Inglaterra (Longbottom *et al.*, 2013) y España (García-Seco *et al.*, 2016) el uso de medidas de diagnóstico y control contra esta enfermedad se implementan de manera cotidiana, tanto en laboratorios de diagnóstico veterinario como en campo. Para ello la prueba empleada de manera rutinaria es la técnica de fijación del complemento; sin embargo, debido a la presencia de falsos positivos, su empleo ya no es recomendado (WOAH, 2018). La prueba de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA es de las pruebas más empleadas para el diagnóstico del AEO en campo; sin embargo, las desventajas que tienen algunas de estas pruebas comerciales son: que están desarrolladas con antígenos que comparten entre la mayoría de las especies del género *Chlamydia*, como resultado, la presencia de reacciones cruzadas (O'Neill *et al.*, 2018); lo cual, dificultan un diagnóstico cien por ciento confiable. A partir del año 2000 se han desarrollado algunas pruebas de ELISA que han resultado ser más específicas y sensibles desarrolladas a partir de la POMP90 recombinante (Longbottom *et al.*, 2001) y fragmentos recombinantes de esta misma proteína (Longbottom *et al.*, 2002), que son capaces de detectar animales infectados por este patógeno (Essig y Longbottom, 2015); a pesar de que este tipo de pruebas han tenido resultados prometedores, se recomienda complementarlas con pruebas de

carácter molecular como la Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (Sachse *et al.*, 2009).

El uso de bacterinas atenuadas también es implementado para el control de la infección por *C. abortus*; sin embargo, existe preocupación por su seguridad y eficacia en los rebaños en las cuales son administradas (Essig y Longbottom, 2015). Existen actualmente vacunas vivas e inactivadas disponibles en diferentes partes del mundo para el control del AEO, primeramente las inactivadas, desarrolladas a partir de bacterias completas cultivadas en huevos embrionados de gallina, cultivos celulares o fracciones de estas, reintroducida recientemente en 2014 en Europa Mydiavac (Benchmark Animal Health) (Essig y Longbottom, 2015). Por otra parte, la vacuna atenuada basada en una cepa mutante de *C. abortus* termosensible (cepa 1B; Enzovax, MSD Animal Health; vacuna Ceva *Chlamydia*, CEVA Animal Health), se ha implementado con éxito desde su introducción en la década de los 90's y actualmente se comercializa en países como: Reino Unido, Francia, Grecia, Italia, España y Suiza (Vorimore *et al.*, 2012); sin embargo, a pesar de la buena respuesta para frenar los abortos y una disminución significativa en la eliminación del patógeno en los rebaños inmunizados con dicha vacuna, se ha reportado que no confiere una protección total ya que la liberación del patógeno sigue estando presente y adicionalmente, se ha reportado el potencial de reactivación de la bacteria y por ende causar la enfermedad (Laroucau *et al.*, 2018). Posteriormente y con la finalidad de ofrecer vacunas más efectivas, se evaluó la eficacia de una nueva vacuna inactivada de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abortusovis y *Chlamydia abortus* manufacturada y comercializada actualmente en España (INMEVA®; Laboratorios Hipra S.A., Amer, España); la cual, contiene la cepa A22 de *C. abortus* inactivada por un método que involucra ácidos nucleicos. Esta vacuna tiene una mezcla de hidróxido de aluminio y dietilaminoetil (DEAE) dextrano como adyuvante. En el modelo natural, dicha vacuna ofreció una reducción (75%) sustancial en los problemas reproductivos de los animales desafiados y en la eliminación del patógeno (55%) durante los siguientes 21 días posteriores al aborto/parto (Montbrau *et al.*, 2020). En el último año, se desarrolló un estudio que evaluó dos vacunas experimentales desarrolladas a partir del complejo de membrana externa de

Chlamydia (COMC *chlamydial outer membrane complex*) vacuna 1 y octil-glucósido (OG-COMC) las cuales al ser comparadas con la vacuna comercial CEVAC determinaron la ausencia de abortos en estas; además, la concentración de diseminación bacteriana se redujo considerablemente entre un 87.5% y 86.4% respetivamente, el estudio determina una eficacia buena haciendo hincapié en determinar la dosis y las inoculaciones necesarias para aumentar sus beneficios (Livingstone *et al.*, 2021).

En México, el AEO es una enfermedad endémica y de reporte obligatorio antes las autoridades zoosanitarias a nivel nacional (DOF, 2018). En México *C. abortus* ha sido reportada en diversos estudios desde hace varios años, a partir de la década de los 90's se identificó como agente causal de abortos en rebaños ovinos (Escalante-Ochoa *et al.*, 1996) y un año después en rebaños caprinos (Escalante-Ochoa *et al.*, 1997).

A partir del año 2000 otros grupos de investigación desarrollaron investigaciones para determinar la presencia de este agente bacteriano en el territorio nacional, en el Estado de México en dos estudios realizados en Xalatlaco empleando pruebas de ELISA (21.3%) y PCR (0.65%) (Jiménez-Estrada *et al.*, 2008) y Almoloya de Juárez (Soriano-Vargas *et al.*, 2011). En 2014, en algunos municipios del Estado de México evaluaron muestras de suero de vacas lecheras para detectar la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* empleando una prueba de ELISA indirecta (0.73%), los resultados determinaron la presencia de animales seropositivos en bovinos de esta entidad. Posteriormente, se determinó la frecuencia de *C. abortus* en unidades de producción ovina ubicadas en diferentes municipios (Atlacomulco, Temascalcingo, Coatepec Harinas, Calimaya, Santa María Rayón, Tenango del Valle, Xonacatlán y Zumpango) este estudio empleo dos técnicas de diagnóstico, aislamiento (68.44%) para *Chlamydia* spp. y PCR (6.46%) específico para *C. abortus*, demostrando de este modo el establecimiento de este agente bacteriano en estos municipios (De Jesus-Aldama, 2019)

En el mismo año pero en rebaños caprinos con problemas de aborto provenientes de diferentes estados de la república (Veracruz, Jalisco, Coahuila, Querétaro y

Puebla), se identificaron muestras positivas a aislamiento (23.1%) y confirmatorio por PCR específico (9.6%) (Sánchez, 2014). En ese mismo estado, en rebaños caprinos lecheros se identificaron Ac contra *C. abortus* a través de una prueba de ELISA (4.87%); dichos animales seropositivos se identificaron en seis de las nueve unidades de producción evaluadas (66.6%) (Campos-Hernández *et al.*, 2014); Un año después, un estudio en rebaños caprinos lecheros del mismo identificaron al agente por medio de tres pruebas de diagnóstico, ELISA (9.60%), aislamiento (26.98%) y PCR (23.8%) (Mora *et al.*, 2015).

Más recientemente, en 2017 se evaluó la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* en equinos que convivían con ovinos seropositivos a *C. abortus*, en los rebaños evaluados se identificaron títulos de anticuerpos contra *C. abortus* en bovinos (48%), caprinos (12.5%) y ovinos (29.7%) que conviven con equinos (1.32%). Dicho estudio reveló que el 75% de los equinos seropositivos a *C. abortus* se obtuvieron en unidades de producción ovina seropositivas a *C. abortus* (Rubio-Navarrete *et al.*, 2017). Todos estos estudios han demostrado que el microorganismo se ha distribuido a lo largo de toda la república mexicana y que el contacto con animales enfermos está poco a poco provocando afectaciones al ser humano y también a animales que conviven con ellos. Aunque la evidencia sobre el establecimiento de *C. abortus* en México es cada vez más evidente, el uso de inmunógenos como método de diagnóstico para la prevención y control del AEO no son implementados en el país.

El objetivo del presente estudio fue la identificación *in silico* de epítopes inmunogénicos en los fragmentos 3 y 4 de la Proteína de la Membrana Polimórfica en un aislado de *C. abortus* de origen mexicano y que sirvan a futuro para el desarrollo de una prueba de ELISA indirecta específica para la identificación de anticuerpos contra *C. abortus* en ovinos provenientes de rebaños con historial de aborto en México.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades

Los integrantes de la familia *Chlamydiaceae* son un grupo de bacterias que se encuentran clasificadas dentro de un género único denominado *Chlamydia*, el cual; está ampliamente distribuido a nivel mundial, debido a que las especies que lo integran, tienen la capacidad de afectar diferentes especies animales y al humano (Taylor-brown *et al.*, 2015). Las bacterias del género *Chlamydia* spp. son organismos Gram negativos, intracelulares obligados, caracterizados por emplear un ciclo de desarrollo bifásico único; adicionalmente, cuentan con la capacidad de persistir en condiciones adversas en el organismo hospedador, evadir el sistema inmune (Entrican *et al.*, 2012a) y permanecer como infecciones latentes en el organismo hasta que las condiciones del medio les permitan desarrollarse con normalidad (Rodolakis y Laroucau, 2015). La capacidad de persistir y su naturaleza asintomática por parte de estas bacterias en el organismo hospedador ocasiona que en muchos casos no se realice un diagnóstico adecuado y provoque que los tratamientos aplicados no tengan efectos positivos ya que en la mayoría de los casos el agente se detecta en un grado avanzado de la enfermedad (Cheong *et al.*, 2019).

El género *Chlamydia* spp tiene la capacidad de causar afecciones en animales y en el hombre infectando tejidos oculares, tracto respiratorio y genital, causando diversas patologías, tales como: aborto (Rodolakis y Laroucau, 2015), neumonía (Roulis *et al.*, 2013), problemas gastrointestinales (Rank y Yeruva, 2014), encefalomiелitis, queratoconjuntivitis y artritis (Walker *et al.*, 2015), orquitis, vesiculitis seminal (Hireche *et al.*, 2016), epididimitis (Nunes y Gomes, 2014), entre otras. Algunas especies de este género tienen la capacidad de afectar a más de una especie animal y en casos más severos, pueden contagiar a humanos que entran en contacto con animales infectados, causando las mismas patologías dependiendo de la especie de *Chlamydia* spp. involucrada (Wheelhouse y Longbottom, 2012).

2.2. Clasificación

En el género *Chlamydia* spp. existen trece especies clasificadas taxonómicamente; las cuales, pueden causar enfermedades asintomáticas, agudas y crónicas; de las trece especies que conforman el género, solo dos afectan directamente al ser humano (Bommana y Polkinghorne, 2019). *C. trachomatis*, causa infecciones en tracto genital que pueden resultar en infertilidad; adicionalmente, puede causar ceguera parcial o total, tanto en mujeres como en hombres si no son diagnosticados y tratados de manera oportuna. *C. pneumoniae* afecta el tracto respiratorio, causando neumonía e incluso asma en individuos con la presencia de este patógeno en el organismo (Iramain *et al.*, 2016). Además, aquellas que pueden afectar animales como: *C. abortus*, *C. avium*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. gallinacea*, *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. poikilothermis*, *C. psittaci*, *C. serpentis* y *C. suis* (Sachse *et al.*, 2015; Bommana y Polkinghorne, 2019). Se han reportado y propuesto cinco candidatos a ser integrados a esta clasificación: *C. ibidis* (Vorimore *et al.*, 2013), *C. sanzinia* (Taylor-Brown *et al.*, 2016), *C. corallus* (Staub *et al.*, 2018), *C. buteonis* (Laroucau *et al.*, 2019) y *C. testudinis* (Laroucau *et al.*, 2020).

2.2.1. Especies de *Chlamydia* spp. de interés veterinario

Dentro de las especies que conforman al género *Chlamydia* spp. la mayoría causan afecciones en varias especies animales, entre ellas las aves domésticas (Sachse *et al.*, 2014), de vida silvestre o en cautiverio (Laroucau *et al.*, 2019), mamíferos (Rodolakis y Laroucau, 2015) y reptiles, estos últimos descubiertos en los últimos años (Bommana y Polkinghorne, 2019; Laroucau *et al.*, 2020). La mayoría de estas representan un problema de salud animal y zoonosis para personas que entran en contacto con animales infectados (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Chlamydia avium

Esta especie afecta principalmente aves como palomas y loros, su patogenicidad aún no se ha dilucidado completamente y la falta de información limita su comprensión (Sachse y Laroucau, 2015). Adicionalmente, las patologías que causa

esta especie bacteriana son enfermedades de tipo respiratorio (Sachse *et al.*, 2014). Cabe mencionar que las especies de *Chlamydia* spp. tienden a presentarse como infecciones duales, una característica común entre las especies de este género bacteriano (Dean *et al.*, 2013).

Chlamydia caviae

Esta especie bacteriana afecta principalmente a cerdos de Guinea, causando conjuntivitis en la mayoría de los casos. Adicionalmente, *C. caviae* también ha sido identificada en otras especies animales como: conejos, perros, gatos y caballos (Pantchev *et al.*, 2010). El potencial zoonótico de esta especie de *Chlamydia* spp. ha sido descrito recientemente; en el cual, se detectaron casos de neumonía adquirida en la comunidad por transmisión por contacto directo con cerdos de Guinea (Ramakers *et al.*, 2017) y contagio indirecto (van Grootveld *et al.*, 2018).

Chlamydia felis

Agente causal de la influenza y problemas crónicos de conjuntivitis en gatos (Wons *et al.*, 2017). Los gatos infectados desarrollan signos clínicos como: fiebre, descargas de fluidos a través de los ojos y estornudos, con una predominante inflamación de la conjuntiva (Barimani *et al.*, 2019). El potencial zoonótico de esta bacteria ha sido descrito en diferentes estudios como un raro agente de conjuntivitis folicular, reportándolo como agente de esta enfermedad transmitida a una persona propietaria de un gato infectado (Wons *et al.*, 2017).

Chlamydia gallinacea

Esta especie bacteriana, tiende a infectar aves domésticas, gallinas de Guinea y patos. Sobre su capacidad de causar afecciones en el organismo, a la fecha no se han reportado casos específicos sobre su participación en cuadros clínicos de enfermedad en aves, ya que en casos clínicos; en los cuales, se sospecha de su participación, las aves afectadas no mostraron signología clínica o hubo presencia

de otros agentes patógenos, por lo cual, se sugirió que esta bacteria como un hospedero natural de las aves (Sachse y Laroucau, 2015).

Chlamydia pneumoniae

Esta especie bacteriana fue inicialmente descrita como un patógeno exclusivo en el humano; el cual, causaba infecciones agudas y crónicas en las vías respiratorias superiores e inferiores, además de enfermedades cardiovasculares (Campbell y Kuo, 2004). Adicionalmente, se ha reportado como agente causal de enfermedades en otras especies animales; tales como, caballos, koalas, bandicuts, reptiles y anfibios (Weinmaier *et al.*, 2015), causando infecciones en el tracto respiratorio como en el ser humano (Shima *et al.*, 2018). El potencial zoonótico de esta especie ha sido identificado y reportado mediante pruebas moleculares que evidenciaron que la transmisión de *C. pneumoniae* se dio por primera vez de un animal al humano (Myers *et al.*, 2009).

Chlamydia serpentis* y *Chlamydia poikilothermis

Identificadas a partir de hisopados cloacales y cloanales de serpientes clínicamente sanas pertenecientes a una colección en Suiza al igual que *C. corallus*. La diferencia entre *C. serpentis* y *C. poikilothermis* se determinó mediante su cultivo a dos temperaturas distintas (37°C para *C. serpentis* y 28°C para *C. poikilothermis*) esto, considerando las temperaturas corporales variables de los hospedadores de serpientes poiquilotérmicas. Al igual que las anteriores descritas anteriormente, su patogénesis y potencial zoonótico aún son desconocidos (Staub *et al.*, 2018).

2.2.2. Especies de *Chlamydia* spp. que afectan a pequeños rumiantes.

Dentro de este género bacteriano existen al menos tres especies que pueden causar infecciones en los pequeños rumiantes; de las cuales, dos de estas (*C. abortus* y *C. psittaci*) representan un riesgo potencial zoonótico causando afecciones similares en el hombre (Rodolakis y Laroucau, 2015; Longbottom y Coulter, 2003). Adicionalmente, también se ha reportado casos de afectaciones en

estos animales a causa de *C. caviae*, especie de origen porcino (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Chlamydia abortus

Agente causal del Aborto Enzoótico Ovino (AEO), enfermedad que está ampliamente distribuida a nivel mundial; la cual, causa pérdidas económicas en países que se dedican a la actividad pecuaria. La enfermedad provoca aborto en ovejas gestantes en el último tercio de la gestación o en algunos casos el nacimiento de corderos débiles que no superan las 48 horas de vida (Rodolakis y Laroucau, 2015). Actualmente es considerada la patología de origen clamidial de mayor importancia; ya que, representa un riesgo potencial zoonótico ocupacional y para mujeres embarazadas que están en contacto con animales infectados (Rodolakis y Laroucau, 2015). Además de causar abortos, provoca otras afecciones, tales como: enfermedad febril, desarrollo de coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal aguda y edema pulmonar (Johnson *et al.*, 1985), septicemia, lesiones importantes en hígado, riñón y corazón; cabe mencionar que estas patologías se presentaron posterior al aborto (Pospischil *et al.*, 2002), se describe también como agente causal de enfermedad pélvica inflamatoria (Walder *et al.*, 2003), shock séptico (Liu *et al.*, 2022) y recientemente en casos de neumonía (Imkamp *et al.*, 2022; Zhu *et al.*, 2022). En México la prevalencia de anticuerpos contra *C. abortus* se reportó en grupos de riesgo expuestos (trabajadores y médicos veterinarios) que estaban en contacto con rebaños con antecedentes de aborto (Barbosa Mireles *et al.*, 2013). Finalmente, también ha sido reportada como agente causal de problemas de neumonía (Ortega *et al.*, 2016), demostrado de este modo el potencial zoonótico de esta especie bacteriana.

Chlamydia psittaci

Bacteria de origen aviar que provoca psitacosis en aves y con riesgo potencial zoonótico comprobado. En los últimos cinco años se han realizado distintos estudios evidenciando el riesgo que representa esta especie bacteriana para el humano, principalmente por contacto con aves infectadas (Rodolakis y Laroucau, 2015). En

primera instancia causando psitacosis, ornitosis (Rodolakis y Laroucau, 2015) o neumonía atípica (Fossádal *et al.*, 2018). Asimismo, se ha reportado como agente causal de infecciones genitales en mujeres (Osman *et al.*, 2012). Se ha identificado en pacientes con enfermedades respiratorias; por ejemplo, neumonía en granjeros que trabajaban con animales infectados (Lagae *et al.*, 2014). De igual forma, se ha relacionado con neumonía, tosferina y conjuntivitis (Cadario *et al.*, 2017). No menos importante, asociando los posibles factores de riesgo involucrados en el contagio de la psitacosis en personas que manipulan aves (Čechová *et al.*, 2018; Tolba *et al.*, 2019). Recientemente, se reportó como agente causal en un brote relacionado con enfermedad respiratoria grave entre trabajadores de plantas de sacrificio de aves de corral en USA (Shaw *et al.*, 2019). Actualmente no existen reportes de contagio de *C. psittaci* de mamíferos al hombre.

Chlamydia pecorum

Esta bacteria se aloja de forma natural en el tracto digestivo y ocasiona enteritis; en la mayoría de los casos esta se presenta de manera subclínica, evitando así la detección oportuna de la enfermedad (Walker *et al.*, 2015). *C. pecorum* también, ha sido asociada con otras enfermedades, entre ellas: artritis, queratoconjuntivitis, encefalomiелitis, infertilidad, neumonía y mastitis, ocasionando pérdidas económicas en las unidades de producción (Walker *et al.*, 2015). A pesar de la gran variedad de patologías con las que ha sido relacionado este agente bacteriano, el potencial zoonótico de esta especie de *Chlamydia* spp. es aún desconocido (Rodolakis y Mohamad, 2010).

2.2.3. Candidatos para integrar como especies del género *Chlamydia* spp.

Actualmente se han realizado diversos estudios en los cuales se han identificado y determinado por diferentes pruebas moleculares nuevas especies que por su similitud e identidad han sido propuestas como candidatos para integrarse como parte del género *Chlamydia* spp. (Phillips *et al.*, 2019).

Chlamydia corallus

Esta especie ha sido propuesta como candidato para integrarse al género *Chlamydia* spp.; la cual, ha sido identificada en muestras cloacales y cloanales provenientes de boas esmeralda del árbol de la cuenca del Amazonas (*Corallus batesii*) clínicamente sanas que se encuentran en cautiverio en Suiza; se detectó esta bacteria mediante estudios de metagenómica, evaluando la diversidad microbiana de muestras obtenidas previamente, demostrado con esta técnica la presencia de nuevos taxones dentro de este género bacteriano. Sin embargo, el potencial patogénico y zoonótico de estas es aún desconocido (Taylor-Brown *et al.*, 2017).

Chlamydia sanzinia

Una de las especies del género *Chlamydia* que ha sido reportada recientemente; la cual, ha sido aislada a partir de hisopos cloacales de una boa de árbol de Madagascar (*Sanzinia volontany*); la cual se encontraba cautiva en Suiza. El origen del nombre de esta especie se denominó a partir del nombre científico la especie hospedadora donde fue obtenida. Sin embargo, a pesar de ser identificada como un nuevo patógeno en reptiles, su biología, potencial patogénico y zoonótico aún no han sido dilucidados (Taylor-Brown *et al.*, 2016). Adicionalmente también ha sido aisladas en otras especies como tortugas de vida libre y en cautiverio (Mitura *et al.*, 2017).

Chlamydia buteonis

Recientemente se ha descrito a esta especie, obtenido a partir del material del saco conjuntival y cloacal de un halcón de hombros rojos (*Buteo lineatus*) en cautiverio alojadas en un centro de rehabilitación, una de ellas desarrolló conjuntivitis y luego murió. Después de realizar distintos estudios moleculares pruebas de PCR tiempo real y secuenciación, se identificó a esta nueva especie que afecta a aves silvestres; de la cual, se desconoce su potencial zoonótico (Laroucau *et al.*, 2019).

Chlamydia testudinis

Se logró identificar en tortugas de espolones (*Testudo greca*) de un centros de recuperación de vida silvestre; las tortugas mostraron enfermedad ocular y secreción nasal. La presencia de *Chlamydia* spp. se puso en evidencia a partir de hisopos cloacales, conjuntivales y/o coanales de 58 animales; de los cuales, 57 resultaron positivos a *Chlamydiaceae*, los análisis filogenéticos finales demostraron la presencia de una especie de *Chlamydia* no clasificada dentro de a la familia, por lo cual surge la propuesta de esta nueva especie *C. testudinis* (Laroucau *et al.*, 2020).

2.3. Morfología

Se ha descrito que las especies que comprenden el género *Chlamydia* spp. comparten un ciclo de desarrollo de dos fases (bifásico) que se alterna en dos estructuras morfológicas, un cuerpo elemental infectante (CE) y un cuerpo reticular metabólicamente activo (CR) (Bastidas *et al.*, 2013).

Los CE y CR son estructuras morfológica y funcionalmente distintas. El CE es una pequeña estructura de entre 0.2 - 0.3 μm de diámetro, esférico, electrodenso, no proliferativo; el cual, cuentan con una pared trilaminar, caracterizadas por un núcleo denso y excéntrico de ADN condensado y cromatina por lo que el ADN se encuentra altamente compactado (Kuo *et al.*, 2011; Beeckman *et al.*, 2014). Esta forma tipo espora, es osmóticamente más estable y menos permeable que el CR (Longbottom y Coulter, 2003; Beeckman *et al.*, 2014). Estas características le permiten sobrevivir en el medio extracelular durante periodos de tiempo prolongados y a condiciones de estrés en el medio donde están (Elwell *et al.*, 2016).

Por su parte, el CR tienen un tamaño aproximado de 0.5 - 1.6 μm de diámetro, su ADN esta menos denso, obtienen sus nutrientes del citoplasma de la célula hospedadora y se multiplica mediante fisión binaria dentro de un cuerpo de inclusión (CI), son lábiles, osmóticamente inestables e incapaces de infectar otras células (Beeckman *et al.*, 2014). Dentro del CI el CR sintetiza diversas proteínas; las cuales,

servirán para la adquisición de nutrientes y así completar su ciclo de desarrollo en un periodo de 72 horas post-infección (Elwell *et al.*, 2016).

2.4. Ciclo de desarrollo

El ciclo de desarrollo de la bacteria una vez dentro de la célula hospedadora requiere de una compleja interacción patógeno-hospedador; posteriormente, de un ciclo de replicación para finalizar con la liberación de las mismas para la infección de células adyacentes (Elwell *et al.*, 2016).

Unión e invasión: Esta etapa inicial de la infección, se deduce que la diversidad de mecanismos de interacción entre las diferentes especies del género y sus hospederos naturales, contribuyen probablemente al tropismo tisular de las mismas (Elwell *et al.*, 2016). Este proceso requiere de múltiples receptores empleados por la bacteria, la unión a la célula hospedadora se lleva a cabo a través de dos procesos: i) inicialmente, una interacción reversible entre el CE y la célula a través de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPGs *por sus siglas en ingles*), ii) posteriormente, una unión de alta afinidad de carácter irreversible mediada por receptores secundarios (Bastidas *et al.*, 2013). Adicionalmente, se han propuesto otros receptores celulares como: receptor manosa, receptor manosa 6-fosfato y el receptor de estrógeno que son empleados por la bacteria para su ingreso (Cocchiario y Valdivia, 2009).

La entrada por parte de la bacteria al interior de las células no fagocíticas es mediado por una pequeña reorganización dependiente de GTPasa del citoesqueleto de actina, en el CE el sistema de secreción tipo III (SST3) está preparado para la descarga inmediata de efectores; tales como, la fosfoproteína de reclutamiento de actina translocada (TARP *por sus siglas en ingles*) en contacto con la célula hospedadora (Beeckman y Vanrompay, 2010).

Establecimiento de un nicho intracelular: Una vez dentro de la célula hospedadora, los CEs estarán ubicados dentro de un compartimiento unido a la membrana de la célula (CI), mediante esta estructura la bacteria es transportada a

la región peri-Golgi a través de los microtúbulos al centro de reorganización de microtúbulos (MTOC *por sus siglas en ingles*). El CE sufre una reestructuración morfológica, la cual, dará como resultado un CR; éste se replica por fisión binaria (Bastidas *et al.*, 2013). Mediante diferentes interacciones entre el CI y las rutas nutricionales de la célula, éstas obtienen nutrientes esenciales para sobrevivir y replicarse; tales como, aminoácidos, lípidos, hierro y al mismo tiempo evita la detección por parte del sistema inmune innato (Bastidas *et al.*, 2013).

Interacción con otros organelos: Además de interactuar con el aparato de Golgi, el CI tiene interacción con otros organelos de la célula; los cuales también sirven para la adquisición de diferentes elementos que le servirán durante su ciclo de desarrollo. Los cuerpos vesiculares, sirven como fuente de esfingolípidos y colesterol, los adiposomas son translocados al interior del CI y sirven como fuente de lípidos neutros, la mitocondria y lisosomas son fuente esencial de aminoácidos derivados de la degradación de la célula hospedadora. Estas interacciones facilitan la adquisición de nutrientes para la replicación bacteriana; así, como para el desarrollo del CI (Bastidas *et al.*, 2013).

Liberación del cuerpo de inclusión: Al finalizar el ciclo de desarrollo bacteriano, los CRs se reestructuran nuevamente como CEs; los cuales, pueden ser liberados a través de dos mecanismos totalmente independientes. I) Lisis celular, implica la interrupción secuencial de la inclusión y las membranas celulares por las cisteína proteasas; lo que resultará en la muerte de la célula hospedadora (Hybiske y Stephens, 2008). Por otra parte, ii) la extrusión del CI requiere la polimerización de la actina, miosina, la familia Rho de GTPasa RhoA; como resultado, la inclusión es liberada del espacio intracelular dejando a la célula hospedadora intacta (Hybiske y Stephens, 2008; Bastidas *et al.*, 2013).

2.5. Factores de virulencia

Las especies que conforman el género *Chlamydia* spp. pueden expresar una amplia gama de factores de virulencia; los cuales, le permiten sobrevivir y llevar a cabo su ciclo de desarrollo de forma adecuada; sin embargo, poco se sabe sobre estos, ya

que no existe suficiente información documentada, debido a la falta de herramientas genéticas; lo cual, ha dificultado su identificación (Rodolakis y Laroucau, 2015). La virulencia de este tipo de bacterias refiere en su capacidad de atravesar las barreras mucosas, ir más allá de los nódulos linfáticos, multiplicarse en el sistema reticuloendotelial, establecerse y colonizar órganos diana como: corazón, hígado, riñón y pulmones (Rodolakis y Laroucau, 2015).

a) Familia de Proteínas de la Membrana Polimórfica (Pmp's): Las proteínas de 90 Kda de *C. spittaci* se denominaron inicialmente como Proteínas Putativas de la Membrana Externa (POMP), Las especies del género *Chlamydia* spp. poseen una familia única de proteínas autotransportadoras aceptando dicha designación pero aceptando el hecho de que no todas las proteínas pueden estar en la membrana externa, Stephens *et al.* (1998) las renombró como "Proteínas de la Membrana Polimórfica (pmp's). Se ha demostrado que el número de genes Pmp's que codifican estas proteínas varían entre especies; sin embargo, todas codifican un solo gen *pmpD*, en el caso específico de *C. abortus* la proteína es codificada por 18 genes (Wheelhouse *et al.*, 2012).

b) Proteínas de Inclusión (Inc): Esta familia de proteínas son secretadas a partir del SST3, los estudios suponen que las interacciones entre el CI y la célula hospedadora están mediadas por esta familia de proteínas; las cuales, se encuentran ancladas a la membrana de inclusión, pero su conjunto de objetivos del hospedero son en gran parte desconocidos (Dickinson *et al.*, 2019). En *C. trachomatis* se ha dilucidado que la ausencia de una a varias de estas proteínas afecta seriamente los procesos bacterianos; por ejemplo, el estudio demostró que se requieren tres proteínas Inc para mantener la estabilidad de la membrana de inclusión y evitar la lisis de la célula huésped. En ausencia de Inc's específicas, la lisis de inclusión prematura resulta en reconocimiento por parte de los fagolisosomas y terminación prematura del ciclo de desarrollo de la bacteria; lo cual, revela la importancia de la participación de estas proteínas en el proceso de infección por parte del patógeno (Weber *et al.*, 2017).

c) Sistema de Secreción Tipo III (SST3): El SST3 es un mecanismo biológico esencial para la supervivencia de este género bacteriano. Este sistema de secreción es codificado por todas las especies del género; el cual, le permite a la bacteria translocar diferentes tipos de proteínas efectoras y también de la envoltura bacteriana a través de la membrana de inclusión (Peters *et al.*, 2007). Los estudios enfocados en la comprensión del ciclo de desarrollo del género *Chlamydia* spp. han permitido la identificación de diferentes proteínas efectoras de tipo III y vías específicas del hospedero para promover y mantener la infección (Rodolakis y Laroucau, 2015).

d) Proteína Reclutadora de Actina Translocada (TARP): Proteína que juega un rol fundamental en la internalización del CE en la célula hospedadora, su función principal es la reestructuración del citoesqueleto de actina de esta; también, ha sido identificada como un factor de virulencia potencial de *C. abortus* mediante diferentes análisis y librerías de expresión (Hagemann *et al.*, 2016).

e) Proteína de *Chlamydia* Asociada a la Membrana Nuclear Interna (SINC): Descubierta recientemente, esta proteína fue identificada en *C. psittaci*, *C. abortus* y *C. caviae*; su objetivo es dirigirse exclusivamente a la membrana nuclear de las células infectadas; para interactuar con las proteínas de la membrana nuclear; las cuales, controlan la estructura nuclear, la señalización, organización de la cromatina y silenciamiento génico de la misma (Mojica *et al.*, 2015).

f) Factor de Actividad Similar a la Proteasa (cpaf): En *C. trachomatis* se ha descrito que esta proteasa secretada durante la replicación de la bacteria dentro del CI, la forma en que se activa la proteasa actualmente no se comprende en su totalidad (Prusty *et al.*, 2018). Se ha determinado que esta proteasa secuestra numerosas proteínas de las células infectadas en beneficio del CI; adicionalmente, permite la degradación de los péptidos antimicrobianos liberados por la célula infectada (Tang *et al.*, 2015). La expresión específica de tiempo y la localización de CPAF dentro de la inclusión durante el ciclo de desarrollo de *Chlamydia* evita la posible lisis prematura de la célula huésped (Prusty *et al.*, 2018).

f) Proteína de Choque Térmico (groEL): El genoma de las especies del género *Chlamydia* spp. codifican tres proteínas a partir de tres genes *groEL* (*ChgroEL*, *ChgroEL2* y *ChgroEL3*); los cuales, ayudan al plegamiento de proteínas a través de un mecanismo dependiente de ATP. Además, estas proteínas han desarrollado funciones específicas. Un estudio reveló que la proteína ChgroEL es la proteína principal y los homólogos ChgroEL2 y ChgroEL3 cumplen funciones distintas que están relacionadas con la supervivencia en condiciones de estrés, (Illingworth *et al.*, 2017).

g) Potenciador de Infectividad de Macrófagos (MIP): Proteína involucrada en la persistencia de la bacteria, es una lipoproteína expuesta en la superficie de los CE's. Las MIP inducen la producción de citocinas proinflamatorias por monocitos/macrófagos (Bas *et al.*, 2008) y el mantenimiento de la inflamación, después de la erradicación de organismos vivos con antibióticos (Rodolakis y Laroucau, 2015).

h) Proteínas Rab: Son una subfamilia perteneciente a la superfamilia de proteínas Ras; la cual, es un subconjunto de pequeñas proteínas G reguladoras de los procesos de tráfico intracelular, entre otros (Kelly *et al.*, 2012). Esta subfamilia se divide en subproteínas; de las cuales, la proteína Rab11 se ha identificado en especies de *Chlamydia* spp. que afectan al humano, *C. trachomatis* y *C. pneumoniae*. Rab11 se asocia con los CI y se logró identificar que la disminución de Rab11a se relaciona con el decremento en el número de partículas infecciosas generadas. Esta proteína puede interactuar directamente con la proteínas de inclusión clamidial (Kelly *et al.*, 2012).

2.6. Aborto Enzoótico Ovino

El aborto enzoótico ovino (AEO) es una enfermedad provocada por *C. abortus*; la cual, es una enfermedad distribuida ampliamente a nivel mundial en países dedicados a la producción pecuaria (Rodolakis y Laroucau, 2015). Durante la infección en hembras gestantes, la bacteria coloniza la placenta y provoca el aborto o en ocasiones el nacimiento de corderos débiles que no superan las 48 horas de

vida (Longbottom *et al.*, 2013). El AEO representa un problema de salud animal y económico para las personas que se dedican a la actividad ganadera especialmente en pequeños rumiantes (Longbottom y Coulter, 2003). Se ha documentado en diversos estudios el potencial zoonótico que representa esta bacteria, principalmente para mujeres que entran en contacto directo o indirecto con animales infectados causando diversas patologías (Cheong *et al.*, 2019), entre ellas: aborto espontáneo (Essig y Longbottom, 2015; Rodolakis y Laroucau, 2015), coagulación intravascular diseminada después del parto, falla renal aguda y edema pulmonar, enfermedad pélvica inflamatoria (Walder *et al.*, 2003), sepsis durante el embarazo (Walder *et al.*, 2005) y como agente causal de neumonía en una persona que trabajaba con muestras biológicas de *C. abortus* (Ortega *et al.*, 2016).

En México, la presencia de esta bacteria ha sido reportada desde los años 90 y actualmente el AEO es considerada como una enfermedad endémica en nuestro país; la cual, está clasificada dentro del grupo de enfermedades de reporte mensual obligatorio ante autoridades zoosanitarias oficiales (DOF, 2018).

2.7. Transmisión

La forma en la que se trasmite mayormente *C. abortus* es a través de la vía oronasal de animales infectados a animales susceptibles; por medio de la ingesta de alimentos y agua contaminados con el patógeno (Longbottom y Coulter, 2003). La transmisión de *C. abortus* se da a través de la contaminación del medio ambiente; la cual, ocurre en gran medida durante el estro, cuando se presentan los abortos o la temporada de parto que son los puntos críticos para la liberación del patógenos al medio ambiente (Longbottom y Coulter, 2003). Cuando las ovejas están infectadas, la bacteria es liberada en grandes cantidades a través de los fluidos vaginales; los cuales, se pueden observar dos semanas antes de un aborto inminente y persiste dos semanas después del mismo (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Una vez establecida la enfermedad en el rebaño, las ovejas pueden infectarse en cualquier etapa de su vida y en cualquier estación del año; sin embargo, la temporada que representa un alto riesgo de contagio es sin duda en la temporada

de parto o cuando los abortos se presentan en el rebaño. Bajo ciertas condiciones, las bacterias pueden permanecer viables en el ambiente durante varios días, propagando la infección a otros animales (Longbottom y Coulter, 2003). El AEO se caracteriza por ser una enfermedad autolimitante, esto se debe, a que una vez que las ovejas afectadas abortan a causa de esta enfermedad, producen anticuerpos que les proporcionarían una inmunidad duradera por dos o tres años, con lo cual durante este periodo la oveja no aborta. Sin embargo, la oveja infectada elimina de manera intermitente a la bacteria durante su vida productiva; principalmente a través de los fluidos vaginales en temporadas de parto subsecuentes (Longbottom y Coulter, 2003).

2.8. Diagnóstico

Debido a la variedad de cuadros clínicos, hospederos animales y dado que la clamidiosis a menudo se diagnostica en combinación con otros agentes infecciosos, un diagnóstico definitivo de AEO, generalmente requiere de pruebas de laboratorio con personal altamente capacitado (Sachse *et al.*, 2009). Para realizar el diagnóstico de especies de *Chlamydia*, las muestras por elección son hisopados (vaginales, conjuntivales y/o rectales) dependiendo de la especie de la cual se sospeche, las muestras deberán estar conservadas en medio de transporte especial para *Chlamydia* spp., sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) (Sachse *et al.*, 2009; Mora Diaz *et al.*, 2015); por otra parte, el diagnóstico puede realizarse por métodos indirectos (ELISA) o directos (cultivo celular y PCR) (Sachse *et al.*, 2009).

2.8.1. Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

La presencia de antígenos clamidiales se pueden detectar en muestras de tejidos o frotis teñidos con tinciones específicas o reacciones inmunocitoquímicas. Otros estudios incluyen el uso de pruebas de inmunoensayo, destacando las pruebas de ELISA y pruebas de anticuerpos fluorescentes. Sin embargo, aunque estas pruebas demuestran con rapidez la presencia de organismos clamidiales, generalmente no permiten la identificación de la especie, serotipo o subtipo involucrado en el individuo afectado, esto se debe al empleo de proteínas que todas las especies

sintetizan y comparten entre sí; como lo son, los LPS y la MOMP (Sachse *et al.*, 2009).

La mayoría de las pruebas de diagnóstico serológico que se distribuyen comercialmente están desarrolladas para la especie *C. trachomatis* en muestras clínicas humanas; sin embargo, teóricamente también pueden ser adecuadas para detección de infecciones clamidiales en animales por los antígenos que se emplean para las mismas (LPS y MOMP), algunos de estas marcas incluyen pruebas de anticuerpos fluorescentes directos (DFA) (IMAGEN, Celltech; Chlamydia-Direct IF, BioMerieux; Vet-IF, Cell Labs), ELISA en placa (Chlamydiazyme, Abbott; IDEIA, Dako; IDEIA PCE, Dako; Pathfinder, Kallestad; Chlamydia-EIA, Pharmacia) y ELISA en fase sólida (Clearview Chlamydia MF, Unipath; Surecell, Kodak) (Sachse *et al.*, 2009).

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA (*del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), es una prueba de diagnóstico que detecta anticuerpos específicos en suero de individuos afectados contra el género de clamidia (Sachse *et al.*, 2009; Rodolakis y Laroucau, 2015), actualmente existen pruebas de ELISA que se comercializan en diferentes partes del mundo para el diagnóstico del AEO; sin embargo, las desventajas que tienen este tipo de pruebas son las reacciones cruzadas entre especies (*C. abortus* y *C. pecorum*); lo cual, dificulta el diagnóstico específico (Bommana *et al.*, 2019). Los ensayos que evalúan diferentes antígenos para la detección de especies de *Chlamydia* spp. han sido diversos. Primeramente evaluando fragmentos de la MOMP a través de una prueba de ELISA indirecta (rOMP91B iELISA), la cual, mostró una sensibilidad y especificidad del 84.2% y 98.5% respectivamente, el estudio demostró que la prueba de ELISA indirecta fue mejor en la diferenciación de animales infectados con *C. abortus* y *C. pecorum* (Longbottom *et al.*, 2001). Posteriormente, otro estudio comparó diferentes antígenos recombinantes, todos estos fueron identificados a partir de la Proteína Polimórfica de la Membrana Externa o POMP90 (*del inglés, Polymorphic Outer Membrane Protein*). De las 12 fracciones identificadas, OMP90-3 y OMP90-4 fueron las más efectivas mostrando una sensibilidad del 95.7% y

94.3% respectivamente y una especificidad del 100% para ambas. Los hallazgos del estudio revelaron que la prueba de ELISA con el fragmento rOMP90-4 fue más sensible que la de rOMP90-3, ya que identificaba más muestras positivas para AEO y además, ambas fueron superiores a la prueba de fijación del complemento o CFT (*del inglés complement fixation test*) (Longbottom *et al.*, 2002). Adicionalmente y de manera complementaria a estos estudios, se realizó un estudio en el cual se evaluaron cuatro pruebas de ELISA experimentales basadas en CEs completos de *C. abortus* (CE), una preparación a partir de la membrana externa de bacteria completa (SolPr) y dos fragmentos recombinantes de POMP90 (rOMP90-3 y rOMP90-4), contra tres pruebas comerciales, la prueba CHEKIT1 *Chlamydophila abortus*, Pourquier1 ELISA *Chlamydophila abortus* y ImmunoComb Ovine *Chlamydophila* Antibody. Los resultados durante la prueba mostraron que la prueba de ELISA comercial ImmunoComb obtuvo la mayor sensibilidad (98.4%) en comparación con las demás; sin embargo, la especificidad determinada (65.4%) fue menor que todas las pruebas evaluadas. Los resultados determinaron que de las ocho pruebas de ELISA evaluadas, la prueba que ofreció mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad, fue la prueba de ELISA basada en el fragmento recombinante rOMP90-3 con valores de 96.8% y 100% respectivamente, este estudio demostró que esta prueba de ELISA experimental puede ser una alternativa adecuada para el diagnóstico serológico de AEO (Wilson *et al.*, 2009). A estos resultados, se suma un estudio realizado en 2018; el cual, comparó tres pruebas comerciales (IDvet, MVD-Enfer y LSI) para la detección de anticuerpos contra *C. abortus* en ovejas, se evaluaron animales vacunados durante diferentes periodos de tiempo para medir la producción de anticuerpos entre animales que abortaban y animales que tenían corderos sanos, los resultados revelaron que la prueba más sensible fue la LSI (94.74%) seguida por MVD-Enfer (78.95%) y por último IDvet (73.68%), los tres kit detectaron niveles altos de anticuerpos en las ovejas que abortaban en comparación con las que tenían corderos sanos. La prueba más sensible en este estudio se basa en la identificación del lipopolisacarido (LPS) clamidial; el cual, muestra reacción cruzada con todas las especies del género *Chlamydia*, se determina adecuado para identificar ovejas infectadas con cualquier

especie del género, pero no se considera específico para *C. abortus* (O'Neill *et al.*, 2018). Finalmente, un estudio reveló las desventajas que tienen este tipo de pruebas comerciales en cuanto a reacciones cruzadas entre *C. abortus* y *C. pecorum*, realizando la evaluación en diferentes rebaños, las pruebas serológicas revelaron una baja seropositividad de *C. abortus* empleando una prueba de ELISA basada en péptidos (1.2%) en ovejas australianas y una seropositividad moderada en un rebaño de suiza con antecedentes clínicos de aborto asociados a *C. abortus* (26.9%). Utilizando pruebas de CFT y ELISA, la seropositividad fue significativamente mayor, lo que sugiere reactividad cruzada entre estas dos especies. Adicionalmente, empleando una prueba de PCR tiempo real para detectar ADN de *C. pecorum* en animales australianos seropositivos a *Chlamydia* spp., se concluyó que la seropositividad de *Chlamydia* puede estar relacionado a la reactividad cruzada con infecciones endémicas de *C. pecorum* (Bommana *et al.*, 2019). Debido a las desventajas que demuestran este tipo de pruebas es recomendable complementarlas con alguna otra más específica como las pruebas de PCR (Sachse *et al.*, 2009).

2.8.2. Aislamiento bacteriano

Por su naturaleza intracelular obligada, estas bacterias requieren de medios vivos para su aislamiento; actualmente se emplea el cultivo celular (células McCoy por elección) para dicho fin (Sachse *et al.*, 2009); hasta hace algunos años esta técnica era considerada el estándar de oro para el diagnóstico de *Chlamydia* spp. (Longbottom y Coulter, 2003). Sin embargo, el desarrollo de nuevas metodologías como la amplificación de ácido nucleico (PCR y secuenciación) empleadas para mejorar el diagnóstico, actualmente son las técnicas que se emplean por su rapidez y facilidad para el manejo de un mayor número de muestras (Borel *et al.*, 2018). La PCR provee a los laboratorios de diagnóstico veterinario de variantes mucho más sensibles y específicas para la detección y tipificación de especies de *Chlamydia* spp. o complementarias al aislamiento bacteriano (Rodolakis y Laroucau, 2015).

2.8.3. Prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa

Esta prueba detecta ADN específico de cualquier organismo; por lo cual, es una prueba mucho más sensible y específica que el cultivo celular al momento de identificar el género y especie implicada en los individuos afectados (Sachse *et al.*, 2009). En los últimos 15 años el uso de esta técnica ha tomado mucha relevancia y sus diferentes variantes revelan mejores resultados en comparación con las mencionadas anteriormente tales como: i) procesar un mayor número de muestras, ii) menor tiempo para la obtención de resultados, iii) el uso de diferentes tipos de muestras para el diagnóstico, iv) los organismos no tienen que estar cien por ciento viables y v) mayor sensibilidad y especificidad. Desde que se implementó su uso en laboratorios de diagnóstico veterinario, los genes empleados para la identificación de estos agentes bacterianos han sido diferentes: proteína principal de la membrana externa o MOMP (*del inglés, Major Outer Membrane Protein*), proteínas de la membrana polimórfica o Pmps (*del inglés, Polymorphic membrane protein*), 16S y 23S (Sachse *et al.*, 2009). Las metodologías de PCR para la detección específica de especies de *Chlamydia* son variadas, por mencionar algunas: La prueba de PCR “*Totouchdown enzyme time reléase*” para amplificar diferentes secuencias de ADN en las regiones variables de los genes de ARNr espaciador 16S y 16S-23S específicos para la identificación de especies de este género bacteriano; por ejemplo, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci* (Madico *et al.*, 2000). Otra variante de esta prueba, la PCR-RFLP prueba que identifica en primera instancia la presencia del gen *omp2* específico de la familia *Chlamydiaceae* y posteriormente mediante una digestión con la enzima de restricción *AluI*, tiene la capacidad de identificar un total de nueve especies del género *Chlamydia* entre estas, *C. abortus*, *C. pecorum* (Marsilio *et al.*, 2005) y *C. psittaci* (Hartley *et al.*, 2001). Adicionalmente, una variante enfocada al gen 16S específico de la familia *Chlamydiaceae* pero empleando una prueba de PCR en tiempo real demostró alta especificidad al evaluar muestras de diferentes especies de *Chlamydia* contra otros géneros bacterianos (Condon y Oakey, 2007); adicionalmente, esta variante también puede ser empleada para la identificación específica de especies de *Chlamydia* empleando iniciadores específicos para cada

una (Nordentoft *et al.*, 2011). Posteriormente, se desarrolló una prueba de PCR multiplex para la identificación de *C. abortus*, *C. pecorum* y *Coxiella burnetii*, implicadas como agentes causales de aborto, esta prueba a diferencia de las antes mencionadas, ayuda a identificar de manera simultánea a las tres especies, dicha prueba demostró ser altamente específica y rápida para la detección de estos agentes bacterianos (Berri *et al.*, 2009).

2.9. Tratamiento

2.9.1. Antibióticos

La administración de tetraciclina para el tratamiento del AEO en rebaños afectados o con presencia de abortos ha demostrado inhibir el crecimiento y disminuir la tasa de abortos en el mismo (Sachse *et al.*, 2009), es importante recalcar, que el uso de los antibióticos debe ser de manera controlada para minimizar el desarrollo de resistencia por parte del patógeno. Aunque los antibióticos sirven para disminuir las pérdidas, este tipo de tratamientos no eliminan a la bacteria; ya que, los animales afectados siguen eliminando a los organismos; por lo cual, su uso profiláctico no es recomendado (Essig y Longbottom, 2015). En países europeos, además del uso de antibióticos también se implementa la administración de bacterinas para prevenir y controlar el AEO en rebaños con animales susceptibles, esto debido a que es la única enfermedad de origen clamidial para la que existen bacterinas disponibles comercialmente (Rodolakis y Laroucau, 2015).

2.9.2. Inmunógenos

En el ámbito veterinario, los avances tecnológicos en el desarrollo de inmunógenos para el control de enfermedades han tenido un realce importante en los últimos 25 años, desde el empleo de bacterias completas ya sean vivas o muertas hasta el uso de inmunógenos de ADN; los cuales, ofrecen medidas más seguras tanto para el animal como para el médico veterinario que las administra (Francis, 2018).

En los últimos 70 años, los estudios para el desarrollo de inmunógenos para combatir enfermedades de origen clamidial en especies animales principalmente

ganado (ovinos, caprinos, bovinos y porcinos) se enfocan en prevenir pérdidas económicas en las unidades de producción; sin embargo, el objetivo principal es preservar la salud humana por la zoonosis que algunas de estas representan. En los últimos 10 años los ensayos vacúnales contra *Chlamydia* spp. se han incrementado, en estos estudios la proteína más empleada en los desafíos contra *Chlamydia* spp. ha sido la MOMP (Phillips *et al.*, 2019). Adicionalmente, se han realizado estudios enfocados en la búsqueda de antígenos específicos de esta proteína de superficie para una diferenciación entre especies (Hoelzle *et al.*, 2004). Posteriormente, se han empleado diferentes tipos de antígenos en el desarrollo inmunógenos contra agentes clamidiales, las primeras pruebas empleaban tradicionalmente los CEs, los cuales, eran inactivados mediante tratamientos con UV o vivos (atenuados) fijados con formalina. Posteriormente, a mediados de la década de los 90's los enfoques en el uso de otros antígenos para el desarrollo de vacunas de subunidades como: proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, vectores de expresión y ADN comenzaron a emplearse para el desafío en modelos murinos principalmente (Phillips *et al.*, 2019).

Por último, aunque existen vacunas disponibles comercialmente para el control y prevención del AEO, está bien documentado que en el caso de la vacuna viva atenuada 1B *C. abortus*, tiene el potencial de reactivación y causar la enfermedad en animales inmunizados (García-Seco *et al.*, 2016; Laroucau *et al.*, 2018; Longbottom *et al.*, 2018). Del total de los desafíos vacunales contra *Chlamydia* spp. solo el 5% de han sido enfocadas a *C. abortus*, evaluados en ratones, vacas, ovejas y cerdos de Guinea (Phillips *et al.*, 2019), los estudios evalúan algunas proteínas principalmente las Pmp's buscando diferentes variaciones o mutaciones que puedan servir como puntos clave para la prevención del AEO (Burall *et al.*, 2009).

2.10. Nuevas tecnologías para el desarrollo de pruebas de detección de antígenos y prototipos vacunales

A la fecha se han desarrollado diferentes estudios que han identificado a estos posibles candidatos, tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de vacunas (Rodolakis y Laroucau, 2015).

2.10.1. Inmunoensayos

Las proteínas inmunorreactivas, expresadas en animales infectados, se han propuesto como nuevos candidatos como antígenos marcadores para el diagnóstico y el uso de diferentes genes de virulencia que pueden ser empleados para el desarrollo de prototipos de vacunas de subunidades para la prevención y control de enfermedades causadas por especies de *Chlamydia* spp (Hagemann *et al.*, 2016). En el caso de *C. abortus*, se han realizado diversos estudios, evaluando diferentes proteínas. Un estudio evaluó la respuesta inmune humoral provocada por algunas proteínas de superficie (MOMP, MIP, Pmp13G) y asociadas con la virulencia (CPAF, TARP, SINC), dicho estudio demostró que las ovejas que abortaron mostraron una fuerte respuesta de anticuerpos a los antígenos de superficie. Adicionalmente, identificaron que el antígeno más específico para el serodiagnóstico de las infecciones humanas por *C. abortus* fue la Pmp13G, esta proteína no mostró reactividad cruzada con otras especies de *Chlamydia* spp. que afectan a humanos (Hagemann *et al.*, 2016).

2.10.2. Prototipos vacunales

En cuanto a las proteínas empleadas actualmente para el desarrollo de prototipos vacunales, los estudios se han enfocado a tres proteínas que juegan un rol principal en el ciclo de desarrollo de la bacteria (Phillips *et al.*, 2019). Otras proteínas de este género bacteriano utilizadas como antígenos en ensayos vacúnales son las proteínas de la superficie membranal de *Chlamydia* spp. las cuales, han mostrado que tienen regiones altamente conservadas (Vasilevsky *et al.*, 2016). Otro estudio evalúa tres diferentes tipos de vacunas: vacuna de ADN, vacuna de fagos (*OmpA*) y una vacuna comercial vacuna viva atenuada, liofilizada basada en la cepa 1B de *C. abortus*. Aunque la vacuna de fagos ofrece buenos resultados, no supera la ofrecida por la vacuna comercial; sin embargo, el estudio concluye que este novedoso sistema de administración de vacunas ofrece ventajas que superan por mucho a las vacunas comerciales, tales como: manejo, seguridad más eficiente y producción relativamente más económica (Ling *et al.*, 2011). Otras pruebas

evaluaron una combinación con el polisacárido de *Lycium barbarum* (LBP3a), los resultados demostraron una buena protección en ratones desafiados con *C. abortus* empleando un polisacárido LBP3a combinado con una vacuna de ADN que codifica la MOMP de *C. abortus* (Ling *et al.*, 2011). Posteriormente, se han propuesto otras proteínas, tales como, las pertenecientes a la familia de las Pmp's, estas han demostrado tener el potencial inmunogénico para el desarrollo de inmunógenos contra *C. abortus* (Rodolakis y Laroucau, 2015). Un estudio evaluó la Pmp18D en dos diferentes formulaciones, FL (ligando de tirosina quinasa 3 tipo Fms; Flt3L) y fantasmas de *Vibrio cholerae* (VCG) para inducir inmunidad innata y de protección cruzada contra la infección genital por *C. abortus*. La evaluación se realizó con la regulación de la expresión de la proteína, por la activación y diferenciación de diferentes tipos celulares. Los resultados demostraron que la formulación que ofrece mejores resultados es la Pmp18D+VCG (Pan *et al.*, 2015), así como otra variante, empleando un fragmento N-terminal de esta proteína, denominada Pmp18D.1, el estudio evaluó su capacidad para inducir una respuesta inmune innata en células dendríticas y activar las vías de señalización involucradas en la secreción de IL-1 β (Pan *et al.*, 2017). Otras proteínas empleadas como antígenos combinados (MIP y CPAF) demostraron una eficacia del 50% contra una vacuna viva atenuada comercial; adicionalmente, aunque existe liberación del patógeno por parte de los animales inmunizados, estos liberan en menores concentraciones en comparación con el control negativo. No obstante, se pudo observar en dicho estudio que cuando estas dos proteínas son administradas de manera individual no tiene efecto alguno contra la infección experimental (O'Neill *et al.*, 2019).

2.10.3. Herramientas bioinformáticas

La bioinformática es un campo de la ciencia que engloba algunas disciplinas tales como, biología, informática, computación y tecnologías de la información que trabajan en conjunto para almacenar, organizar y analizar grandes cantidades de información generadas a través de estudios de genética, biología molecular y biotecnología (Soria-Guerra *et al.*, 2015).

El amplio desarrollo de estas tecnologías, en especial la predicción *in silico* de epítopes con potencial inmunogénico en proteínas específicas de patógenos que afectan a humanos y animales ha demostrado ser eficiente, tanto para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico (Hemati *et al.*, 2020; Yin *et al.*, 2021); como para el desarrollo de vacunas para la prevención y control de enfermedades a nivel mundial (Soria-Guerra *et al.*, 2015). Para dicho fin, existen una amplia gama de softwares bioinformáticos que ayudan a los investigadores en esta ardua tarea; los cuales, algunos se encuentran disponibles de manera gratuita en la red, estos programas bioinformáticos emplean una serie de diferentes algoritmos matemáticos que básicamente establecen valores a las secuencias evaluadas por los mismos y mediante estas y otras características más complejas determinar las propiedades de los aminoácidos que conforman una proteína diana (Soria-Guerra *et al.*, 2015).

El empleo de estas tecnologías en pro de la salud animal ha sido variado, empleándose en diversos estudios para la determinación y caracterización de ya que un desafío importante en el desarrollo de diagnósticos como ELISA es la selección de uno o varios antígenos ideales que sean específicos del patógeno y permitan un reconocimiento sensible y específico de patógenos de importancia en salud animal; por ejemplo, la enfermedad de Johne (JD), enfermedad infecciosa de los rumiantes causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (Hemati *et al.*, 2020), brucelosis (Yin *et al.*, 2021) o incluso para determinada especie animal (cerdos) (Moise *et al.*, 2020), por mencionar algunos de los estudios más recientes.

En cuanto al género *Chlamydia*, el empleo de estas herramientas bioinformáticas para el mapeo de proteínas que podrían ser empleadas como dianas para el desarrollo tanto de vacunas como de pruebas de serodiagnóstico, se cuenta con poca información al respecto. Existen estudios en dos especies: *C. trachomatis*, patógeno que afecta al ser humano, enfocado estudio que fue enfocado en el desarrollo de una prototipo vacunal (Pourhajibagher y Bahador, 2016) y *C. suis* patógeno que afecta principalmente a cerdos, estudio enfocado en el desarrollo de una prueba de ELISA (De Puysseleyn *et al.*, 2018).

Immune Epitope Database (IEDB)

El software "*Immune Epitope Database Analysis Resource*" (IEDB), es un software bioinformático disponible de manera gratuita en la red; el cual, predice a través de diferentes algoritmos matemáticos la presencia de epítomos inmunogénicos en secuencias proteínicas proporcionadas por el usuario, el método general sobre el funcionamiento de este se describe a continuación.

Bepi Pred - 2.0

BepiPred-2.0, es un servidor web para predecir epítomos de células B a partir de secuencias de antígenos. BepiPred-2.0 se basa en un algoritmo de bosque aleatorio de epítomos anotados a partir de estructuras de proteína anticuerpo-antígeno. Se descubrió que este nuevo método supera a otras herramientas disponibles para la predicción de epítomos basada en secuencias tanto en datos de epítomos derivados de estructuras 3D resueltas como en una gran colección de epítomos lineales descargados de la base de datos IEDB. El método muestra los resultados de una manera fácil de usar e informativa, tanto para usuarios con conocimientos informáticos como para usuarios no expertos. Creemos que BepiPred-2.0 será una herramienta valiosa para la comunidad de bioinformática e inmunología (Jespersen *et al.*, 2017).

III. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el uso de pruebas de serodiagnóstico para la prevención y control del Aborto Enzoótico Ovino en países donde es implementado presentan deficiencias en el diagnóstico específico del agente patógeno; dado que los porcentajes de sensibilidad y especificidad de algunas de estas pruebas tienden a ser bajos, lo que conlleva a la identificación de falsos positivos debido a las reacciones cruzadas provocadas por especies del mismo género bacteriano que afectan a los pequeños rumiantes; ya que, estas pruebas están desarrolladas a partir de proteínas compartidas entre estos microorganismos; lo que resulta en diagnósticos erróneos que impiden la implementación oportuna de medidas de control y prevención en los rebaños afectados.

Esto ha generado la necesidad de buscar alternativas que ayuden al desarrollo de pruebas mucho más sensibles y específicas; como el uso de proteínas recombinantes, fragmentos de proteínas específicas, la identificación (*in silico*) y síntesis de péptidos sintéticos; las cuales, han demostrado resultados prometedores en la identificación específica de *C. abortus*.

En México, el uso de pruebas de diagnóstico para el AEO no está implementado; sin embargo, ante la creciente evidencia científica sobre el aumento de la prevalencia de este patógeno en rebaños de pequeños rumiantes a nivel nacional, hace necesario contar con pruebas que sean económicas, rápidas, que puedan emplearse en laboratorios de todo el país y que sean lo suficientemente sensibles y específicas para el diagnóstico oportuno del AEO en rebaños susceptibles. Con base a esto, el presente trabajo de investigación tuvo como propósito el uso de dos softwares bioinformáticos para la caracterización e identificación *in silico* de epítomos inmunogénicos en fragmentos de la Proteína de Membrana Polimórfica (POMP90) en un aislado de *Chlamydia abortus* de origen mexicano obtenido en un estudio previo con el objetivo de identificar epítomos específicos.

IV. HIPÓTESIS

La evaluación *in silico* de los fragmentos superpuestos 3 y 4 de la Proteína de la Membrana Polimórfica (POMP90) permite identificar epítopes con potencial inmunogénicos específicos contra *Chlamydia abortus*.

V. OBJETIVOS

Identificar epítopes inmunogénicos *in silico* en dos fragmentos superpuestos de la Proteína de la Membrana Polimórfica (POMP90) en un aislado mexicano de *Chlamydia abortus*.

Objetivos específicos

Identificar genes que codifican los fragmentos *pomp90-3* y *pomp90-4* en un aislado de *Chlamydia abortus* de origen mexicano.

Clonar y secuenciar los fragmentos superpuestos 3 y 4 de la POMP90 de *Chlamydia abortus*.

Identificar epítopes inmunogénicos a partir de secuencias proteínicas obtenidas de los productos clonados de *Chlamydia abortus* empleando el software “*Immune Epitope Database*”.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Microorganismos

Se empleó un aislamientos de *C. abortus* identificado y caracterizado previamente mediante pruebas de aislamiento en cultivo celular, inmunofluorescencia directa y PCR, obtenido de un ovino con historial clínico de aborto en el Estado de México (De Jesus-Aldama, 2019).

***Escherichia coli* DH5 α**

La cepa bacteriana empleada en diversos estudios para la clonación y subclonación de fragmentos de ADN de interés *in vivo*, esta demostró ciertas ventajas a comparación con otras; tales como, tasas de crecimiento más rápidas, mayor rendimiento de plásmidos y mayor eficiencia de transformación (Kostylev *et al.*, 2015).

6.2. Fragmentos del gen de la Proteína de la Membrana Polimórfica (POMP90)

Como se mencionó anteriormente, las bacterias del género *Chlamydia* expresan diversos factores de virulencia que le ayudan a sobrevivir dentro del hospedero, las proteínas codificadas por estos genes provocan una respuesta inmune en el organismo hospedador; por lo cual, tienen el potencial para ser empleados como dianas para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico. En *C. abortus* se han identificado algunos genes que codifican proteína inmunorreactivas (Hagemann *et al.*, 2016); las cuales, demostraron ser específicas además de no mostrar reactividad cruzada con otras especies de *Chlamydia* (Hagemann *et al.*, 2016).

Gen de POMP90

Se amplificaron dos fragmentos del gen *Pomp90* que codifican la Proteína Polimórfica de la Membrana Externa de *C. abortus* (Longbottom *et al.*, 2002) para dicho fin se usaron los siguientes iniciadores:

Primer	Secuencia (5' – 3')	Tamaño
<i>Pomp90-3F</i>	TTTTCAGGATCCTATTGTCCTCCAGGCA	245 pb
<i>Pomp90-3R</i>	GTGAATTCATCAGCATAAATAGCCCCG	
<i>Pomp90-4F</i>	TCTCAGAAGGATCCTCCACTTCAAAGG	209 pb
<i>Pomp90-4R</i>	GATGAATTCGTTCCCATCGAAGGTA	

Los iniciadores específicos para los fragmentos diana se evaluaron en el software Gene Runner, el cual identificó secuencias de corte para enzimas de restricción, las cuales se usaron en las pruebas de PCR (Hasanzadeh Haghghi *et al.*, 2019).

6.3. Extracción de ADN de *Chlamydia abortus*

La extracción de ADN genómico de *C. abortus* se realizó empleando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, USA) siguiendo las instrucciones del proveedor incluidas en el kit. La extracción se realizó a partir de cultivo celular.

A partir del aislado conservado en cultivo celular se tomaron 200 µL y se agregaron en 600 µL de solución de lisis nucleica y se homogenizó mediante agitación con vortex. Para la lisis y precipitación de proteínas se agregaron 3 µL de solución de RNAsa a la muestra, se mezclaron e incubaron entre 15-30 minutos a 37°C; posteriormente, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 200 µL de solución de precipitación de proteínas en el tubo. Se homogenizó e incubó por 5 minutos en hielo; por último, se centrifugó a 13,000-16,000 × g durante 4 minutos.

Precipitación y rehidratación del ADN

Se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezclaron suavemente por inversión y se centrifugaron a 13,000-16,000 × g durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se añadieron 600 µL de etanol al 70% a temperatura ambiente, se homogenizaron y centrifugaron en las mismas condiciones. Se retiró el etanol y el pellet se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 minutos, por último se rehidrató el ADN con 50 µL de solución de rehidratación durante la noche a 4°C. El ADN se conservó a temperaturas entre 2-8°C para su uso en pruebas subsecuentes.

6.4. Identificación de los fragmentos 3 y 4 por reacción en cadena de la polimerasa

Las reacciones de PCR se integraron por: 0,5 μ M, cebador directo (2 μ L) e inverso (2 μ L), así como 25 μ L de Master Mix 2X (IBI scientific, EEUU), 1 μ L de ADN diana y 20 μ L de agua libre de nucleasas para un volumen final de reacción de 50 μ L. Las reacciones se realizaron en un termociclador Prime G (Techne, UK) utilizando el siguiente perfil de ciclos: desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización durante a 94 °C por 1 min, alineación a 44 °C por 1 min para ambos pares de cebadores y una extensión a 72 °C por 1 min. Finalmente una extensión a 72 °C por 5 min.

Las reacciones se evaluaron mediante una electroforesis en gel de agarosa (IBI scitific) al 1.2% teñido con bromuro de etidio (10 mg/mL) a 90 volts por 40 minutos; terminado el proceso el resultado fue visualizado en un transiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-imagen System, USA) para evidenciar la presencia de las bandas correspondientes a los fragmentos de interés.

6.5 Clonación de los genes de interés de *Chlamydia abortus* en *Escherichia coli* DH5 α

Se empleó la metodología descrita por Green and Sambrook (2012) se evaluaron las características e identificó la presencia de epítopes a partir de las secuencias que se obtengan de la secuenciación del vector con el gen insertado.

6.5.1 Purificación de los fragmentos *pOMP-3* y *pOMP-4*

Los fragmentos se purificaron de la mezcla del PCR usando el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). El producto del PCR separó por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y las bandas correspondientes a los fragmentos de interés se cortaron del gel de agarosa con bisturí estéril. Los trozos de agarosa se pesaron y se adicionaron 10 μ L de buffer de unión a la columna por cada 10 mg de agarosa. Se incubaron a 42°C por 10 min y durante este tiempo, los tubos se mezclaron en vórtex en intervalos de 2 min. Posteriormente, se transfirió

el producto a la minicolumna y se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 16 000 g x 2 min. Se adicionaron 700 µL de solución de lavado de membrana, se centrifugó de igual forma, al finalizar la centrifugación, se desechó el sobrenadante. El lavado se repitió con 500 µL de solución de lavado de membrana y se centrifugó nuevamente a 16 000 g x 5 min. Se centrifugó nuevamente a 16 000g x 1 min para eliminar restos de solución de lavado. La minicolumna se transfirió a un tubo limpio y el ADN se eluyó con 50 µL de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 16 000 g por 1 min. Los fragmentos purificados se almacenaron a - 20°C.

6.5.2. Reacción de ligación al plásmido de clonaje pGEM®-T Easy

Para la secuenciación de los fragmentos de *C. abortus* fue necesario iniciar con la clonación de los fragmentos del gen de interés y para dicho fin se empleó la metodología descrita por Nabi *et al.*, 2016; en el cual, emplean el vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega). Los fragmentos de interés amplificados por PCR se ligaron en el vector de clonación pGEM®-T Easy (Promega, USA), se usó la enzima T4 ligasa (Nabi *et al.*, 2016), siguiendo las especificaciones del proveedor:

Se centrifugaron a máxima velocidad los tubos que contienen el vector pGEM®-T Easy y el inserto de ADN control (control positivo) con la finalidad de precipitar el contenido en el fondo de los tubos. Se emplearon tubos de 0.5 mL con baja capacidad de unión al ADN para la reacción de ligación. Se homogeneizó con agitación en vortex el buffer 2X Rapid Ligation antes de cada uso y se adicionaron 10 µL al tubo de 0.5 mL, posteriormente, se colocó 1 µL del vector pGEM®-T Easy Vector (50ng), 1 µL de T4 DNA Ligasa y 5 µL de ADN de interés y agua libre de nucleasas hasta un volumen final de reacción de 20 µL, la reacción se homogenizó mediante pipeteo y se incubó por 16 hr a 16°C, posteriormente, terminada la incubación, el proceso de ligación se detuvo por medio de una incubación a 65°C por 10 min. Los viales que contenían el producto de la ligación, se almacenaron a - 20°C hasta que se utilizaron para la transformación de la cepa bacteriana de *E. coli* DH5α (Nabi *et al.*, 2016).

6.5.3. Preparación de cepas bacterianas quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α

Se tomó una alícuota de la cepa bacteriana de *E. coli* DH5α conservadas en glicerola -80°C, se inocularon 100 µL de ésta en 5 mL de medio de crecimiento Luria Bertani, (Sigma SLBB9243) (LB) (sin antibiótico) estéril, posteriormente se incubaron en una a 37°C durante 16 hrs en agitación a 200 rpm en una incubadora de agitación orbital (222DS Benchtop Shaking Incubator, Labnet). Finalizada la incubación se tomó 1 mL del crecimiento celular y se resuspendió en 10 mL de medio LB estéril líquido; el cual, se incubó a 37°C por 4 horas a 200 rpm (Benchtop Shaking Incubator, Labnet), en tubo Falcon de 50 mL estéril (Axygen, Scientific). Posteriormente se prepararon 2 tubos Falcon de 50 mL enfriados en hielo, en los cuales se transfirieron las bacterias para ser centrifugadas a 3000 x g por 10 min. a 0°C, se decantó el sobrenadante y se dejaron los tubos invertidos durante 1 min. para retirar el medio restante del pellet. El pellet obtenido se resuspendió con 1 mL de CaCl₂ 0.1 M (Frio) y se centrifugó nuevamente por 10 min. a 3000 x g a 0°C, finalmente las bacterias se resuspendieron con 1 mL de CaCl₂ 0.1 M, se prepararon 10 alícuotas de 200 µL de células (100µL de células bacterianas y 100µL de una solución de CaCl₂ a 0.1 M y Glicerol 50% diluido 1:10) en viales estériles previamente enfriados antes de colocar la cepa bacteriana; los cuales, se etiquetaron como cepas bacterianas quimiocompetentes y se conservaron a -80°C para procesos posteriores (Green y Sambrook, 2012).

6.5.4. Transformación de cepas bacterianas quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α con el vector de clonación pGEM®-T Easy recombinante por shock térmico

Las cepas bacterianas quimiocompetentes se transformaron mediante una incubación entre estas y las reacciones de ligación por el método de choque térmico establecido por Green y Sambrook (2012). En esta etapa se utilizaron los viales con 100 µL de cepas bacterianas quimiocompetentes de *E. coli* DH5α; a las cuales, se

les agregaron 10 μ L de la reacción de ligación (ADN del plásmido pGEM®-T Easy-recombinante), se incubaron durante 30 min en hielo triturado y posteriormente se incubaron a 42°C (Baño Seco) por 45 seg., finalmente se incubaron 2 min en hielo triturado para reducir el daño posible a las células por el cambio de temperatura. Para iniciar la replicación del plásmido se prepararon viales con 900 μ L de LB (sin antibiótico) estéril líquido y se mezclaron con los 100 μ L de células transformadas, los viales se incubaron por 1 hora a 37°C con agitación a 200 rpm.

6.5.5. Selección de colonias de *Escherichia coli* DH5 α transformadas

Alternativamente al proceso anterior, las célula *E. coli* DH5 α transformadas se sembraron en placas de medio selectivo LB (500 μ L) suplementado con ampicilina (100 μ g/mL), Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)/X-Gal, con concentraciones finales de 96 μ g/mL y 40 μ g/mL respectivamente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs. Finalizado el proceso de incubación, las colonias que incorporaron el vector intacto fueron aquellas de una tonalidad azul, mientras que las que incorporaron el plásmido recombinante fueron blancas; esto debido a la interrupción del gen de la β -galactosidasa (Green y Sambrook, 2012).

6.5.6. Banco de células de clones bacterianos recombinantes

Se emplearon colonias aisladas de *E. coli* transformadas con el plásmido de clonaje, crecidas en agar LB selectivo con antibiótico y se inocularon en 5 mL de medio LB estéril por 16 hrs a 37°C en agitación a 200 rpm (Benchtop Shaking Incubator, Labnet). Posteriormente el cultivo se centrifugó a 3000 g por 10 min y se resuspendió el pellet con 1 mL de medio LB. Se prepararon alícuotas añadiendo 500 μ L de células y 500 μ L de glicerol al 50%. Las células se almacenaron a -80°C para su conservación.

6.5.7. Purificación y secuenciación de plásmidos recombinantes a partir de *Escherichia coli* DH5 α

Se purificó el ADN plasmídico utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (IBI scientific, USA), siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN plasmídico purificado se evaluó mediante digestión enzimática y los fragmentos de ADN resultantes se verificaron mediante una electroforesis. El resultado demostró la presencia de dos fragmentos en cada carril, uno correspondiente al plásmido (3015 pb) y otro específico para cada gen *POMP90-3* (245 pb) *POMP90-4* (209 pb), estos resultados demostraron si los clones bacterianos recombinantes contienen la construcción adecuada (Green y Sambrook, 2012).

6.5.8. Purificación del plásmidos pGEM $^{\circ}$ -T Easy recombinantes

La purificación del plásmido recombinante a partir de la cepa bacteriana de *E. coli* DH5 α se realizó empleando el kit comercial High-Speed Plasmid Mini Kit (IBI Scientific, USA). La extracción se realizó a partir de 5 mL de cultivo de células *E. coli* DH5, los cuales se centrifugaron a 16,000 g por 1 min. Posteriormente, se añadieron 200 μ L de solución PD1 y se homogeneizó mezclando en vortex. Después, se adicionaron 200 μ L de buffer PD2 y se mezclaron por inversión 10 veces. Luego se añadieron 300 μ L de buffer PD3, se mezclaron por inversión nuevamente y se centrifugaron a 14,000 g por 30 seg. Se realizó un lavado con 400 μ L de buffer W1 y después con 600 μ L de buffer de lavado, se centrifugaron a 14,000 g por 30 seg. Una última centrifugación a 14,000 g por 3 min., esto se realizó para eliminar restos del buffer de lavado contenidos en los tubos. Finalmente el ADN plasmídico se eluyó con 50 μ L de buffer de elusión del kit. El ADN plasmídico se conservó a -20 $^{\circ}$ C hasta su uso.

6.5.9. Análisis del plásmido pGEM $^{\circ}$ -T Easy recombinante por digestión enzimática

La presencia del plásmido recombinante se comprobó a través de digestión enzimática, la reacción se realizó en un volumen final de 20 μ L: 5 μ L de ADN

plasmídico, 0.5 μL de cada una de las enzimas de restricción (*NcoII/NdeI*), 2 μL de buffer D (10X) y 2 μL de BSA 10X. La reacción de digestión se incubó a 37°C por 3 hrs. y los productos obtenidos terminada la incubación se evaluaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, visualizando la presencia de los fragmentos con tinción con bromuro de etidio en un transiluminador (Mini Bis Pro, DNR Bio-imagen System, USA).

6.5.10. Identificación de epítomos con potencial inmunogénicos.

Se utilizó el programa bioinformático *Immune Epitope Database and Analysis Resource* y “*BepiPred-2.0*”, para la predicción de epítomos con potencial inmunogénico, a partir del análisis de las secuencias obtenidas a raíz de la secuenciación de éstas.

VII. RESULTADOS

7.1. Análisis teórico de secuencias

La primera etapa del presente proyecto de investigación se enfocó en determinar el o los genes de *C. abortus* que podrían ser candidatos adecuados para su clonación. Para ello, se realizó el análisis de algunas secuencias que codifican proteínas de superficie y factores de virulencia de este patógeno identificadas previamente (Hagemann *et al.*, 2016), a través de secuencias reportadas en el GenBank. Se empleó el software “*Immune Epitope Database Analysis Resource*” (IEDB) para dicho fin. Se evaluaron un total de ocho secuencias; de las cuales, cuatro proteínas fueron de superficie y cuatro asociados a la virulencia de la bacteria (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Proteínas empleadas para la predicción *in silico* de epítomos inmunogénicos reportadas en el GenBank.

Nombre	Proteína	Tamaño	ID GenBank	Referencia
Pmp18D	Proteína de la Membrana Polimórfica	1533 aa	CAH64218	(Hagemann <i>et al.</i> , 2016)
TARP	Proteína de Reclutamiento de Actina Translocada	870 aa	CAH63625	
MIP	Potenciador de Infectividad de Macrófagos	255 aa	CAH63537	
CPAF	Factor de Actividad Similar a La Proteasa de Chlamydia	603 aa	CAH64159	
MOMP	Proteína Principal de la Membrana Externa	389 aa	WP_011096793	(Ling, Liu, <i>et al.</i> , 2011)
GroEL	Proteína de Choque térmico	544 aa	AAL14265	(Héchar, Grépinet and Rodolakis, 2004)
POMP90-3	Proteína de la Membrana Polimórfica	75 aa	U65943	(Longbottom <i>et al.</i> , 2002)
POMP90-4		62 aa	U65943	

7.1.1. Epítomos lineales de la proteína Pmp18D de *Chlamydia abortus*

1 MIEKKVSRFQ KSTFSSHVVL AILVSTGMIT NNDKLYGYVP ASEVILDTLS **MPKAELEVPS**
61 AG**IFKKEKPI HAQGP****PKGET DQETS**LLDNT STCVYKVLVA **EDEQRQHLE**N TSTIFQTCNV
121 LSWEN**LDTRS TNAEAEK**GKT **SPQYAV**EDLQ QGLAFICYKNA **PEHLLDANT**P GFLGIALKGT
181 RMKSGLSFTN LK**STAAGAAV YSEEDV**LFES FKEKLVFDGC **ESQAGGGAVS** **GRSIAIHGCH**
241 ALTIAN**SKTD VELKPT**SGES **SDFSLG**GGAF **NANQVHPV**HK **SRFASG**DVVF LDNQGSVLLS
301 GN**HADKANGG AVACGN**FICS VNHSDIHYLD **NYALSGGAVS** **SSKSMDF**CGN LGSIEFLNNQ
361 **ALASSE**GLSLF **LGGGALA**AGE RISFLNNHGI **LCSKNTAK**CR GGALLSREVR **IVENVGSS**LF
421 KEN**TAEVTGG AISSQ**HQVEI **DQNF**GNVTFE **GNTSKF**GGGA IYCLL**PAQPD TDAQE**PRIGS
481 **GDIKIVD**NVG EVHFTSNANL **LDSQETH**SYL GGGALYGSNV LISGNIGVIT **FSKNQAGQ**CE
541 **SSSTHIG**GGA IFAHEVV**TLS GNSGEV**TFSY NKGQIL**PLPL SPTPAE**ESST **SNAPIES**STP
601 **VNLGVR**GGGA IFAKS**ISVED NSAFV**SFSEN **SMEIRD**NQAQ **KENPLG**GGAL FGLDSVGLKN
661 NVDLAFS**NNR VSGGN**SSGGA ILSKEVAIAH NGKVQ**FTRNC AKFLG**GAVCA LGDTL**RIENN**
721 **ESTVSF**VGNR **TIAAGG**ALAS AAGAVS**ISQN LGK**VEFKDNF VFGDPY**IENL EKGQ**INSEGH
781 **HSGGGA**IFAK TSVVIRGNDN KVL**FSGNSAG CFGG**AILTGS **LTSTES**QERF AAK**VESDNT**K
841 VVIT**ENTGDV IFSGN**STTAS **KHPEHN**LFGG GAIHTQ**DLII KNEG**SVAFY **NNYAPT**GGAV
901 **RISEKGS**VVL QALGGD**IVFQ GNRN**SEDVSN GMY**FSGKE**SK LVEVS**AAG**ET SVIFSDAIVF
961 EDLTLR**KGTK DHED**ALNDPT LIFNS**KAKDD AEITH**SGNVR FSHAT**SKI**PQ VALLES**GTM**
1021 LSNKAQ**LWLC GLKQ**EKGSEI LLSAGT**VLRI FDP**NAKP**TEK IESPT**SNVYY SAHES**VKQPE**
1081 **NKTLAD**INSI **GIDLAS**FSVSS **DETFV**PPQI **IVPKG**MTIGS **GSLDLN**LDS **VGAGY**ENHAL
1141 LGKETDITLL SFKSAS**SULD TPDL**DHALEE LRVKVS**VPTI TED**TYGHMGR **WSDPQ**VVDGK
1201 LMINW**KPTS Y KLN**PEKSGAI VLNSL**WGHC DLR**SLK**QQQL AHN**ITAQRME LDFST**NIWGS**
1261 GM**GTFT**NCAT IGKVD**GFTHR AGG**YALGLDT Q**LIED**FLIGG SFAQ**FFGYTD SQS**YSSRS**DQ**
1321 **SGYLG**SGYLG IFTGS**WLFKG MLI**YSNMHND **LNTQY**PQPNL **GGSKG**SWDSR GILADAHVDY
1381 RYIVNS**RRLI SSIV**SAVVPF VEA**EYVY**NF PKFT**EIGSEA RTF**DEGH**LQN** VAIPFGVTLE
1441 H**NYSR**GORSE **VNSV**SFSYAI **DVYR**QEPNVL IHL**PEAS**YSW **NGVGS**NLARK **SMKAQ**FSNDT
1501 **EWN**SYFSTFL GFTYEWREHT IAYDL**NCGMR LIF**

Figura 1. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 20 regiones específicas en la proteína **Pmp18D** de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 2. Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína **Pmp18D** de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición	Epítopo	No. residuos
1	68-87	KPIHAQGP KKGET DQETS LL	20
2	126-148	LDTRSTNAEAEK GKT SPQYAV ED	23
3	220-231	CESQAGGGAVS G	12
4	247-265	SKTDVELKPT SGES SDFSL	19
5	303-312	HADKANGGAV	10
6	424-435	TAEVTGGAISSQ	12
7	467-481	AQPDTDAQE PRIG SG	15
8	534-547	NQAGQCE SS THIG	14
9	579-606	PLSPTPAEES STS SNAPIES ST PVNLGVR	28
10	632-646	MEIRD NQAQ KENPLG	15

11	669-681	NRVSGGNSSGGAI	13
12	772-786	KGQINSEGHHSGGGA	15
13	922-929	NRNSEDVS	8
14	967-977	KGTKDHEDALN	11
15	1053-1070	PNAKPTEKIESPTSNVYY	18
16	1073-1085	HESVKQPENKTLA	13
17	1099-1111	SSDDETPVPPQII	13
18	1207-1217	PTSYKLNPEKS	11
19	1309-1324	TDSQSYSSRSQSGYL	16
20	1350-1369	DLNTQYPQPNLGGSKGSWDS	20

7.1.2. Epítomos lineales de la proteína MOMP de *Chlamydia abortus*

1 MKKLLKSALL FAATGSALS L QALPVGNP AE PS LLIDGTMW EGASGDPCDP CSTWCD A ISI
 61 RAGYYGDYVF DRVLKVDV NK TI TGMGAVPT GTAAANYKTP TDRPNIA YGK HLQDAEWFTN
 121 AAFLALNIWD RFDIFCTLGA SNGYFKASSA AFNLVGLIGV KGSSIAADQL PNVGITQGIV
 181 EFYTDTFE SW SVGARGALWE CGCATLGAEF QYAQSNPKIE MLNVVSSPAQ FVVHKPRGYK
 241 GTAFPLPLTA GTDQATDTKS ATIKYHEWQV GLALS YRLNM LVPYIGVNWS RATFDADAIR
 301 IAQPKLAAAV LNLTTWNPTL LGEATALDTS NKFADFLQIV SIQINKMKSR KACGVAVGAT
 361 LIDADKWSIT GEARLINERA AHMNAQFRF

Figura 2. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína MOMP de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 3. Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína MOMP de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición	Epítomo	No. residuos
1	24-32	PVGNPAEPS	9
2	40-53	WEGASGDPCDPCST	14
3	85-107	MGAVPTGTAAANYKPTDRPNIA	23
4	236-243	PRGYKGTA	8
5	248-262	LTAGTDQATDTKSAT	15

7.1.3. Epítomos lineales de la proteína TARP de *Chlamydia abortus*

1 **MSSPINNQPI TNVTTTTTTT PVVTTSTSE**G GHV**VSTTGTE AAETTSQTVN TTAEQAVSQA**
 61 **ESDAGAVVFT TERSVSTTSP STGSVGTAT** AANLLGSQIL GLGR**SRTDST SSSDSDALSD**
 121 **ISSTPSSHDS GNVGSTEDLT STSGDVDLG**D LE**GLRGTEAA DGAARPDGPG GLPDMALPKY**
 181 **DPTDKA**SIK FLSTP**SVQAK LQ**TKAGHIVY MDEARGSFIF VRNG**DWSTAE** **SIAVTNGKTK**
 241 **EPITD**VKDLE MCIAKFCVGY ETMH**ADWTNN IQPRIAGQTG ETGHYDHL**LLM SMKFKTTVLY
 301 **GPWNSKESS NYTPSVWRRG TKCESGAIWG** DV**GGLKGINW NNVQRPNEG**M VFS**RETSSPT**
 361 **QQQPQVPYA Q**PVINVNLGG IST**SVNVTGG TTTT**TVTSTT **TQPTD**TSNDG **VDNDQ**NVDET
 421 **NFDDTETEST GTQEDHSIQF SDEGNGFDSL EPAPP**PPPP **TQGGV**NITGM **PKDSL**QQVLLQ
 481 NVRQHLD**TVY DQ**NSEHHEGN **QDLG**TVV**RTS ENGAYK**PTVL LN**KDQ**SGGG **GVQ**RESNDN
 541 **EDSEL**GNILG RVREHL**DVVY PEGG**NGEAIP **VN**QNLGEVIR **DVEAGKTPKP TQ**PEGIFVAK
 601 RV**NVD**ANGEI **VNNSKTETG SRTN**RIETG **SRTSN**LMGAT **SGDG**PEGLEH LLPQLRAHLD
 661 **ESFDA**QGNLI **TPQK**TVGKL VKAF**QERTGS GGIVAPMPAQ STVI**ASRPVQ **QQA**TISVLP
 721 **QAQ**TAETVAP **REAPDLHGAA RDVA**SSLSNL LEA**ATPSVQ QVST**PAP**QQQ VASST**PVAGS
 781 **RETATLTKGE APSGI**PEAAG **NVIQ**ALS**NVA KKI**QMF**EQGS RLLQ**EAL**DSA D**TEST**QRKQL**
 841 **ADAARN**VTTQ LSKTL**SKATG SPPPPP**QRRS

Figura 3. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 8 regiones específicas en la proteína TARP de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 4. Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína TARP de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición	Epítomo	No. residuos
1	105-149	SRTDSTSSSDSDALSDISSTPSSHDSGNVGSTEDLTSTSGDVDLG	45
2	153-186	GLRGTEAADGAARPDGPGGLPDMALPKYDPTDKA	34
3	354-371	RETSSPTQQQPQVPYAQ	18
4	384-474	SVNVTGGTTTTVTSTTTQPTDTSNDGVDNDQNVDET NFDDTETESTGTQEDHSI QFSDEGNGFDSLEPAPPPPPTQGGVNITGMPKDS	91
5	523-545	KDQSGGGGGVQRRSNDNEDSEL	23
6	582-595	VEAGKTPKPTQPEG	14
7	603-648	NVDANGEIVNNSKTETGSRTNRIETGSRTSNLMGATSGDGPEGL	46
8	856-870	SKATGSPPPPQRRS	15

7.1.4. Epítos lineales de la proteína CPAF de *Chlamydia abortus*

1 MKLKQITVLI CSLLLGFHFS GSAKTLVHQS ACADLDFLEH LLDIK**YAPKD** WKHKLFRWDL
 61 **KDVTDQ**ARVK LKL**ENPSVK** YCQGVLSEYI ASLNDFHAGI TFFATEG**SYL** PYTLKLSSNN
 121 RCFVVDVHTY HSD**ISV**GDEI LEMDGVPILE AIESI**RTGRG** **APSDYAT**ATR MLFSRSAALG
 181 HQIPVGIATL KIRR**PSG**LTR TLKVKW**RHTP** **EHIRDLSLIS** PLVQNP**VIEM** **KSPRALPLLS**
 241 GVSDKCLFTN AMVPYFWSEL **REQYKR****GFYS** **DYNIGSKKGF** LPDFGKVT**WR** **AQSEPYHAYI**
 301 FTVA**DDRGQS** HEIGFLRIST YS**WTDMEDRS** **VENMNSPWED** FNGIIDVLQS KSEALIID**QT**
 361 **NNPPGG**SVFYI YGLLSRLT**DK** **PLETP**KHRMI LTQSEVQAAI KWLEMLEG**VE** **TDEQARNALG**
 421 **QDMEGY**PIDM HAVGYLQKFS HTILNCWERG DINLTPVPPL LGFAYVH**PHP** **EHRYTHPICV**
 481 LINEED**FSCG** DLLPAIM**KDN** GRALIVGT**TT** **AGAG**GFVFTV DF**PSRTGI**KN CSLTGS**LAVR**
 541 **SDGSYI**ENLG VSPHVSLGFT **DADIQTGRYA** **DYIGSVKRIV** LQLVE**KDETA** **SHTEESADKI**
 601 **TES**

Figura 4. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína CPAF de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 5. Epítos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína CPAF de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición	Epítoto	No. residuos
1	156-167	RTGRGAPSDYAT	12
2	305-310	DDRGQS	6
3	359-365	QTNNPPGG	7
4	379-385	DKPLETP	7
5	586-603	KDETA SHTEESADKITES	18

7.1.5. Epítos lineales de la proteína GroEL de *Chlamydia abortus*

1 MAAKNI**KYNE** **DARKKIHKGV** KTLAEAVKVT **LGPKGRHVVI** **DKSFGSPQVT** **KDGVTV**VAKEI
 61 **ELEDKHENMG** **AQMVKEVASK** **TADKAGDGTT** **TATVLAELAIY** **SEGLRNVTAG** **ANPMD**LKRG I
 121 DKAVKVVVDQ IKKISK**PVQH** HKEIAQVATI **SANNDAEIGN** LIAEAMEK**VG** **KNGSITVEEA**
 181 **KGFETVLDVV** EGMNFN**RGYL** **SSYFTTNPET** **QECVLEEALV** LIYDKKISGI **KDFLPVLQQV**
 241 **AESGRPLLI** AEDIEGEALA TLVVNRLRAG FRVCAVK**APG** **FGDRRKAMLE** DIAILTGG**QL**
 301 ISEELGMKLE NTTLSMLGKA KKVIVSKEDT **TIVEGLGNKE** **DIEARCENIK** **KQIEDSTSDY**
 361 **DKEKLQERLA** KLSGGIAVIR VGAATE**EIEMK** **EKKDRVDDAQ** **HATLAAVEEG** **ILPGGGT**ALV
 421 RCIPTLEAFI PVL**TNEDEQI** GARIVLKALS APLKQIAANA **GKEGAIICQQ** VLARSS**NEGY**
 481 **DALRDAYTDM** IEAGILD**PTK** **VTRCALESAA** SVAGLLLTTE ALIADI**PEEK** **SSSVPAMPGA**
 541 **GMDY**

Figura 5. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína GroEL de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 6. Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína CPAF de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición	Epítomo	No. residuos
1	43-55	SFGSPQVTKDGV	13
2	78-92	ASKTADKAGDGT	15
3	205-212	TTNPETQE	8
4	351-365	KQIEDSTSDYDKEKL	15
5	526-544	IPEEKSSSVPAMPGAGMDY	19

7.1.6. Epítomos lineales de la proteína MIP de *Chlamydia abortus*

1 MKKQWYLIII TMVVSFSIAA **CDQSSHNT KTQVGEESTA SDSQLS**VNQQ ISRTFGHLLA
 61 RQLHKSEDIV MDIAEVAKGL QAELECKS**AP L**TESEYE**E**EM AEIQQLVFEK KAKENLSLAE
 121 KFLQ**ENK**KNA **GV**VEVQADKL QYRIVK**EGTG KAISGK**PSAL LHYKGSFING QV**FSSSEANK**
 181 EPILLPLAQT IPGFSLGMQG **MKEG**ETRI**LY** IHPDL**AYGTS GQLPP**NSLLI FEINLIET**TE**
 241 **DTVALPDTED KNTAS**

Figura 6. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 5 regiones específicas en la proteína MIP de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 7. Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína CPAF de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición	Epítomo	No. residuos
1	21-46	CDQSSHNTKTQVGEESTASDSQLS	26
2	89-99	APL TESEYE EK	11
3	147-156	EGTGKAISGK	10
4	216-225	AYGTS GQLPP	10
5	240-255	EDTVALPDTEDKNTAS	16

7.1.7. Epítomos lineales del fragmento de la proteína POMP90-3 de *Chlamydia abortus*

1 YCPPG**TTGYG AIQ**TKGNTTL KDNSSLVF**HK NCSTAE**GGAI QCKGSSDAEL **KIENNQLVF**
61 **SENSSTSKGG A**IYAD

Figura 7. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 9 regiones específicas en la proteína POMP90-3 de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 8. Epítomos predichos, regiones específicas de tamaños variables predichas dentro de la proteína POMP90-3 de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición		Epítomo	No. residuos
1	6	13	TTGYGAIQ	8
2	19	19	T	1
3	21	21	K	1
4	23	23	N	1
5	25	26	SL	2
6	29	36	HKNCSTAE	8
7	45	45	S	1
8	47	47	D	1
9	57	71	NLVFSENSSTSKGGA	15

7.1.8. Epítomos lineales del fragmento de la proteína POMP90-4 de *Chlamydia abortus*

1 STSKGGAIYA DKLTIVSGGP TLF**SNNSVSN GSSPKG**GAIS IKDSSGECSL TADLGDITFD
61 GN

Figura 8. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las 3 regiones específicas en la proteína POMP90-4 de *Chlamydia abortus*. Los resultados de la predicción de los epítomos lineales de células B están marcados en amarillo.

Cuadro 9. Epítomo predicho, regiones específicas de tamaños variables predicha dentro de la proteína POMP90-4 de *Chlamydia abortus*.

No.	Posición		Epítomo	Tamaño
1	25	36	NNSVSN GSSPKG	12

A partir de este análisis, los genes que se clonaron fueron dos fragmentos de la Proteína de la Membrana Polimórfica de *C. abortus*: POMP90-3 y POMP90-4. Esto se basó en características importantes de este tipo de proteínas, que las hacen candidatos adecuados para el desarrollo de pruebas de ELISA. Ya que, se ha demostrado en ciertos estudios, que la respuesta inmune provocada por las **proteínas de superficie** tiende a ser más fuertes y que perduran durante todo el ciclo de la infección por *C. abortus*. En comparación con las proteínas asociadas a **factores de virulencia** (Forsbach-Birk *et al.*, 2013) como: CPAF, MIP, GroEL y TARP que tienden a provocar respuestas inmunes cortas que solo puede detectarse etapas intermedias de la infección por *C. abortus*(Hagemann *et al.*, 2016). Por lo que no pueden ser detectadas en etapas iniciales de la infección (Hagemann *et al.*, 2016).

7.2. Identificación molecular de los fragmentos *POMP90-3* y *POMP90-4* de la proteína de la membrana polimórfica de *Chlamydia abortus*.

Una vez que se determinaron los genes a clonar, los fragmentos 3 y 4 de la Proteína de la Membrana Polimórfica de *C. abortus* fueron identificados empleando una PCR punto final para cada fragmento(Longbottom *et al.*, 2002). Los resultados de estas pruebas determinaron la presencia de los fragmentos específicos para cada gen de ambos fragmentos POMP90-3 (**245 pb**) y POMP90-4 (**209 pb**) (**Figura 9**).

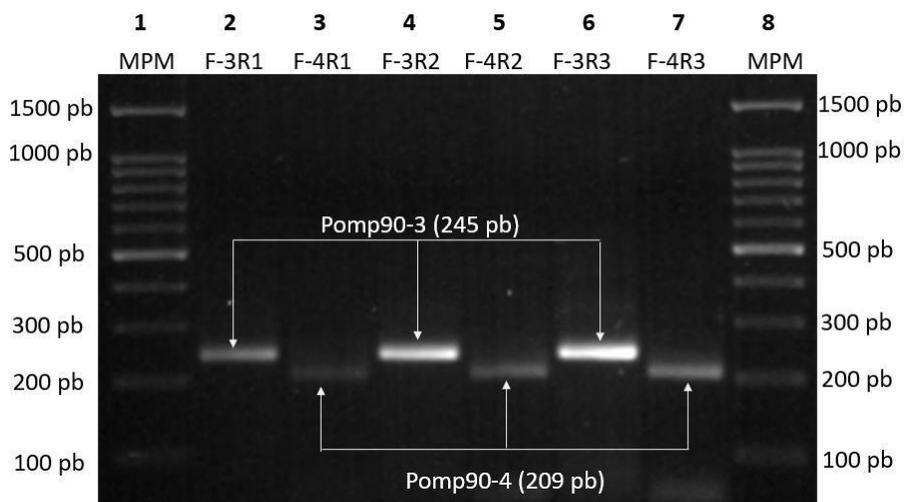


Figura 9. Identificación específica de los fragmentos 3 y 4 del gen de la proteína de la membrana polimórfica (POMP90) de *Chlamydia abortus*. Carril 1 y 8: Marcador de Peso Molecular, Carril: 2, 4 y 6. Fragmento 3 (245 pb) y Carril: 3, 5 y 7. Fragmento 4 (209 pb).

7.3. Clonación de los genes *Pomp90-3* y *Pomp90-4* de *Chlamydia abortus* en *Escherichia coli* DH5 α

Una vez identificados los fragmentos de interés, ambos fragmentos fueron clonados para finalmente obtener los plásmidos recombinantes, denominados: **pGEM T- easy Pomp90-3** y **pGEM T- easy Pomp90-4**, en las células transformadas con los mismos a partir de la evaluación del proceso de transformación descrito previamente (**Figura 10**).

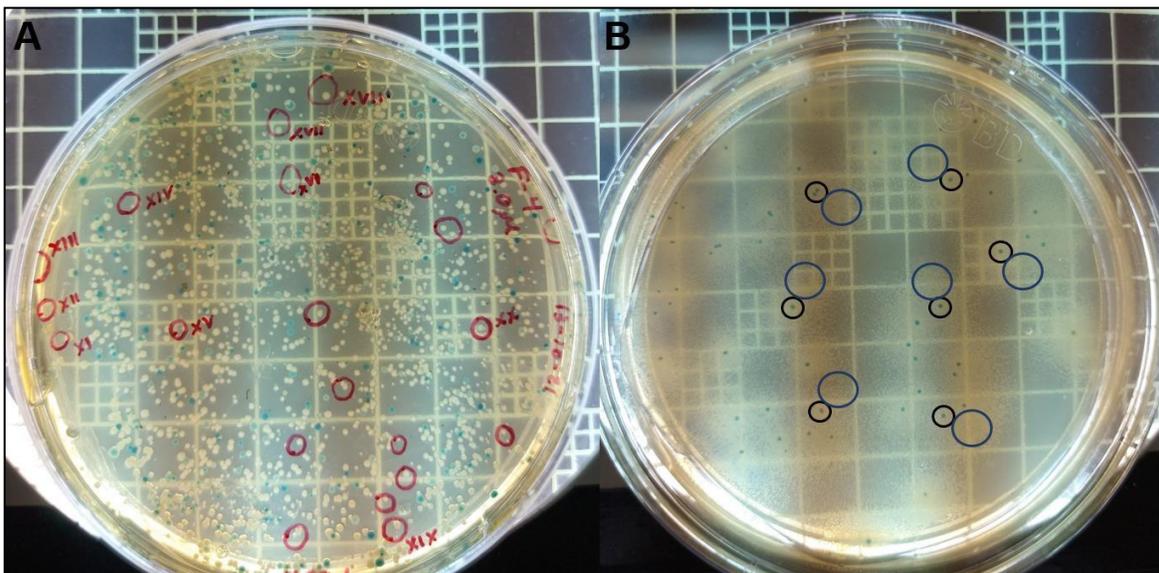


Figura 10. Identificación y selección de colonias transformadas con los vectores recombinantes. **A)** Colonias blancas que integraron el **vector recombinante** (círculos rojos). **B)** Colonias azules, integraron un **vector religado** (círculos negros). Colonias satélite (círculos azules).

Las colonias blancas aisladas (clones bacterianos recombinantes) fueron aisladas y se produjeron bancos de células transformadas; el cual, se empleó para los procesos de evaluación subsecuentes.

7.4. Purificación de plásmidos recombinantes

La purificación de los dos plásmidos recombinantes se realizó a partir de los clones bacterianos recombinantes, los plásmidos purificados fueron evaluados mediante electroforesis para evidenciar la presencia de éstos en las muestras purificadas (**Figura 11**).

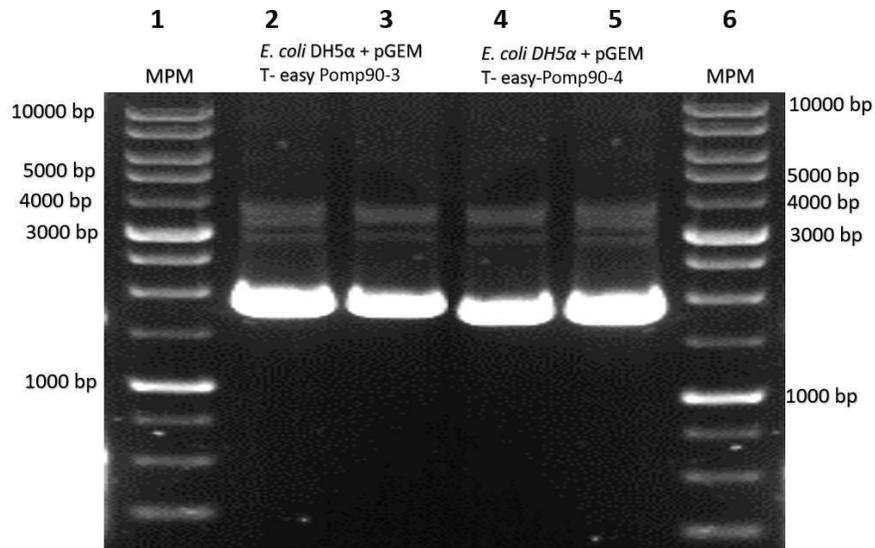


Figura 11. Evaluación de la presencia de los plásmidos recombinantes de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4 después de la purificación. Carril 1 y 6, marcador de peso molecular. Carril 2 y 3, pGEM T- easy Pomp90-3. Carril 4 y 5 pGEM T- easy Pomp90-4

7.5. Evaluación de los plásmidos pGEM®-T Easy recombinantes

Obtenidos los plásmidos recombinantes purificados a partir de los clones bacterianos recombinantes, se verificó la presencia de los genes de interés a través de dos métodos, **i)** digestión enzimática empleando enzimas de restricción que cortan los sitios de múltiple clonaje y **ii)** una prueba de PCR empleando los mismos iniciadores que se describieron anteriormente.

7.5.1. Digestión enzimática de los plásmidos recombinantes

Las reacciones de purificación previamente obtenidas se sometieron a una reacción de digestión enzimática, un resultado positivo nos reveló la presencia de dos bandas que correspondieron al plásmido (**3015 pb**) y otra específica para cada fragmento, rOMP90-3 (**245 pb**) y rOMP90-4 (**209 pb**) (**Figura 12**).

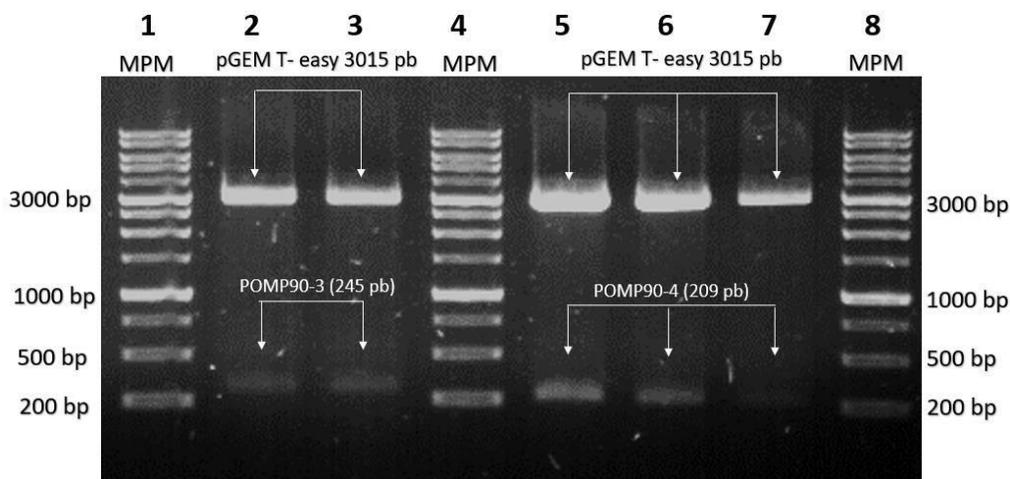


Figura 12. Identificación de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4 a través de digestión enzimática con enzimas de restricción *NcoI* y *NdeI*. Carril 1, 5 y 8, **marcador de peso molecular**. Carril 2-4, **pGEM T- easy (3015 pb)** y **rOMP90-3 (245 pb)**. Carril 4 y 5 **pGEM T- easy Pomp90-4 (209 pb)**.

7.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa de los plásmidos recombinantes

La misma reacción de purificación que se empleó anteriormente en la digestión enzimática se usó para evaluar mediante una PCR punto final específica para ambos fragmentos por separado, un resultado positivo nos reveló la presencia específica para cada fragmento, rOMP90-3 (**245 pb**) y rOMP90-4 (**209 pb**) (**Figura 13**).

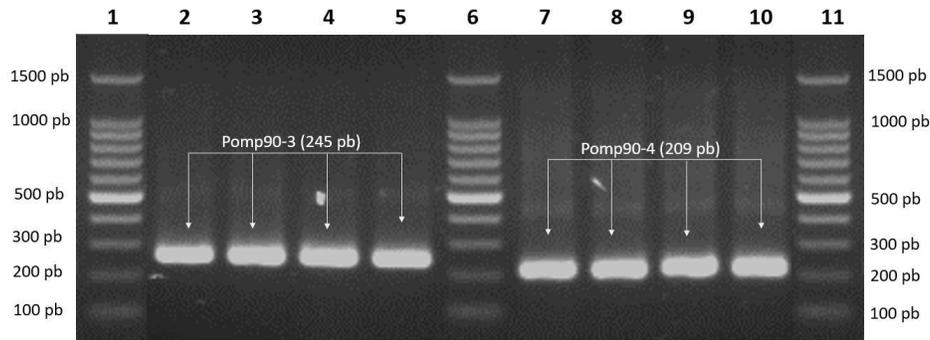


Figura 13. Identificación específica de los fragmentos rOMP3 y rOMP4 por PCR a partir de las purificaciones de los plásmidos recombinantes. Carril 1, 6 y 11, Marcador de peso molecular. Carril 2-5 *Pomp90-3* (245 pb). Carril 7-10 *Pomp90-4* (209 pb).

7.6. Secuenciación y análisis de los plásmidos recombinantes rOMP90-3 y rOMP90-4.

Una vez que se corroboró la presencia de los vectores recombinantes y los fragmentos de interés a través de la digestión enzimática y la PCR, se procedió a la preparación de éstas para su secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSADN) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma Nacional de México (UNAM). El programa Mega 11 se utilizó para el análisis de dichas secuencias, posteriormente las secuencias se alinearon en el software blastn y blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con secuencias depositadas dentro del GenBank, para identificar porcentajes de identidad.

7.6.1. Análisis de secuencias del fragmento rOMP90-3 de *Chlamydia abortus*

```
Query: None Query ID: lcl|Query_12131 Length: 225

>Chlamydomphila abortus strain S26/3, complete genome
Sequence ID: CR848038.1 Length: 1144377
Range 1: 320763 to 320987

Score:416 bits(225), Expect:9e-118,
Identities:225/225(100%), Gaps:0/225(0%), Strand: Plus/Minus

Query 1      TATTGTCCTCCAGGCACAACCTGGTTACGGAGCTATACAGACTAAAGGCAACACAACCTTTA 60
            |||
Sbjct 320987  TATTGTCCTCCAGGCACAACCTGGTTACGGAGCTATACAGACTAAAGGCAACACAACCTTTA 320928

Query 61     AAAGATAACTCTAGTCTTGCTCTCCATAAAAACTGCTCAACAGCAGAAGGTGGGGCTATC 120
            |||
Sbjct 320927  AAAGATAACTCTAGTCTTGCTCTCCATAAAAACTGCTCAACAGCAGAAGGTGGGGCTATC 320868

Query 121    CAGTGTAAGGAAGCAGTGATGCTGAATTAATAAGAAAATAATCAGAATCTGGTTTTTC 180
            |||
Sbjct 320867  CAGTGTAAGGAAGCAGTGATGCTGAATTAATAAGAAAATAATCAGAATCTGGTTTTTC 320808

Query 181    TCAGAAAACCTCCACTTCAAAGGCGGGGCTATTTATGCTGAT 225
            |||
Sbjct 320807  TCAGAAAACCTCCACTTCAAAGGCGGGGCTATTTATGCTGAT 320763
```

Figura 14. Alineación de la secuencia del fragmento rOMP90-3 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (Query) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (Sbjct).

```
Query: None Query ID: lcl|Query_21653 Length: 225

>autotransporter domain-containing protein [Chlamydia abortus]
Sequence ID: WP_011097191.1 Length: 839
>polymorphic outer membrane protein [Chlamydia abortus S26/3]
Sequence ID: CAH64045.1 Length: 839
Range 1: 129 to 203

Score:155 bits(393), Expect:1e-47,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:75/75(100%), Positives:75/75(100%), Gaps:0/75(0%)

Query 1      YCPPGTTGYGAIQTKGNTTLKDNSSLVFKNCSTAEGGAIQCKGSSDAELKIENNQNLFV 180
            YCPPGTTGYGAIQTKGNTTLKDNSSLVFKNCSTAEGGAIQCKGSSDAELKIENNQNLFV
Sbjct 129     YCPPGTTGYGAIQTKGNTTLKDNSSLVFKNCSTAEGGAIQCKGSSDAELKIENNQNLFV 188

Query 181    SENSSTSKGGAIYAD 225
            SENSSTSKGGAIYAD
Sbjct 189     SENSSTSKGGAIYAD 203
```

Figura 15. Alineación de la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-3 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la

secuencia de interés (**Query**) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (**Sbjct**).

7.6.2. Análisis de secuencias del fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*

De igual forma se realizó el análisis y alineación de las secuencias de nucleótidos obtenidas del fragmento rOMP90-4 (**Figura 16**); así como, de las secuencias de aminoácidos (**Figura 17**).

```

Query: None Query ID: lcl|Query_3233 Length: 186

>Chlamydomphila abortus strain S26/3, complete genome
Sequence ID: CR848038.1 Length: 1144377
Range 1: 320610 to 320794

Score:342 bits(185), Expect:1e-94,
Identities:185/185(100%), Gaps:0/185(0%), Strand: Plus/Minus

Query 2      CCACTTCAAAGGCGGGGCTATTTATGCTGATAAACTCACCATTGTCTCAGGTGGGCCTA 61
             |||
Sbjct 320794 CCACTTCAAAGGCGGGGCTATTTATGCTGATAAACTCACCATTGTCTCAGGTGGGCCTA 320735

Query 62      CATTATTTCTAACAACTCTGTATCCAACGGTTCATCCCTAAAGGCGGAGCTATTAGCA 121
             |||
Sbjct 320734 CATTATTTCTAACAACTCTGTATCCAACGGTTCATCCCTAAAGGCGGAGCTATTAGCA 320675

Query 122     TAAAAGATTC AAGTGGTGAATGTAGCCTAACCGCTGATCTCGGAGATATTACCTTCGATG 181
             |||
Sbjct 320674 TAAAAGATTC AAGTGGTGAATGTAGCCTAACCGCTGATCTCGGAGATATTACCTTCGATG 320615

Query 182     GGAAC 186
             |||
Sbjct 320614 GGAAC 320610
  
```

Figura 16. Alineación de la secuencia del fragmento rOMP90-4 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (Query**) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (**Sbjct**).**

```

Query: None Query ID: lcl|Query_80993 Length: 186

>polymorphic outer membrane protein 90A, partial [Chlamydia abortus]
Sequence ID: ACD10929.1 Length: 359
Range 1: 179 to 239

Score:119 bits(298), Expect:6e-35,
Method:Compositional matrix adjust.,
Identities:61/61(100%), Positives:61/61(100%), Gaps:0/61(0%)

Query 4      TSKGGAIYADKLTIVSGGPTLFSNNSVSNVSGSSPKGGAISIKDSSGECSLTADLGDITFDG 183
             TSKGGAIYADKLTIVSGGPTLFSNNSVSNVSGSSPKGGAISIKDSSGECSLTADLGDITFDG
Sbjct 179     TSKGGAIYADKLTIVSGGPTLFSNNSVSNVSGSSPKGGAISIKDSSGECSLTADLGDITFDG 238

Query 184     N 186
             N
Sbjct 239     N 239
  
```

Figura 17. Alineación de la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-4 con secuencias reportadas en el GenBank. Con un 100% de identidad entre la secuencia de interés (**Query**) y la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (**Sbjct**).

7.7. Predicción *in silico* de epítomos inmunogénicos

Una vez realizado el análisis y alineación de las secuencias que obtuvimos en la fase experimental en este proyecto de investigación, estas fueron sometidas a una evaluación *in silico* empleando el software bioinformático “*Immune Epitope Database*” disponible en: tools.iedborg/bcell/ y “*BepiPred-2.0*” disponible en: <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>, con la finalidad de identificar la presencia de los epítomos inmunogénicos para el diagnóstico específico de *C. abortus*.

7.7.1. Identificación de epítomos inmunogénicos fragmento rOMP90-3 de *Chlamydia abortus*

Con un total de 75 residuos que conforman la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-3, al ser evaluado por los dos softwares, como se especuló anteriormente, la secuencia conservada al 100% predijo nueve epítomos de diferentes tamaños (**Cuadro 10**).

Cuadro 10. Epítomos, secuencias de aminoácidos (residuos) predichos en el fragmento rOMP90-3 de *Chlamydia abortus*.

No.	Inicio	Fin	Epítomo	No. residuos
1	6	13	TTGYGAIQ	8
2	19	19	T	1
3	21	21	K	1
4	23	23	N	1
5	25	26	SL	2
6	29	36	HKNCSTAE	8
7	45	45	S	1
8	47	47	D	1
9	57	71	NLVFSENSSTSKGGA	15

“*BepiPred 2.0*” evaluó cada residuo de la secuencia proteínica, este programa determinó un resultado similar al predicho por “*Immune Epitope Database*”; con la

Cuadro 11. Cuatro epítomos discontinuos predichos en el fragmento rOMP90-3 de tamaños variables, específicos de *Chlamydia abortus*.

No.	Residuos	No. residuos
1	_:G8, _:Y9, _:G10, _:A11, _:I12, _:Q13, _:T14, _:K15, _:G16, _:N17, _:T18, _:S46	12
2	_:C32, _:S33, _:T34, _:A35, _:E36, _:G37, _:S64, _:S65, _:T66, _:S67	10
3	_:H29, _:K30, _:S61, _:E62, _:N63	5
4	_:K21, _:D22, _:N23, _:S24, _:S25, _:L26, _:V27, _:F28, _:L50, _:E53, _:N54, _:N55, _:Q56, _:N57, _:L58, _:V59, _:F60	17

Además, las estructuras tridimensionales de los **epítomos discontinuos** demuestran que estos se encuentran expuestos en la superficie de la estructura de todo el **fragmento rOMP90-3 (Figura 19)**, el programa identificó un total de cuatro epítomos discontinuos con sus respectivas estructuras tridimensionales.

EllIPro: Epitope 3D Structures for file4y15_c4w.pdb

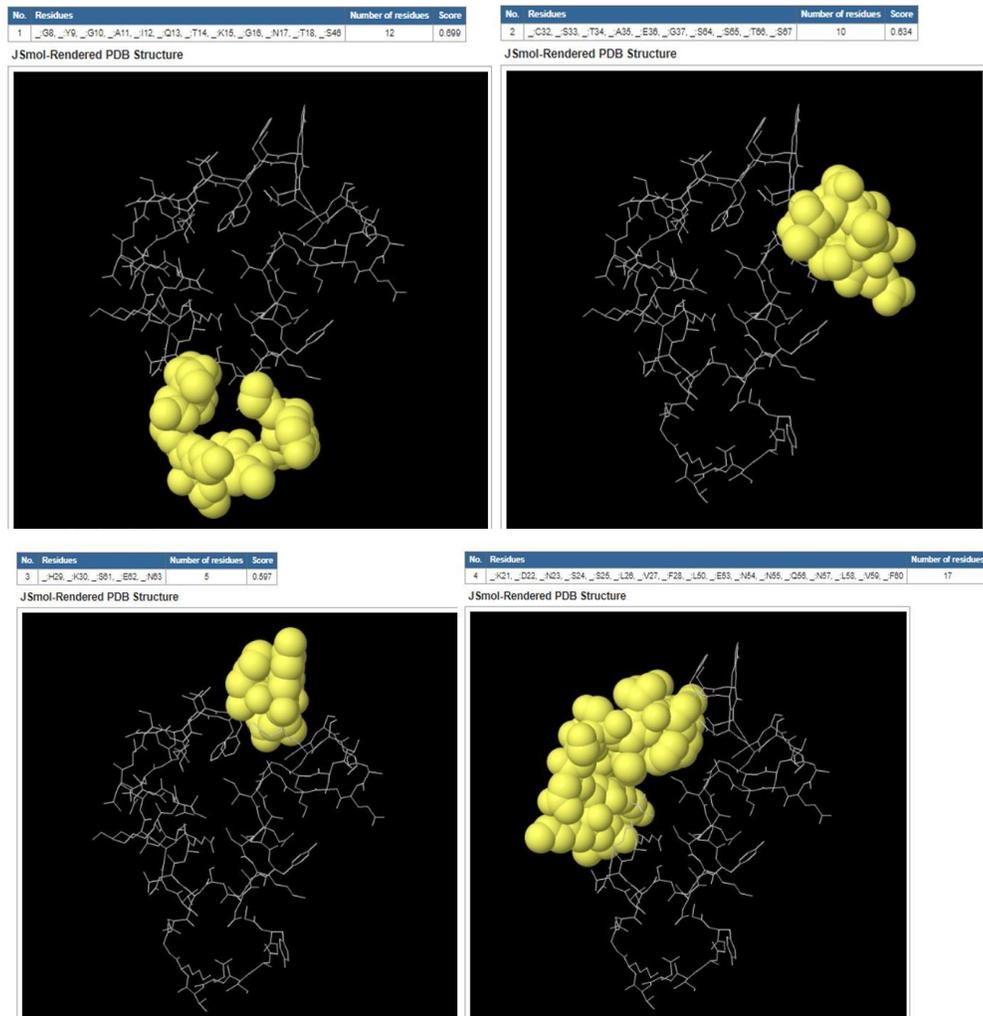


Figura 19. Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rOMP90-3 de *C. abortus*. Representación gráfica de cómo se estructuran teóricamente los epítomos discontinuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de ésta.

7.7.2. Identificación de epítomos inmunogénicos fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*

Con un total de 62 residuos que conforman la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-4, la secuencia conservada al 100% predijo un epítopo de 12 aminoácidos (**Cuadro 12**).

Cuadro 12. Epítopo, secuencias de aminoácidos (residuos) predicho en el fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*.

No.	Inicio	Fin	Epítopo	No. residuos
1	25	36	NNSVSNNGSSPKG	12

“BepiPred 2.0” evaluó cada residuo de la secuencia proteínica; el cual, determinó un resultado similar al predicho por “*Immune Epitope Database*”; con la diferencia de que este programa excluyó un aminoácido al inicio del epítopo predicho en comparación al primero (**Figura 20**).

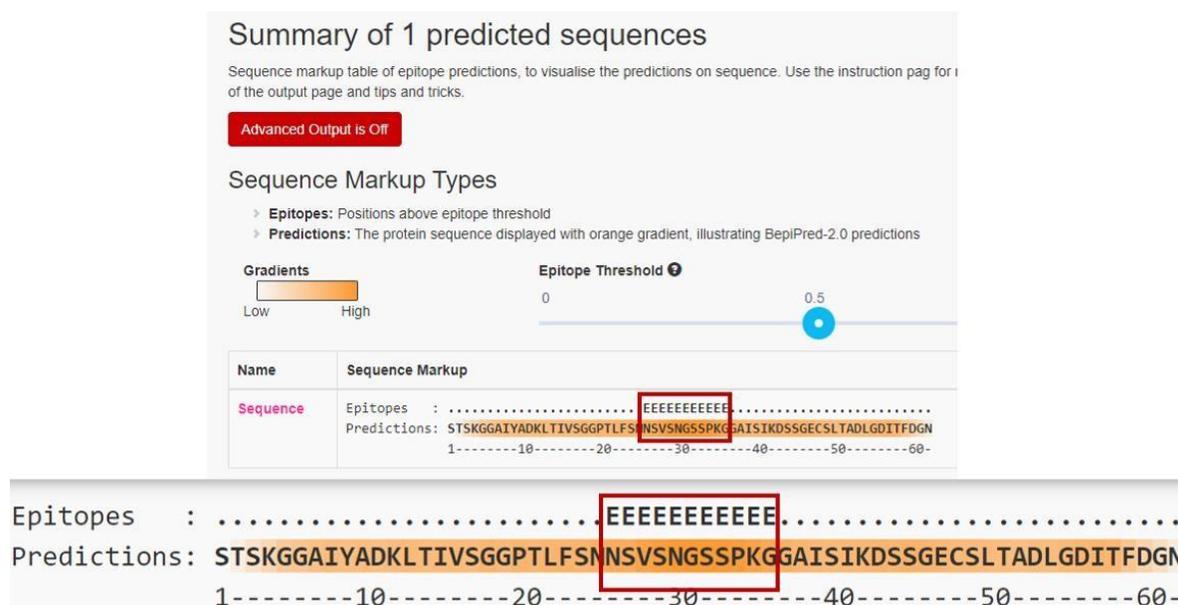


Figura 20. Epítomos predichos (11 Epítomos) por el programa “*BepiPred 2.0*” en la secuencia correspondiente al fragmento **rOMP90-4** (enmarcado en rojo).

De igual forma, realizamos la predicción de **epítomos discontinuos** y estructuras 3D de dicho fragmento (**Cuadro 13**).

Cuadro 13. Tres epítomos discontinuos predichos en el fragmento rOMP90-4 de tamaños variables específicos de *Chlamydia abortus*.

No.	Epítomos	No. residuos
1	_:V16, _:S17, _:G18, _:G19, _:D53, _:L54, _:G55, _:D56	8
2	_:N25, _:N26, _:S27, _:V28, _:S29, _:N30, _:G31, _:S32, _:S33, _:P34, _:K35, _:G36	12
3	_:S40, _:K42, _:D43, _:S44, _:S45, _:G46, _:E47	7

Además, las estructuras tridimensionales de los **epítomos discontinuos** demuestran que éstos se encuentran expuestos en la superficie de la estructura de todo el **fragmento rOMP90-4 (Figura 21)**.

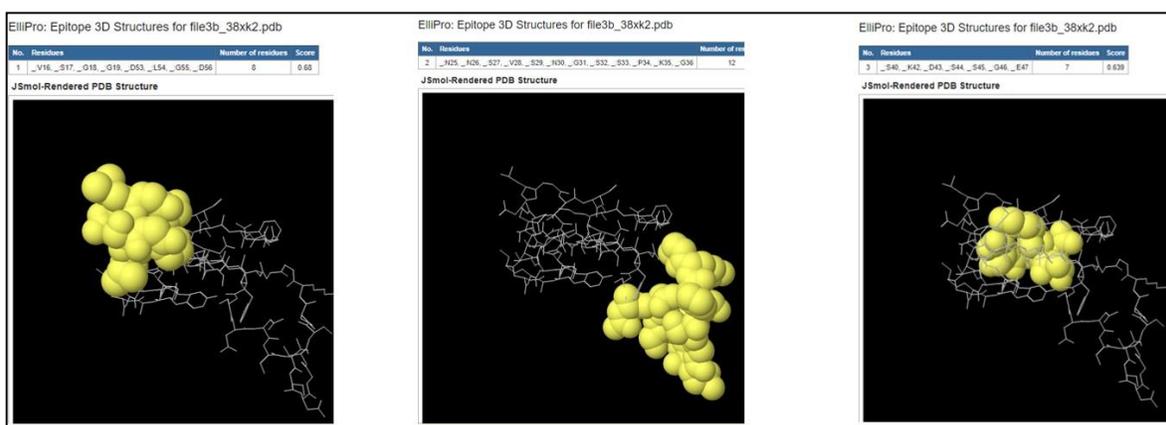


Figura 21. Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*. Representación gráfica de cómo se estructuran teóricamente los epítomos discontinuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de esta.

VIII. DISCUSIÓN

El aborto enzoótico ovino (AEO) ha sido por mucho tiempo una enfermedad de impacto considerable en salud animal, provocando pérdidas económicas en la producción ganadera, especialmente en pequeños rumiantes (Essig y Longbottom, 2015). Actualmente *C. abortus* es considerado el patógeno más común en casos de abortos infecto-contagiosos en ovinos y caprinos a nivel mundial (Tibary, 2021); además, representa un riesgo potencial zoonótico ocupacional para mujeres embarazadas que están en contacto con animales infectados, provocando diversas patologías (Yousef Mohamad y Rodolakis, 2010; Rodolakis y Laroucau, 2015), sumando a que las hembras rara vez muestran signos clínicos y en las no gestantes implica una infección subclínica latente; lo cual, dificulta el diagnóstico (Entrican *et al.*, 2012b; Wattedgedera *et al.*, 2020).

Determinar la presencia de este patógeno en un rebaño que presenta abortos, requiere la detección rápida del agente para una oportuna y eficaz implementación de medidas de control y prevención para evitar la diseminación del agente en individuos susceptibles (Rodolakis y Mohamad, 2010; Fayez *et al.*, 2021). Los métodos más empleados para el diagnóstico del AEO son los moleculares (Sachse *et al.*, 2009; Nordentoft *et al.*, 2011) dirigidos a la región ARNr 16S-23S o los genes *Pmp* (Turin *et al.*, 2022) o PCR RFLP, para identificar diferentes especies de *Chlamydia* (Barati *et al.*, 2017). Estas metodologías son complejas, costosas y por ende solo se pueden aplicar a un cierto número de muestras representativas del rebaño y debe ser realizado por personal altamente capacitado y en laboratorios especializados (Nordentoft *et al.*, 2011). Por ello, los métodos más prácticos, eficientes y de menor impacto económico para el diagnóstico de animales infectados son los destinados a la identificación de anticuerpos; tales como, las pruebas de ELISA y CFT (Longbottom *et al.*, 2002).

Proteínas inmunoreactivas como potenciales candidatos para el desarrollo de pruebas de diagnóstico contra *Chlamydia abortus*.

La elección de los fragmentos del gen que codifica para las *Pmp*'s en el presente trabajo, se fundamenta de acuerdo a diversos estudios que determinaron que los genes que codifican estas proteínas varían en número dependiendo de la especie de *Chlamydia* implicada; es decir, *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* emplean ocho genes, *C. caviae* diecisiete y *C. abortus* dieciocho (Vasilevsky *et al.*, 2016), esta característica particular de las proteínas polimórficas puede ser lo que las podría hacerlas más específicas para la detección de una especie en particular, en nuestro caso para *C. abortus* y por ello se tomó la decisión de seleccionarla para la predicción de epítopes *in silico*. Es importante mencionar que no se empleó la secuencia completa de la proteína, nos enfocamos en dos fragmentos con características importantes seleccionadas de un total de doce, evaluadas en un trabajo previo. Los fragmentos POMP90-3 y POMP90-4 de la Pmp17G (POMP90) de *C. abortus* (Longbottom *et al.*, 2002).

Análisis de secuencias de los fragmentos POMP90-3 y POMP90-4 de *Chlamydia abortus*.

Después de analizar las secuencias de ambos fragmentos con el software MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021) y posteriormente la alineación de las mismas, se presentó un caso interesante con respecto a lo pronosticado. La secuencia del fragmento rOMP90-3 tuvo una variación en cuanto a las secuencias de las cepas de referencia, la ausencia de una timina (T) en la posición #58 de dicha secuencia con respecto a las cepas de referencia. Por lo que se realizó nuevamente el proceso de clonación y secuenciación como lo marca la metodología previamente descrita (Green y Sambrook, 2012); sin embargo, se obtuvo el mismo resultado. Para confirmar dicho resultado, se secuenció el producto directamente de la reacción de PCR, si esta secuencia tuviera dicho “*gap*”, la secuencia del fragmento rOMP90-4 se vería afectada directamente ya que son secuencias continuas al igual que los marcos de lectura de ambas secuencias (Longbottom *et al.*, 2002). La secuencia del fragmento rOMP90-4 está completamente conservada con respecto a las depositadas en el

NCBI con porcentajes de identidad del 100%. Finalmente, después de realizar la secuenciación del producto de PCR se logró verificar que la secuencia no tiene ninguna modificación y este caso puede atribuirse a algún error metodológico durante el proceso de clonación.

Posteriormente, se logró verificar que las secuencias están completamente conservadas, específicamente con la cepa de referencia de *Chlamydia abortus* S26/3 (Longbottom *et al.*, 2002). La alineación de las secuencias de aminoácidos muestra este mismo comportamiento; por lo cual, pudo comprobarse que los epítomos predichos en nuestras secuencias son iguales a los determinados de manera teórica (Jespersen *et al.*, 2017; Vita *et al.*, 2019). Con la finalidad de hacer una comparación más amplia para determinar qué tan específicas son estas secuencias en la especie *C. abortus*, se realizó una evaluación de nuestras secuencias con blastn (nucleótidos) con secuencias de las especies *C. psittaci*, *C. pecorum* y *C. suis*, que como se mencionó anteriormente, son especies del género *Chlamydia* que afectan a los pequeños rumiantes (Rodolakis y Laroucau, 2015).

Para el fragmento rOMP90-3 la alineación con secuencias de estas especies demostró: para *C. psittaci* porcentajes de identidad que varían entre 34.78% - 88.16%, tomando como referencia la cepa de *C. psittaci* 6BC (AEB55310.1) con un porcentaje de identidad del 38.03%. *C. pecorum* (32% - 60%), la cepa de referencia de *C. pecorum* W73 (AGW38701.1) con 39.22% de identidad. Por último *C. suis* con valores de identidad entre 33.85% - 41.03%, la cepa de referencia de *C. suis* M56 (WP_035407908.1) con un porcentaje de identidad del 38.71%.

El fragmento rOMP90-4 mostró que los porcentajes de identidad son bajos. *C. psittaci* demostró porcentajes variables (41.82% - 93.55%); sin embargo, tomando como referencia la cepa de *C. psittaci* 6BC (ADZ18942.1), específicamente la Pmp de esta especie determinó un porcentaje de identidad del 67.74%. *C. pecorum* (36.90% - 61.29%), la cepa de referencia de *C. pecorum* W73 (AGW38701.1) con 55% de identidad. Por último *C. suis* con valores de identidad entre 39.66% y 54.24%, la cepa de referencia de *C. suis* M56 (WP_035407892.1) con un porcentaje de identidad del 54.24%. Este contraste realizado a partir de las secuencias

obtenidas en el presente estudio demuestra los porcentajes ampliamente inferiores a los determinados en la alineación con la cepa de referencia de *C. abortus* S26/3 con el 100% de identidad. Con esto se evidenciamos que los fragmentos evaluados en este estudio son específicos para *C. abortus*; además, confirma los resultados de estudios realizados en 2001 (Longbottom *et al.*, 2001) y 2002 (Longbottom *et al.*, 2002). Adicionalmente, estas secuencias serán las primeras de su tipo en ser reportadas al GenBank a partir de un aislado obtenido en México, esto representa un aporte considerable para trabajos futuros.

Determinación de epítopes inmunogénicos *in silico*

La capacidad de predecir epítomos solo a partir de secuencias de antígenos es una tarea compleja y a pesar del esfuerzo sustancial por innovar y actualizar los algoritmos matemáticos en los cuales se basan estos programas, se ha logrado un avance limitado durante la última década en la precisión de los métodos de predicción de epítomos, especialmente para aquellos que se basan únicamente en la secuencia del antígeno (Jespersen *et al.*, 2017). El presente trabajo realizó la clonación y transformación celular de un aislado obtenido en rebaños en el Estado de México; por lo que fue necesario saber si contábamos con un aislado genéticamente similar o diferente a los que se encuentra depositados en la base de datos de secuencias genéticas; este análisis se realizó con el aislado S26/3 de *C. abortus* debido a que es el que se ha empleado para la identificación de doce fragmentos en un estudio realizado anteriormente (Longbottom *et al.*, 2002).

Aunque en la mayoría de los casos este tipo de herramientas se han empleado para el desarrollo de vacunas recombinantes (Soria-Guerra *et al.*, 2015); en el presente estudio y otros realizados anteriormente, se ha demostrado que estos también pueden emplearse para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico, debido a la naturaleza de las mismas; por lo cual, es posible emplearlas para dicho fin como ya se ha llevado a cabo en el caso de *C. suis* (De Puyseleyn *et al.*, 2018) y en el presente estudio.

Cabe mencionar que a pesar de que el empleo de estas herramientas tiene muchas ventajas y optimizan los tiempos de trabajo en el laboratorio, es importante recalcar que; al igual que para el desarrollo de vacunas recombinantes, todas las herramientas bioinformáticas disponibles actualmente proporcionan una lista completa de epítomos para diseñar pruebas de serodiagnóstico; sin embargo, esta solo es la etapa inicial del proceso ya que, una vez predichos los epítomos en la secuencia diana, debemos evaluar cuales péptidos serán los más adecuados para las subsecuentes evaluaciones. Actualmente esto sigue siendo un desafío, debido a que aún nos debemos enfrentar al tedioso y lento proceso de validación (Soria-Guerra *et al.*, 2015) y el cotejo con pruebas acreditadas como óptimas para el diagnóstico del AEO por la WOA (WOAH, 2018), con la finalidad de establecer juicios bien fundamentados del porque son buenas o rechazar su efectividad en el diagnóstico específico.

De acuerdo a estudios realizados anteriormente, demuestran que este método es más rápido y eficiente que los empleados de manera habitual y ha contribuido dentro del desarrollo del presente trabajo de investigación optimizando los tiempos, evitando el proceso de producción de los fragmentos recombinantes; ya que, una vez identificados los péptidos específicos dentro de las secuencias de ambos fragmentos, existen empresas dentro del ramo que se dedican a la síntesis de los mismos para que puedan emplearse de forma prácticamente inmediata una vez sintetizados.

Las secuencias conservadas en su totalidad en las secuencias de nucleótidos y las de aminoácidos de ambos fragmentos, se procedió a realizar el mapeo de ambas secuencias; se determinó para el fragmento rOMP90-3 un total de 9 epítomos y para el fragmento rOMP90-4 un solo epítomo de un tamaño de 12 residuos. Un estudio que desarrolló una ELISA recombinante empleó el mapeo de la secuencia completa de la proteína PmpC (2140 aa) de *C. suis* y detectó un total de 9 epítomos de diferentes tamaños, detectado al final un residuo de 9 aa óptimo para el diagnóstico específico de este patógeno; ya que, la ELISA rPmpC detectó todos los sueros de control positivo y contrastó con CFT y contó con un 100% de especificidad contra

C. suis. Es importante resaltar estos resultados porque las secuencias completas de epítopes predichos por los programas pueden ser o no óptimos en su totalidad como se observó en dicho estudio (De Puyseleir *et al.*, 2018) y esto se verá reflejado hasta que se pueda realizar la evaluación y validación de los epítopes predichos en el presente estudio. Hay que considerar que en cuanto al fragmento rOMP90-3 se mostraron diferencias en cuanto a la predicción de los epítopes con ambos programas, siendo solamente 2 de los 9 predichos iguales para los dos programas, por lo cual debemos de ser prudentes al momento de elegir con cual se decidiría trabajar en el futuro (Jespersen *et al.*, 2017) .

El mapeo de secuencias de proteínas enfocado en la proteína de la membrana externa PorB de *C. trachomatis* para el desarrollo de una vacuna contra este patógeno que afecta al humano; determinó, características fisicoquímicas, la estructura secundaria, 3D y la predicción del sitio funcional (epítopes inmunogénicos) (Pourhajibagher y Bahador, 2016). Por esto, se destaca el empleo reciente de este tipo de modelos *in silico* para la predicción de epítopes que pudieran servir para el desarrollo de diferentes pruebas o inmunógenos contra las bacterias de este género y lo más importante es puedan ser lo suficientemente sensibles y específicas para un diagnóstico adecuado y preciso, en sentido concreto de *C. abortus* poder diferenciar esta entre otras dos especies que afectan a los pequeños rumiantes como: *C. pecorum* y *C. psittaci* (Walker *et al.*, 2015) que ya han sido reportadas como agentes causales de abortos (Osman *et al.*, 2011; Rodolakis y Laroucau, 2015).

Determinación de estructuras conformacionales 3D

Además de servir para la predicción y mapeo de secuencias de proteínas, también se puede determinar la estructura conformacional de las proteínas y observar de manera teórica la ubicación del epítopo de interés (Jespersen *et al.*, 2017). El presente estudio mostró una representación gráfica de las estructuras conformacionales 3D (epítopes discontinuos) de cada uno de los epítopes predichos por este programa (Vita *et al.*, 2019), existen dos tipos de epítopes, lineales y discontinuos. Al no ser 100% lineales debemos darnos una idea de la ubicación de

estos epítopes y si en realidad se encuentran expuestos en la estructura 3D (Vita *et al.*, 2019); ya que, las proteínas están en su forma natural en esta conformación y con la ayuda de estos programas, tenemos la posibilidad de predecir estas estructuras a partir de secuencias lineales (Ansari y Raghava, 2010; Jespersen *et al.*, 2017); además, la predicción discontinua de epítopes de células B requiere una estructura 3D del antígeno (Soria-Guerra *et al.*, 2015).

IX. CONCLUSIONES

- La proteína de la membrana polimórfica es una alternativa viable para el desarrollo de pruebas serológicas específicas contra *C. abortus*.
- La predicción *in silico* de epítomos inmunogénicos optimiza tiempos y costos de inversión para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico.
- Se lograron identificar diferentes epítomos inmunogénicos en las secuencias de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4.
- Los epítomos inmunogénicos de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4 resultaron ser específicos para la especie *C. abortus*.
- Las estructura conformacionales de los epítomos predichos demuestran su exposición en la superficie lo que hace posible su reconocimiento por los anticuerpos contra las mismas.

X. SUGERENCIAS

- Sintetizar los epítomos predichos en el presente estudio.
- Realizar la evaluación y validación de estos epítomos para identificar cual o cuales son los óptimos para el desarrollo de una prueba de ELISA contra *C. abortus*.
- Inducir la expresión de los fragmentos recombinantes para su evaluación y comparación con los epítomos sintéticos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Ansari, H. R., & Raghava, G. P. (2010). Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immunome research*, 6, 1-9.
2. Arif, E. D., Saeed, N. M., & Rachid, S. K. (2020). Isolation and Identification of *Chlamydia abortus* from Aborted Ewes in Sulaimani Province, Northern Iraq. *Polish journal of microbiology*, 69(1), 1–7.
3. Barimani, M., Mosallanejad, B., Ghorbanpoor, M., & Esmaeilzadeh, S. (2019). Molecular Detection of *Chlamydia felis* in Cats in Ahvaz, Iran. *Archives of Razi Institute*, 74(2), 119–126.
4. Bas, S., Neff, L., Vuillet, M., Spenato, U., Seya, T., Matsumoto, M., & Gabay, C. (2008). The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(2), 1158–1168.
5. Bastidas, R. J., Elwell, C. A., Engel, J. N., & Valdivia, R. H. (2013). Chlamydial intracellular survival strategies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3(5), a010256.
6. Beeckman, D. S., & Vanrompay, D. C. (2010). Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system. *Current issues in molecular biology*, 12(1), 17–41.
7. Beeckman, D. S., De Puysseleyr, L., De Puysseleyr, K., & Vanrompay, D. (2014). Chlamydial biology and its associated virulence blockers. *Critical reviews in microbiology*, 40(4), 313–328.
8. Benaissa, M. H., Mimoune, N., Youngs, C. R., Kaidi, R., & Faye, B. (2020). First report of *Chlamydophila abortus* infection in the dromedary camel (*Camelus dromedarius*) population in eastern Algeria. *Comparative immunology, microbiology, and infectious diseases*, 73, 101557.
9. Berri, M., Rekiki, A., Boumedine, K. S., & Rodolakis, A. (2009). Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and

- Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC microbiology*, 9, 130.
10. Bommana, S., & Polkinghorne, A. (2019). Mini Review: Antimicrobial Control of Chlamydial Infections in Animals: Current Practices and Issues. *Frontiers in microbiology*, 10, 113.
 11. Bommana, S., Jelocnik, M., Borel, N., Marsh, I., Carver, S., & Polkinghorne, A. (2019). The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock. *Journal of medical microbiology*, 68(4), 627–632.
 12. Borel, N., Polkinghorne, A., & Pospischil, A. (2018). A Review on Chlamydial Diseases in Animals: Still a Challenge for Pathologists? *Veterinary pathology*, 55(3), 374–390.
 13. Burall, L. S., Rodolakis, A., Rekiki, A., Myers, G. S., & Bavoil, P. M. (2009). Genomic analysis of an attenuated *Chlamydia abortus* live vaccine strain reveals defects in central metabolism and surface proteins. *Infection and immunity*, 77(9), 4161–4167.
 14. Cadario, M. E., Frutos, M. C., Arias, M. B., Origlia, J. A., Zelaya, V., Madariaga, M. J., Lara, C. S., Ré, V., & Cuffini, C. G. (2017). Epidemiological and molecular characteristics of *Chlamydia psittaci* from 8 human cases of psittacosis and 4 related birds in Argentina. *Revista Argentina de microbiologia*, 49(4), 323–327.
 15. Campbell, L. A., & Kuo, C. C. (2004). *Chlamydia pneumoniae* - An infectious risk factor for atherosclerosis? *Nature reviews. Microbiology*, 2(1), 23–32.
 16. Campos-Hernández, E., Vázquez-Chagoyán, J. C., Salem, A. Z., Saltijeral-Oaxaca, J. A., Escalante-Ochoa, C., López-Heydeck, S. M., & de Oca-Jiménez, R. M. (2014). Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical animal health and production*, 46(6), 919–924.
 17. Čechová, L., Halánová, M., Babinská, I., Danišová, O., Bartkovský, M., Marcinčák, S., Marcinčáková, D., Valenčáková, A., & Čisláková, L. (2018). Chlamydiosis in farmed chickens in Slovakia and zoonotic risk for

- humans. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*, 25(2), 320–325.
18. Cheong, H. C., Lee, C., Cheok, Y. Y., Tan, G., Looi, C. Y., & Wong, W. F. (2019). *Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. Microorganisms*, 7(5), 146.
19. Cocchiaro, J. L., & Valdivia, R. H. (2009). New insights into *Chlamydia* intracellular survival mechanisms. *Cellular microbiology*, 11(11), 1571–1578.
20. Condon, K., & Oakey, J. (2007). Detection of *Chlamydiaceae* DNA in veterinary specimens using a family-specific PCR. *Letters in applied microbiology*, 45(2), 121–127.
21. De Jesus-Aldama, F. (2019). Aislamiento e Identificación Molecular de *Chlamydia abortus* en Ovinos del Estado De México [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de México. Repositorio institucional – Universidad Autónoma del Estado de México.
22. De Puyseleyn, K., Kieckens, E., De Puyseleyn, L., Van den Wyngaert, H., Ahmed, B., Van Lent, S., Creasy, H. H., Myers, G., & Vanrompay, D. (2018). Development of a *Chlamydia suis*-specific antibody enzyme-linked immunosorbent assay based on the use of a B-cell epitope of the polymorphic membrane protein C. *Transboundary and emerging diseases*, 65(2), e457–e469.
23. Dean, D., Rothschild, J., Ruettinger, A., Kandel, R. P., & Sachse, K. (2013). Zoonotic *Chlamydiaceae* species associated with trachoma, Nepal. *Emerging infectious diseases*, 19(12), 1948–1955.
24. Di Paolo, L. A., Alvarado Pinedo, M. F., Origlia, J., Fernández, G., Uzal, F. A., & Travería, G. E. (2019). First report of caprine abortions due to *Chlamydia abortus* in Argentina. *Veterinary medicine and science*, 5(2), 162–167.
25. Diario Oficial de la Federación (DOF) (29/11/2018). Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018#gsc.tab=0

26. Dickinson, M. S., Anderson, L. N., Webb-Robertson, B. M., Hansen, J. R., Smith, R. D., Wright, A. T., & Hybiske, K. (2019). Proximity-dependent proteomics of the *Chlamydia trachomatis* inclusion membrane reveals functional interactions with endoplasmic reticulum exit sites. *PLoS pathogens*, *15*(4), e1007698.
27. Djellata, N., Yahimi, A., Hanzen, C., Saegerman, C., & Kaidi, R. (2019). Prévalences et facteurs associés à un risque augmenté ou diminué d'exposition à *Coxiella burnetii*, *Chlamydia abortus* et *Toxoplasma gondii* chez la vache laitière ayant avorté en Algérie. *Revue scientifique et technique*, *38*(3), pp. 761–786.
28. Elwell, C., Mirrashidi, K., & Engel, J. (2016). *Chlamydia* cell biology and pathogenesis. *Nature reviews. Microbiology*, *14*(6), 385–400.
29. Entrican, G., Wheelhouse, N., Wattegedera, S. R., & Longbottom, D. (2012). New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, *35*(3), 271–276.
30. Escalante-Ochoa, C., Díaz-Aparicio, E., Segundo-Zaragoza, C., & Suárez-Güemes, F. (1997). Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico : first report. *Revista latino americana de microbiología*, *39*(3-4), 117–121.
31. Escalante-Ochoa, C., Rivera-Flores, A., Trigo-Tavera, F., & Romero-Martínez, J. (1996). Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep, through cell culture isolation. *Revista latinoamericana de microbiología*, *38*(1), 17–23.
32. Esmaeili, H., Hamed, M., & Madani, S. A. (2017). Isolation of *Chlamydia* spp. from Ewes and Does in Iran. *Archives of Razi Institute*, *72*(4), 249–253.
33. Essig, A., Longbottom, D. *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Current Clinical Microbiology Reports volume*, 22–34 (2015).
34. Fayez, M., Elmoslemany, A., Alorabi, M., Alkafafy, M., Qasim, I., Al-Marri, T., & Elsohaby, I. (2021). Seroprevalence and Risk Factors Associated with *Chlamydia abortus* Infection in Sheep and Goats in Eastern Saudi Arabia. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *10*(4), 489.

35. Forsbach-Birk, V., Foddiss, C., Simnacher, U., Wilkat, M., Longbottom, D., Walder, G., Benesch, C., Ganter, M., Sachse, K., & Essig, A. 2013. Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *PloS one*, 8(11), e80310.
36. Fossádal, M. E., Grand, M., & Gaini, S. (2018). *Chlamydophila psittaci* pneumonia associated to exposure to fulmar birds (*Fulmaris glacialis*) in the Faroe Islands. *Infectious diseases (London, England)*, 50(11-12), 817–821.
37. Francis M. J. (2018). Recent Advances in Vaccine Technologies. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 48(2), 231–241.
38. García-Seco, T., Pérez-Sancho, M., Salinas, J., Navarro, A., Díez-Guerrier, A., García, N., Pozo, P., Goyache, J., Domínguez, L., & Álvarez, J. (2016). Effect of Preventive *Chlamydia abortus* Vaccination in Offspring Development in Sheep Challenged Experimentally. *Frontiers in veterinary science*, 3, 67.
39. Green, M., & Sambrook, J. (2012). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 4 ed. In Cold Spring Harbor Laboratory Press.
40. Hagemann, J. B., Simnacher, U., Longbottom, D., Livingstone, M., Maile, J., Soutschek, E., Walder, G., Boden, K., Sachse, K., & Essig, A. (2016). Analysis of Humoral Immune Responses to Surface and Virulence-Associated *Chlamydia abortus* Proteins in Ovine and Human Abortions by Use of a Newly Developed Line Immunoassay. *Journal of clinical microbiology*, 54(7), 1883–1890.
41. Hartley, J. C., Kaye, S., Stevenson, S., Bennett, J., & Ridgway, G. (2001). PCR detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. *Journal of clinical microbiology*, 39(9), 3072–3079.
42. Hasanzadeh Haghighi, F., Aryan, E., Gholoobi, A., Zare, H., & Meshkat, Z. (2019). Design and Construction of a Eukaryotic Cloning Vector Encoding the mpt51 Gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 8(1), 32–35.
43. Hoelzle, L. E., Hoelzle, K., & Wittenbrink, M. M. (2004). Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. *Veterinary microbiology*, 103(1-2), 85–90.

44. Hu, S. F., Li, F., Zheng, W. B., & Liu, G. H. (2018). Seroprevalence and Risk Factors of *Chlamydia abortus* Infection in Goats in Hunan Province, Subtropical China. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 18(9), 500–503.
45. Hybiske, K., & Stephens, R. S. (2007). Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium *Chlamydia*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(27), 11430–11435.
46. Illingworth, M., Hooppaw, A. J., Ruan, L., Fisher, D. J., & Chen, L. (2017). Biochemical and Genetic Analysis of the *Chlamydia* GroEL Chaperonins. *Journal of bacteriology*, 199(12), e00844-16.
47. Imkamp, F., Albin, S., Karbach, M., Kimmich, N., Spinelli, C., Herren, S., Sprecher, R., Meier, K., & Borel, N. (2022). Zoonotic *Chlamydiae* as rare causes of severe pneumonia. *Swiss medical weekly*, 152, w30102.
48. Iramain, R., De Jesús, R., Spitters, C., Jara, A., Jimenez, J., Bogado, N., & Cardozo, L. (2016). *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae*: Are they related to severe asthma in childhood? *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma*, 53(6), 618–621.
49. Jelocnik, M., Laurence, M., Murdoch, F. R., & Polkinghorne, A. (2019). Detection of *Chlamydiaceae* in ocular swabs from Australian pre-export feedlot sheep. *Australian veterinary journal*, 97(10), 401–403.
50. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. (2017). BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*, 45(W1), W24–W29.
51. Jiménez-Estrada, J. M., Escobedo-Guerra, M. R., Arteaga-Troncoso, G., López-Hurtado, M., De Haro-Cruz, M. D. J., Jiménez, R. M. D. O., & Guerra-Infante, F. M. (2008). Detection of *Chlamydia abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 3(4), 91-95.
52. Johnson, F. W., Matheson, B. A., Williams, H., Laing, A. G., Jandial, V., Davidson-Lamb, R., Halliday, G. J., Hobson, D., Wong, S. Y., & Hadley, K. M. (1985). Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife. *British medical journal (Clinical research ed.)*, 290(6468), 592–594.

53. Kelly, E. E., Horgan, C. P., & McCaffrey, M. W. (2012). Rab11 proteins in health and disease. *Biochemical Society transactions*, 40(6), 1360–1367.
54. Kelly, E. E., Horgan, C. P., Goud, B., & McCaffrey, M. W. (2012). The Rab family of proteins: 25 years on. *Biochemical Society transactions*, 40(6), 1337–1347.
55. Kostylev, M., Otwell, A. E., Richardson, R. E., & Suzuki, Y. (2015). Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PloS one*, 10(9), e0137466.
56. Kuo, C.-C., Stephens, R. S., Bavoil, P. M., & Kaltenboeck, B. (2011). Genus I. *Chlamydia* Jones, Rake and Stearns 1945, 55. In N. R. Kreig, J. T. Staley, D. R. Brown, B. P. Hedlund, B. J. Paster, N. L. Ward, ... W. B. Whitman (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (2nd ed., pp. 846–865).
57. Lagae, S., Kalmar, I., Laroucau, K., Vorimore, F., & Vanrompay, D. (2014). Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *Journal of medical microbiology*, 63(Pt 3), 399–407.
58. Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Menard, M. F., Longbottom, D., & Denis, G. (2018). Abortion storm induced by the live *Chlamydia abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild-type infection. *Veterinary microbiology*, 225, 31–33.
59. Laroucau, K., Ortega, N., Vorimore, F., Aaziz, R., Mitura, A., Szymanska-Czerwinska, M., Cicerol, M., Salinas, J., Sachse, K., & Caro, M. R. (2020). Detection of a novel *Chlamydia* species in captive spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) in southeastern Spain and proposal of *Candidatus Chlamydiatetestudinis*. *Systematic and applied microbiology*, 43(2), 126071.
60. Laroucau, K., Vorimore, F., Aaziz, R., Solmonson, L., Hsia, R. C., Bavoil, P. M., Fach, P., Hölzer, M., Wuenschmann, A., & Sachse, K. (2019). *Chlamydia buteonis*, a new *Chlamydia* species isolated from a red-shouldered hawk. *Systematic and applied microbiology*, 42(5), 125997.
61. Li, Z., Liu, P., Cao, X., Lou, Z., Zaręba-Marchewka, K., Szymańska-Czerwińska, M., Niemczuk, K., Hu, B., Bai, X., & Zhou, J. (2018). First Report of *Chlamydia abortus* in Farmed Fur Animals. *BioMed research international*, 2018, 4289648.

62. Ling, Y., Li, S., Yang, J., Yuan, J., & He, C. (2011). Co-administration of the polysaccharide of *Lycium barbarum* with DNA vaccine of *Chlamydomphila abortus* augments protection. *Immunological investigations*, 40(1), 1–13.
63. Ling, Y., Liu, W., Clark, J. R., March, J. B., Yang, J., & He, C. (2011). Protection of mice against *Chlamydomphila abortus* infection with a bacteriophage-mediated DNA vaccine expressing the major outer membrane protein. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3-4), 389–395.
64. Liu, M., Wen, Y., Ding, H., & Zeng, H. (2022). Septic shock with *Chlamydia abortus* infection. *The Lancet. Infectious diseases*, 22(6), 912.
65. Livingstone, M., Wattegedera, S. R., Palarea-Albaladejo, J., Aitchison, K., Corbett, C., Sait, M., Wilson, K., Chianini, F., Rocchi, M. S., Wheelhouse, N., Entrican, G., & Longbottom, D. (2021). Efficacy of Two *Chlamydia abortus* Subcellular Vaccines in a Pregnant Ewe Challenge Model for Ovine Enzootic Abortion. *Vaccines*, 9(8), 898.
66. Longbottom, D., & Coulter, L. J. (2003). Animal Chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of comparative pathology*, 128(4), 217–244.
67. Longbottom, D., Entrican, G., Wheelhouse, N., Brough, H., & Milne, C. (2013). Evaluation of the impact and control of enzootic abortion of ewes. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 195(2), 257–259.
68. Longbottom, D., Fairley, S., Chapman, S., Psarrou, E., Vretou, E., & Livingstone, M. (2002). Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydomphila abortus*. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4235–4243.
69. Longbottom, D., Livingstone, M., Maley, S., van der Zon, A., Rocchi, M., Wilson, K., Wheelhouse, N., Dagleish, M., Aitchison, K., Wattegedera, S., Nath, M., Entrican, G., & Buxton, D. (2013). Intranasal infection with *Chlamydia abortus* induces dose-dependent latency and abortion in sheep. *PloS one*, 8(2), e57950.
70. Longbottom, D., Psarrou, E., Livingstone, M., & Vretou, E. (2001). Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein

- POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS microbiology letters*, 195(2), 157–161.
71. Longbottom, D., Sait, M., Livingstone, M., Laroucau, K., Sachse, K., Harris, S. R., Thomson, N. R., & Seth-Smith, H. (2018). Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine*, 36(25), 3593–3598.
 72. Madico, G., Quinn, T. C., Boman, J., & Gaydos, C. A. (2000). Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *Journal of clinical microbiology*, 38(3), 1085–1093.
 73. Marsilio, F., Di Martino, B., Di Francesco, C. E., & Meridiani, I. (2005). Diagnosis of ovine chlamydial abortions by PCR-RFLP performed on vaginal swabs. *Veterinary research communications*, 29 Suppl 1, 99–106.
 74. Mireles, M.A.B. & Salazar-García, Félix & Rosas, P.F. & Oca-Jiménez, Roberto. (2013). Detection of serologic antibodies against *Chlamydophila abortus* in two groups of people exposed to risk in ovine farms in Xalatlaco, Mexico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 16. 483-486.
 75. Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Zając, M., Laroucau, K., & Szymańska-Czerwińska, M. (2017). Free-living and captive turtles and tortoises as carriers of new *Chlamydia* spp. *PloS one*, 12(9), e0185407.
 76. Moise, L., Gutiérrez, A. H., Khan, S., Tan, S., Ardito, M., Martin, W. D., & De Groot, A. S. (2020). New Immunoinformatics Tools for Swine: Designing Epitope-Driven Vaccines, Predicting Vaccine Efficacy, and Making Vaccines on Demand. *Frontiers in immunology*, 11, 563362.
 77. Mojica, S. A., Hovis, K. M., Frieman, M. B., Tran, B., Hsia, R. C., Ravel, J., Jenkins-Houk, C., Wilson, K. L., & Bavoil, P. M. (2015). SINC, a type III secreted protein of *Chlamydia psittaci*, targets the inner nuclear membrane of infected cells and uninfected neighbors. *Molecular biology of the cell*, 26(10), 1918–1934.
 78. Montbrau, C., Fontseca, M., March, R., Sitja, M., Benavides, J., Ortega, N., Caro, M. R., & Salinas, J. (2020). Evaluation of the Efficacy of a New Commercially

- Available Inactivated Vaccine Against Ovine Enzootic Abortion. *Frontiers in veterinary science*, 7, 593.
79. Mora Diaz, J. C., Díaz Aparicio, E., Herrera López, E., Suarez Güemes, F., Escalante Ochoa, C., Jaimes Villareal, S., & Arellano Reynoso, B. (2015). Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Veterinaria Mexico*, 2(1), 11.
 80. Myers, G. S., Mathews, S. A., Eppinger, M., Mitchell, C., O'Brien, K. K., White, O. R., Benahmed, F., Brunham, R. C., Read, T. D., Ravel, J., Bavoil, P. M., & Timms, P. (2009). Evidence that human *Chlamydia pneumoniae* was zoonotically acquired. *Journal of bacteriology*, 191(23), 7225–7233.
 81. Nabi, H., Rashid, I., Ahmad, N., Durrani, A., Akbar, H., Islam, S., Bajwa, A. A., Shehzad, W., Ashraf, K., & Imran, N. (2017). Induction of specific humoral immune response in mice immunized with ROP18 nanospheres from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology research*, 116(1), 359–370.
 82. Nordentoft, S., Kabell, S., & Pedersen, K. (2011). Real-time detection and identification of *Chlamydophila* species in veterinary specimens by using SYBR green-based PCR assays. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6323–6330.
 83. Nunes, A., & Gomes, J. P. (2014). Evolution, phylogeny, and molecular epidemiology of *Chlamydia*. *Infection, genetics, and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 23, 49–64.
 84. O'Neill, L. M., Keane, O. M., Ross, P. J., Nally, J. E., Seshu, J., & Markey, B. (2019). Evaluation of protective and immune responses following vaccination with recombinant MIP and CPAF from *Chlamydia abortus* as novel vaccines for enzootic abortion of ewes. *Vaccine*, 37(36), 5428–5438.
 85. O'Neill, L. M., O'Driscoll, Á., & Markey, B. (2018). Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish veterinary journal*, 71, 13.

86. Organization International de Epizooties. (2018). In: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. World Organization for Animal Health. Chapter 3.7.5. Enzootic abortion of ewes (*ovine chlamydiosis*). 59, 1456–1465.
87. Ortega, N., Caro, M. R., Gallego, M. C., Murcia-Belmonte, A., Álvarez, D., Del Río, L., Cuello, F., Buendía, A. J., & Salinas, J. (2016). Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Irish veterinary journal*, 69, 8.
88. Osman, K. M., Ali, H. A., ElJakee, J. A., & Galal, H. M. (2011). *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 30(3), 939–948.
89. Osman, K. M., Ali, H. A., Eljakee, J. A., Gaafar, M. M., & Galal, H. M. (2012). Antimicrobial susceptibility and molecular typing of multiple *Chlamydiaceae* species isolated from genital infection of women in Egypt. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 18(4), 440–445.
90. Pan, Q., Pais, R., Ohandjo, A., He, C., He, Q., Omosun, Y., Igietseme, J. U., & Eko, F. O. (2015). Comparative evaluation of the protective efficacy of two formulations of a recombinant *Chlamydia abortus* subunit candidate vaccine in a mouse model. *Vaccine*, 33(15), 1865–1872.
91. Pan, Q., Zhang, Q., Chu, J., Pais, R., Liu, S., He, C., & Eko, F. O. (2017). *Chlamydia abortus* Pmp18.1 Induces IL-1 β Secretion by TLR4 Activation through the MyD88, NF- κ B, and Caspase-1 Signaling Pathways. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 514.
92. Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., & Sachse, K. (2010). Detection of all *Chlamydophila* and *Chlamydia* spp. of veterinary interest using species-specific real-time PCR assays. *Comparative immunology, microbiology, and infectious diseases*, 33(6), 473–484.
93. Peters, J., Wilson, D. P., Myers, G., Timms, P., & Bavoil, P. M. (2007). Type III secretion à la *Chlamydia*. *Trends in microbiology*, 15(6), 241–251.

94. Phillips, S., Quigley, B. L., & Timms, P. (2019). Seventy Years of *Chlamydia* Vaccine Research - Limitations of the Past and Directions for the Future. *Frontiers in microbiology*, 10, 70.
95. Pospischil, A., Thoma, R., Hilbe, M., Grest, P., & Gebbers, J. O. (2002). Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss medical weekly*, 132(5-6), 64–66.
96. Pourhajibagher, M., & Bahador, A. 2016. Designing and in Silico Analysis of PorB Protein from *Chlamydia Trachomatis* for Developing a Vaccine Candidate. *Drug research*, 66(9), 479–483.
97. Prusty, B. K., Chowdhury, S. R., Gulve, N., & Rudel, T. (2018). Peptidase Inhibitor 15 (PI15) Regulates Chlamydial CPAF Activity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 183.
98. Rahnema, M., & Fields, K. A. (2018). Transformation of *Chlamydia*: current approaches and impact on our understanding of chlamydial infection biology. *Microbes and infection*, 20(7-8), 445–450.
99. Ramakers, B. P., Heijne, M., Lie, N., Le, T. N., van Vliet, M., Claessen, V., Tolsma, P., De Rosa, M., Roest, H., Vanrompay, D., Heddema, E. R., Schneeberger, P., & Hermans, M. (2017). Zoonotic *Chlamydia caviae* Presenting as Community-Acquired Pneumonia. *The New England journal of medicine*, 377(10), 992–994.
100. Rank, R. G., & Yeruva, L. (2014). Hidden in plain sight: chlamydial gastrointestinal infection and its relevance to persistence in human genital infection. *Infection and immunity*, 82(4), 1362–1371.
101. Rodolakis, A., & Laroucau, K. (2015). *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary microbiology*, 181(1-2), 107–118.
102. Rodolakis, A., & Yousef Mohamad, K. (2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary microbiology*, 140(3-4), 382–391.
103. Rojas, M., Fort, M., Bettermann, S., Entrocassi, C., Costamagna, S. R., Sachse, K., & Rodríguez Fermepin, M. (2018). Detección de *Chlamydia abortus* en pérdidas reproductivas de bovinos en la provincia de La Pampa, Argentina [Detection of *Chlamydia abortus* in bovine reproductive losses in the province of La Pampa, Argentina]. *Revista Argentina de microbiología*, 50(3), 269–274.

104. Roulis, E., Polkinghorne, A., & Timms, P. (2013). *Chlamydia pneumoniae*: modern insights into an ancient pathogen. *Trends in microbiology*, 21(3), 120–128.
105. Rubio-Navarrete, I., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Acosta-Dibarrat, J., Monroy-Salazar, H.G., Morales-Erasto, V., Fernández-Rosas, P. and Odongo, E.N., 2017. Prevalence of *Chlamydia abortus* Antibodies in Horses from the Northern State of Mexico and Its Relationship with Domestic Animals. *Journal of equine veterinary science*, 56, 110-113.
106. Sachse, K., & Laroucau, K. (2015). Two more species of *Chlamydia*-does it make a difference? *Pathogens and disease*, 73(1), 1–3.
107. Sachse, K., Bavoil, P. M., Kaltenboeck, B., Stephens, R. S., Kuo, C. C., Rosselló-Móra, R., & Horn, M. (2015). Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Systematic and applied microbiology*, 38(2), 99–103.
108. Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H. H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Ruetzger, A., Bavoil, P. M., Hufert, F. T., Rosselló-Móra, R., & Marz, M. (2014). Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 37(2), 79–88.
109. Sachse, K., Vretou, E., Livingstone, M., Borel, N., Pospischil, A., & Longbottom, D. (2009). Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Veterinary microbiology*, 135(1-2), 2–21.
110. Sánchez-Rocha, L., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Palomares-Resendiz, G., Barradas-Piña, Francisco, & Díaz-Aparicio, E. (2021). Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras con historial de abortos en México. *Abanico veterinario*, 11, e118.
111. Santoro, M., Iaccarino, D., Di Nocera, F., Degli Uberti, B., Lucibelli, M. G., Borriello, G., De Luca, G., D'Amore, M., Cerrone, A., & Galiero, G. (2019). Molecular detection of *Chlamydia abortus* in a stranded Mediterranean striped dolphin *Stenella coeruleoalba*. *Diseases of aquatic organisms*, 132(3), 203–208.

112. Selim, A., Manaa, E. A., Waheed, R. M., & Alanazi, A. D. (2021). Seroprevalence, associated risk factors analysis and first molecular characterization of chlamydia abortus among Egyptian sheep. *Comparative immunology, microbiology, and infectious diseases*, 74, 101600.
113. Shaw, K. A., Szablewski, C. M., Kellner, S., Kornegay, L., Bair, P., Brennan, S., Kunkes, A., Davis, M., McGovern, O. L., Winchell, J., Kobayashi, M., Burton, N., de Perio, M. A., Gabel, J., Drenzek, C., Murphy, J., Holsinger, C., & Forlano, L. (2019). Psittacosis Outbreak among Workers at Chicken Slaughter Plants, Virginia and Georgia, USA, 2018. *Emerging infectious diseases*, 25(11), 2143–2145.
114. Shima, K., Wanker, M., Skilton, R. J., Cutcliffe, L. T., Schnee, C., Kohl, T. A., Niemann, S., Geijo, J., Klinger, M., Timms, P., Rattei, T., Sachse, K., Clarke, I. N., & Rupp, J. (2018). The Genetic Transformation of *Chlamydia pneumoniae*. *mSphere*, 3(5), e00412-18.
115. Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., & Rosales-Mendoza, S. (2015). An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *Journal of biomedical informatics*, 53, 405–414.
116. Soriano-Vargas, E., Jiménez-Estrada, J.M., Salgado-Miranda, S., López-Hurtado, M., Escobedo-Guerra, M.R. y Guerra-Infante, F.M., 2011. Identificación de *Chlamydophila abortus* en un aborto ovino en Almoloya de Juárez, México. *Revista electrónica de veterinaria*, 12(11), 1-6.
117. Spičić, S., Račić Ivana, Andrijanić, M., Duvnjak, S., Zdelar-Tuk, M., Stepanić, M., & Cvetnić, Z. (2015). Emerging cases of chlamydial abortion in sheep and goats in Croatia and Bosnia and Herzegovina. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*, 128(5-6), 183–187.
118. Staub, E., Marti, H., Biondi, R., Levi, A., Donati, M., Leonard, C. A., Ley, S. D., Pillonel, T., Greub, G., Seth-Smith, H., & Borel, N. (2018). Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature-sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. *Scientific reports*, 8(1), 5660.

119. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022–3027.
120. Tang, L., Chen, J., Zhou, Z., Yu, P., Yang, Z., & Zhong, G. (2015). Chlamydia-secreted protease CPAF degrades host antimicrobial peptides. *Microbes and infection*, *17*(6), 402–408.
121. Taylor-Brown, A., Bachmann, N. L., Borel, N., & Polkinghorne, A. (2016). Culture-independent genomic characterisation of Candidatus *Chlamydia sanzinia*, a novel uncultivated bacterium infecting snake. *BMC genomics*, *17*(1), 710.
122. Taylor-Brown, A., Spang, L., Borel, N., & Polkinghorne, A. (2017). Culture-independent metagenomics supports discovery of uncultivable bacteria within the genus *Chlamydia*. *Scientific reports*, *7*(1), 10661.
123. Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2015). Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *Pathogens and disease*, *73*(1), 1–15.
124. Tejedor-Junco, M. T., González-Martín, M., Corbera, J. A., Santana, Á., Hernández, C. N., & Gutiérrez, C. (2019). Preliminary evidence of the seroprevalence and risk factors associated with *Chlamydia abortus* infection in goats on the Canary Islands, Spain. *Tropical animal health and production*, *51*(1), 257–260.
125. Tibary, A., 2021. Abortion in Cattle - Reproductive System - *MSD Veterinary Manual*. URL <https://www.msdsvetmanual.com/reproductive-system/abortion-in-large-animals/abortion-in-sheep> (accessed 6.20.22).
126. Tolba, H., Abou Elez, R., & Elsohaby, I. (2019). Risk factors associated with *Chlamydia psittaci* infections in psittacine birds and bird handlers. *Journal of applied microbiology*, *126*(2), 402–410.
127. Turin, L., Surini, S., Wheelhouse, N., & Rocchi, M. S. (2022). Recent advances and public health implications for environmental exposure to *Chlamydia abortus*: from enzootic to zoonotic disease. *Veterinary research*, *53*(1), 37.

128. van Grootveld, R., Bilsen, M. P., Boelsums, T. L., Heddema, E. R., Groeneveld, G. H., Gooskens, J., & de Boer, M. (2018). *Chlamydia caviae* Causing Community-Acquired Pneumonia: An Emerging Zoonosis. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 18(11), 635–637.
129. Vasilevsky, S., Stojanov, M., Greub, G., & Baud, D. (2016). Chlamydial polymorphic membrane proteins: regulation, function, and potential vaccine candidates. *Virulence*, 7(1), 11–22.
130. Vita, R., Mahajan, S., Overton, J. A., Dhanda, S. K., Martini, S., Cantrell, J. R., Wheeler, D. K., Sette, A., & Peters, B. (2019). The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic acids research*, 47(D1), D339–D343.
131. Vorimore, F., Cavanna, N., Vicari, N., Magnino, S., Willems, H., Rodolakis, A., Siarkou, V. I., & Laroucau, K. (2012). High-resolution melt PCR analysis for rapid identification of *Chlamydia abortus* live vaccine strain 1B among *C. abortus* strains and field isolates. *Journal of microbiological methods*, 90(3), 241–244.
132. Vorimore, F., Hsia, R. C., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., Sachse, K., Bavoil, P., Myers, G., & Laroucau, K. (2013). Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PloS one*, 8(9), e74823.
133. Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Würzner, R., & Ploner, F. (2005). An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydophila abortus*. *Obstetrics and gynecology*, 106(5 Pt 2), 1215–1217.
134. Walder, G., Meusburger, H., Hotzel, H., Oehme, A., Neunteufel, W., Dierich, M. P., & Würzner, R. (2003). *Chlamydophila abortus* pelvic inflammatory disease. *Emerging infectious diseases*, 9(12), 1642–1644.
135. Walker, E., Lee, E. J., Timms, P., & Polkinghorne, A. (2015). Chlamydiaepecorum infections in sheep and cattle: A common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 206(3), 252–260.
136. Wattegedera, S. R., Livingstone, M., Maley, S., Rocchi, M., Lee, S., Pang, Y., Wheelhouse, N. M., Aitchison, K., Palarea-Albaladejo, J., Buxton, D.,

- Longbottom, D., & Entrican, G. (2020). Defining immune correlates during latent and active chlamydial infection in sheep. *Veterinary research*, 51(1), 75.
137. Weber, M. M., Lam, J. L., Dooley, C. A., Noriega, N. F., Hansen, B. T., Hoyt, F. H., Carmody, A. B., Sturdevant, G. L., & Hackstadt, T. (2017). Absence of Specific *Chlamydia trachomatis* Inclusion Membrane Proteins Triggers Premature Inclusion Membrane Lysis and Host Cell Death. *Cell reports*, 19(7), 1406–1417.
138. Weinmaier, T., Hoser, J., Eck, S., Kaufhold, I., Shima, K., Strom, T. M., Rattei, T., & Rupp, J. (2015). Genomic factors related to tissue tropism in *Chlamydia pneumoniae* infection. *BMC genomics*, 16(1), 268.
139. Wheelhouse, N. M., Sait, M., Aitchison, K., Livingstone, M., Wright, F., McLean, K., Inglis, N. F., Smith, D. G., & Longbottom, D. (2012). Processing of *Chlamydia abortus* polymorphic membrane protein 18D during the chlamydial developmental cycle. *PloS one*, 7(11), e49190.
140. Wheelhouse, N., & Longbottom, D. (2012). Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transboundary and emerging diseases*, 59(4), 283–291.
141. Wilson, K., Livingstone, M., & Longbottom, D. (2009). Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydia abortus* infection in sheep. *Veterinary microbiology*, 135(1-2), 38–45.
142. Wons, J., Meiller, R., Bergua, A., Bogdan, C., & Geißdörfer, W. (2017). Follicular Conjunctivitis due to *Chlamydia felis*-Case Report, Review of the Literature, and Improved Molecular Diagnostics. *Frontiers in medicine*, 4, 105.
143. World Organization for animal Health (WOAH) (2018). – Manual terrestre: Chapter 3.7.5. - Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis) 59, 1456–1465. Disponible en: https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/enfermedades-animales/?_alphabet=C (fecha de consulta: 20 de abril de 2020).
144. Yin, D., Bai, Q., Wu, X., Li, H., Shao, J., Sun, M., Jiang, H., & Zhang, J. (2021). Paper-based ELISA diagnosis technology for human brucellosis based on a multiepitope fusion protein. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(8), e0009695.

145. Zhu, C., Lv, M., Huang, J., Zhang, C., Xie, L., Gao, T., Han, B., Wang, W., & Feng, G. (2022). Bloodstream infection and pneumonia caused by *Chlamydia abortus* infection in China: a case report. *BMC infectious diseases*, 22(1), 181.

XII. ANEXOS

12.1 Protocolo de purificación de ADN a partir de Gel de agarosa

(Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System)

Consideraciones generales

La agarosa es un polímero lineal extraído de algas; el cual, se usa comúnmente para la separación electroforética de ácidos nucleicos. La agarosa estándar se funde a una temperatura entre **87-89°C** y **solidifica a 36-39°C**. En la agarosa de bajo punto de fusión, se han introducido grupos hidroxidoetilo en la cadena de polisacárido, lo que da como resultado una agarosa que se funde y solidifica a temperaturas mucho más bajas (**65°C** y **24-28°C, respectivamente**), esta se emplea para aplicaciones que requieren la recuperación de fragmentos de ADN intactos del gel después de la electroforesis. El **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System** se puede utilizar para recuperar AND de geles de **agarosa estándar o de bajo punto de fusión** sin cambios en el protocolo ni diferencias en la recuperación.

Se debe **utilizar equipo de seguridad estándar**, especialmente al manipular geles teñidos con bromuro de etidio. Esto incluye **guantes y protector facial que bloquee los rayos UV para proteger los ojos y la cara de la luz ultravioleta**. Al extirpar la banda del gel, trabaje rápidamente para minimizar la exposición personal a la luz UV y minimizar el corte del ADN.

El **Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System** es compatible con los productos de PCR generados utilizando variedad de enzimas de amplificación, tampones o aditivos que mejoran la PCR, el aceite mineral no interfiere con la purificación.

Preparación de los cortes y productos de PCR

Materiales que debe suministrar el usuario.

- Tubos de microcentrífuga de 1.5 mL

- Etanol (95%)
- Gel de agarosa
- Tampón de electroforesis 1X TAE o TBE
- Placa de calentamiento

Disolver el fragmento de agarosa

1. Cargue y procese el gel utilizando un protocolo establecido. El ADN se puede extraer de geles de agarosa estándar o de bajo punto de fusión procesados con tampón TAE o TBE.

2. Pese un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL **por cada fragmento de ADN a aislar y registre el peso.**

3. Visualice y fotografíe el ADN utilizando una lámpara de UV de longitud de onda larga y un tinte intercalante como el bromuro de etidio. Para reducir las mellas, irradie el gel el **mínimo tiempo posible**. Extraiga el fragmentos de ADN de interés en un **volumen mínimo de agarosa** con un bisturí limpio o un ahoja de afeitar. Transfiera el trozo de gel al tubo de microcentrífuga pesado, pese nuevamente y registre el peso. **Reste el peso del tubo vacío del peso total** para obtener el peso del trozo de gel.

NOTA: El trozo de gel puede almacenarse entre 4°a -20°C hasta una semana en un tubo bien cerrado en condiciones libres de nucleasas antes de la purificación.

4. Agregue la solución de **unión a la membrana** en una proporción de **10 µL de solución por cada 10 mg de trozo de gel** de agarosa.

5. Agite la mezcla por vortexeo e **incube a 50-65°C durante 10 min.** O hasta que la rodaja de gel este **completamente disuelta**. Agite el tubo en **vortex** periódicamente para **aumentar la velocidad de fusión** del gel de agarosa. Centrifugue el tubo brevemente a temperatura ambiente para asegurarse de que el contenido este en fondo de este. Una vez que se derrita, el trozo de gel no volverá a solidificarse a temperatura ambiente.

Notas:

1. La recuperación a partir de agarosa de punto de fusión alto al 1% es comparable a la de agarosa de punto de fusión bajo al 1-2%. Se han probado concentraciones de agarosa de alto punto de fusión de hasta el 3%. Las rodajas de gel con concentraciones de agarosa más altas (2-3%) pueden requerir más tiempo para derretirse por completo que una rodaja de gel de agarosa al 1% y pueden mostrar rendimientos reducidos.

2. La capacidad máxima de la columna es de 350 mg de masa de gel disuelta en 350 µl de solución de unión a membrana por pasada de columna. Para rodajas de gel > 350 mg, continúe pasando la muestra adicional a través de la minicolumna SV hasta que se haya procesado toda la muestra. La cantidad máxima de agarosa que se puede procesar a través de una sola columna es de aproximadamente 3,5 g (10 × 350 mg) en total.

3. La capacidad máxima de unión de la columna es de aproximadamente 40 µg por columna y se han purificado con éxito tan solo 10 ng.

4. Los fragmentos de ADN de más de 5 kb deben mezclarse suavemente para evitar el cizallamiento. No agite en el vórtex si el fragmento de ADN es mayor de 5 kb; mezclar por inversión.

Purificación de ADN

Utilice el procedimiento de centrifugación para recuperar el ADN de el trozo de gel disuelto. Una vez completado el procedimiento, el ADN se puede utilizar en aplicaciones posteriores.

Purificación de ADN por centrifugación

1. Coloque una **minicolumna SV** en un tubo de recolección por cada trozo de gel disuelto.

2. Transfiera la mezcal del gel disuelto preparado al **conjunto de minicolumna SV** e **incube por 1 min.** A temperatura ambiente.

3. Centrifugue el conjunto minicolumna SV a **16,000 x g (14,000 rpm)** durante **1 min.** Retire la minicolumna SV del conjunto de la columna de centrifugado y **deseche** el líquido del tubo de recolección. Vuelva a colocar la minicolumna SV en el tubo de recolección.

NOTA: No centrifugar a 16,000 x g (14,000 rpm) puede reducir el rendimiento.

4. Lavar la columna agregando **700 µL** de **Solución de Lavado de Membrana**, previamente diluida con etanol al 95%, a la minicolumna SV. Centrifugue el conjunto de minicolumna SV a **16,000 x g (14,000 rpm)** por **1 min.** Deseche el contenido del tubo de recolección y vuelva a colocar la minicolumna SV. **Repita el lavado** con **500 µL** de **Solución de Lavado de Membrana** y centrifugue el conjunto de minicolumna SV a **16,000 x g (14,000 rpm)** por **5 min.**

5. Retire el conjunto minicolumna SV de la centrifuga **teniendo cuidado de no mojar** el fondo de la columna con el flujo centrifugado. Deseche el contenido del tubo de recolección y vuelva a centrifugar el conjunto de la columna a **16,000 x g (14,000 rpm)** por **1 min.** **Para evaporar el etanol residual.**

6. Transfiera con cuidado la minicolumna SV a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 mL. Añadir **50 µL** de agua libre de nucleasas **directamente en el centro de la columna sin tocar la membrana** con la punta de la pipeta. Incubar a **temperatura ambiente** por **1 min.** Centrifugar a **16,000 x g (14,000 rpm)** por **1 min.**

7. Deseche la minicolumna SV y **almacene el tubo de microcentrífuga que contiene el ADN eluido** a **4°C o -20°C.**

NOTA: El volumen de ADN eluido será de **aproximadamente 42 a 47 µl.** Si el ADN necesita concentrarse más, realice una precipitación con etanol. Alternativamente, el ADN **puede eluirse en tan solo 15 µL** de agua libre de nucleasas sin una reducción significativa del rendimiento. Si usa un volumen de elución de 15 µl,

verifique que la membrana esté completamente cubierta con agua libre de nucleasas antes de la centrifugación. **No se recomiendan volúmenes de elución inferiores a 15 µl.**

12.2 Protocolo de ligación vector pGEM®-T Easy

El vector pGEM®-T Easy es un vector linealizado con una sola timidina 3'-terminal en ambos extremos. Los salientes en T en el sitio de inserción mejoran en gran medida la eficacia de la ligadura de los productos de PCR al evitar la recircularización del vector y proporcionar un saliente compatible para los productos de PCR generados por ciertas polimerasas termoestables.

El vector pGEM®-T Easy es un vector de alto número de copias que contienen promotores de ARN polimerasa T7 y SP6 que flanquean una región de clonación múltiple dentro de la región codificante del péptido α de la enzima β -galactosidasa. La inactivación por inserción del péptido α permite la identificación derecombinantes mediante la detección azul/blanca en placas indicadoras.

El vector pGEM®-T Easy contienen numerosos sitios de restricción dentro de la región de clonación múltiple. La región de clonación múltiple de pGEM®-T Easy está flanqueada por sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI, BstZI y NotI, lo que proporciona tres digestiones con una sola enzima para la liberación del inserto. La región de clonación del vector pGEM®-T está flanqueada por sitios de reconocimiento para la enzima BstZI. Alternativamente, se puede usar una doble digestión para liberar el inserto de cualquiera de los vectores.

Ligadura rápida: El sistema pGEM®-T Easy Vector se suministran con 2X Rapid Ligation Buffer. Las reacciones de ligación que utilizan este tampón pueden incubarse durante 1 hora a temperatura ambiente. El período de incubación puede extenderse para aumentar el número de colonias después de la transformación. Generalmente, una incubación durante la noche a 4°C produce el número máximo de transformantes.

El protocolo de reacción para la ligación de los genes de interés en el vector de clonación se conforma de la siguiente manera:

Componentes	Reacción estándar
2X Rapid Ligation Buffer	5 µL
pGEM®-T Easy Vector (50ng)	1 µL
AND diana	1-5 µL
T4 DNA Ligase	1 µL
Agua libre de nucleasas hasta un volumen final de	10 µL

NOTA: Los tiempos de incubación más largos aumentarán el número de transformantes. Generalmente, la incubación durante la noche a 4 °C producirá el número máximo de transformantes.

12.3 Protocolo De Purificación De Plásmidos

HIGH-SPEED PLASMID MINI KIT

El mini kit de plásmido de alta velocidad se diseñó para un aislamiento rápido de **ADN plasmídico de 1-5 ml de cultivo de células bacterianas**. Una lisis modifica el método de lisis alcalina y el tratamiento con ARNasa se utilizan para obtener un lisado de células claras con un mínimo de contaminantes de ADN y ARN genómicos. En presencia de sal caotrópica, el ADN plasmídico del lisado se une a la matriz de fibra de vidrio de la columna de hilado. Los contaminantes se eliminan con tampón de lavado (que contiene etanol) y el ADN plasmídico purificado se eluye mediante un tampón de elución o TE con bajo contenido de sal. Los **rendimientos** típicos son de **20 a 30 µg** para el plásmido de alto número de copias o de **3 a 10 µg** para el plásmido de bajo número de copias a partir de **4 ml de células bacterianas** en cultivo. **El ADN plasmídico se puede purificar en 15 minutos** sin extracción de

ADN con fenol o precipitación con alcohol. El ADN plasmídico purificado está entonces listo para su uso en reacciones de digestión enzimática, ligación, PCR y secuenciación.

Protocolo del kit de plásmidos I-Blue Midi

Importante antes de usar el kit

1. Para IB47101 e IB47102, agregue la ARNasa A proporcionada al tampón PD1 y luego mezcle agitando durante unos segundos. Marque la casilla de la botella. Almacene la mezcla a 2-8 ° C por hasta 6 meses.
2. Para las muestras de IB47100, ya se agregó ARNasa a a PD1.
3. Si se han formado precipitados en el PD2 BUffer, calentar en un baño de agua a 37 ° C, seguido de agitación suave para disolver.
4. Añada etanol absoluto (consulte el volumen en la etiqueta del frasco) al tampón de lavado antes del uso inicial.

Recolección: Transfiera **1.5 mL de células bacterianas cultivadas** a un tubo de microcentrífuga, centrifugue a **14-16,000 x g** durante **1 minuto** y luego deseche el sobrenadante, si usa más de 1.5 mL de células bacterianas en cultivo, **repita** el paso de recolección.

Paso 1. Re-suspensión: Agregue **200 µL de tampón PD1** (asegúrese de que se haya agregado la ARNasa a) al tubo, re-suspenda el sedimento de células mediante **vortexeo o pipeteo**.

Paso 2. Lisis: Agregue **200 µL de tampón PD2** (asegúrese de que se disuelvan los precipitados) y **mezcle suavemente invirtiendo el tubo 10 veces**.

NOTA: No agite en vórtex para evitar cortar el ADN genómico.

Deje reposar a temperatura ambiente durante al menos 2 minutos (no exceda los 5 minutos).

NOTA: Esto asegurará que el lisado sea homogéneo.

Paso 3. Neutralización: Agregue **300 µL de Tampón PD3** y mezcle inmediatamente invirtiendo el tubo **10 veces**.

NOTA: No agite en vórtex para evitar cortar el ADN genómico.

Paso 4. Unión de ADN: Centrifugar a **14-16.000 xg durante 3 minutos**, colocar una columna de DP en un tubo de recogida de 2 ml, **añadir el sobrenadante del paso 3** y centrifugar a **14-16.000 xg durante 30 segundos**, desechar el flujo continuo y vuelva a colocar la columna de DP en el tubo de recogida de 2 mL.

Paso 5. Lavado: Opcional para secuenciación, agregue **400 µL de Buffer W1** en la Columna PD y centrifugue a **14-16,000 xg durante 30 segundos**, luego deseche el flujo y coloque la Columna PD nuevamente en el tubo de recolección de 2 mL, **proceda con Adición de tampón de lavado**.

Agregue **600 µL de Buffer de lavado** (asegúrese de agregar etanol) en la columna PD, luego centrifugue **14-16,000 xg durante 30 segundos**, deseche el flujo continuo y coloque la columna PD nuevamente en el tubo de recolección de 2 mL, centrifugue a **14-16,000 xg durante 3 minutos para secar la matriz de la columna** y **colocar la columna PD en un nuevo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml**.

Paso 6. Elución de ADN: si se requiere una **concentración de ADN más alta**, use **30 µL de tampón de elución**, si se requiere un **rendimiento máximo de ADN**, use **100 µL de tampón de elución** (la concentración de ADN se diluirá).

Añada **50 µL de tampón de elución o TE** en el **centro de la columna PD**, deje reposar durante al menos **2 minutos para permitir que el tampón de elución o TE se absorba por completo**, centrifugue a **14-16.000 xg durante 2 minutos** para eluir el ADN purificado. .

NOTA: Realizar un segundo paso de elución aumentará el rendimiento entre un 10 y un 30%

Transfiera el flujo de **regreso al centro en la matriz de la columna PD** y centrifugue a **14-16,000 x g durante 2 minutos** para eluir el ADN purificado.

Solución de problemas

Bajo rendimiento

Las células bacterianas no se lisaron completamente.

- Si se utilizan más de 10 unidades de DO de cultivo bacteriano, diluya en varios tubos.
- Después de la adición del tampón PD2, invierta el tubo 10 veces y luego déjelo reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos para asegurarse de que las muestras se lisan por completo.

Paso de elución de ADN incorrecto.

- Asegúrese de que se añada tampón de elución en el centro de la matriz de la columna de DP y se absorba por completo.

Elución incompleta de ADN.

- Si el ADN del plásmido tiene un tamaño superior a 10 kb, utilice tampón de elución precalentado (60-70 ° C) en el paso de elución.

12.4 Preparación de Medio Luria-Bertani

El medio que se emplea para el proceso para la transformación de la línea celular, clonación y producción de transformantes es el medio selectivo Luria-Bertani (LB) el cual se suplementa con **5-Bromo-4-Cloro-3-Indol- β -D-Galactopiranosido (X-gal o BCIG)**, **Isopropil β -D-1-Tiogalactopiranosido (IPTG)** y **ampicilina**.

Para la preparación de los suplementos en las concentraciones requeridas, pesar las siguientes cantidades.

Componente	Cantidad	Volumen	Concentración
X-Gal*	200 mg	10 mL de dimetilformamida	40 µg/mL
IPTG	238 mg	10 mL de agua	96 µg/mL
Ampicilina	1000 mg	10 mL de agua	100 µg/mL

NOTA: El IPTG y Ampicilina se preparan con agua destilada estéril y deben filtrarse por membrana de 0,22 µm.

***Fotosensible, evitar exponerlo directamente a la luz ya que se degradan los componentes.**

Para preparar el medio LB se requieren los siguientes reactivos en las cantidades correspondientes en el cuadro

Componente	Volumen 1000 mL	Volumen 500 mL	Concentración
Triptona	10 g	5 g	-
Extracto de levadura	5 g	2.5 g	-
NaCl	5 g	2.5 g	-
X-Gal	1000 µL	500 µL	40 µg/mL
IPTG	500 µL	250 µL	96 µg/mL
Ampicilina	1000 µL	500 µL	100 µg/mL

Para preparar placas de agar LB se adiciona agar-agar o base agar

Componente	Volumen 1000 mL	Volumen 500 mL	Concentración
Triptona	10 g	5 g	-
Extracto de levadura	5 g	2.5 g	-

NaCl	5 g	2.5 g	-
Agar-agar	15 g	7.5 g	-
X-Gal	1000 µL	500 µL	40 µg/mL
IPTG	500 µL	250 µL	96 µg/mL
Ampicilina	1000 µL	500 µL	100 µg/mL

12.5 Preparación de complementos

Para el proceso de obtención de cepas bacterianas quimiocompetentes se emplea una solución de CaCl₂ 0.1 M. para la crioconservación de estas y de las células transformadas usar una solución de glicerol (50%) y CaCl₂ (0.1M); la cual se prepara de la siguiente manera:

Componente	Cantidad	Volumen	Concentración
CaCl₂	0.0959 g	50 mL	0.1M
Glicerol	5 mL	5 mL	50%
CaCl₂ + Glicerol 10X	2 mL	300 µL	[1:10]



Ciudad de México a 2 de diciembre de 2020.

Fernando De Jesús Aldama, Jorge Antonio Varela Guerrero, Roberto Montes de Oca Jiménez

ID: 5564

Estimados autores:

Tengo el agrado de comunicar a ustedes que su trabajo titulado: “**Diagnóstico, prevención y control de enfermedades causadas por *Chlamydia* en pequeños rumiantes**” con ID: 5564 ha sido aceptado como revisión bibliográfica por nuestro cuerpo arbitral.

Le sugerimos que estén atentos a nuestros futuros comunicados para informarles sobre los avances del proceso editorial de su trabajo.

ATENTAMENTE

MVZ. Arturo García Fraustro
Editor en Jefe.

INIFAP, CENID-Salud Animal e Inocuidad
Km. 15.5 Carretera México-Toluca
Colonia Palo Alto, Ciudad de México, C.P. 05110
garcia.arturo@inifap.gob.mx



Diagnosis, prevention and control of diseases caused by *Chlamydia* in small ruminants. Review



^a Fernando de Jesús Aldama

^a Roberto Montes de Oca Jiménez

^a Jorge Antonio Varela Guerrero

^a Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Toluca, Estado de México, México.

* Corresponding author: romojimenez@yahoo.com

ABSTRACT

The species that make up the genus *Chlamydia* affect a wide range of animal hosts, causing various pathologies. *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) and *Chlamydia pecorum* (*C. pecorum*) are the most clinically relevant in small ruminants worldwide, since they have been related to reproductive, ocular and digestive tract problems respectively; two of these (*C. abortus* and *C. psittaci*) represent a potential zoonotic risk to humans. The diagnosis of infections by organisms of this genus is complicated; since, in most cases, there are no clinical signs that indicate the presence of the agent in affected animals. Currently, in European countries, the prevention and control mainly of *C. abortus* is carried out through the administration of commercial attenuated immunogens; however, their use has not shown satisfactory results in the protection of susceptible animals. Therefore, the implementation of new immunization options based on the utilization of recombinant proteins is the line of research that is currently taking the most prominence. Additionally, the use of proteins with immunogenic potential could be important tools for the diagnosis, prevention and control of these pathogens. Due to this, the present review focused on recapitulating the most current studies focused on the experimental use of different immunogenic proteins of *Chlamydia* spp. used worldwide, highlighting their innovation and results obtained in experimental models.

Key words: *Chlamydia*, Diagnosis, PCR, Recombinant Proteins, Vaccines.

Received:
28/11/2019

Accepted:
02/12/2020

INTRODUCTION

The bacteria of the genus *Chlamydia* are Gram-negative, obligate intracellular organisms that are characterized by sharing a unique biphasic development cycle, they have two morphological structures called: elementary body (EB), which is the infective form, and the reticulate body (RB), form of the metabolically active bacterium⁽¹⁾. These bacteria cause a wide range of diseases in different animal hosts and man^(1,2). Within the genus, a total of twelve species have been reported⁽³⁾: *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. avium*, *C. gallinacea*, *C. poikilothermis* and four species candidates: *C. ibidis*, *C. serpentis*, *C. corallus* and *C. sanzinia*⁽⁴⁻⁶⁾.

Some of these species tend to affect production animals; in addition, they represent a potential zoonotic risk to humans⁽⁷⁾. The main species of the genus identified in these animal species are *C. abortus*, *C. psittaci* and *C. pecorum*; in addition, the pathologies associated with them have been widely documented^(1,2,8).

The pathologies related to these organisms are diverse, among which the following stand out: abortions, keratoconjunctivitis and problems in the digestive tract^(2,9); however, *C. abortus* is the most important in livestock production, generating greater losses in flocks than due to the presence of *C. psittaci* and *C. pecorum*^(1,2).

Due to the importance for public and animal health that these organisms represent, this review focused on compiling the most recent studies on the development of diagnostic tests, treatment and control of infections caused by these bacterial species, where studies focused on the production of recombinant proteins stand out, which have been the subject of study in recent years.

SPECIES OF THE GENUS *CHLAMYDIA* AFFECTING SMALL RUMINANTS

Chlamydia abortus

Causative agent of Ovine Enzootic Abortion (OEA), a disease that is widely distributed worldwide, which causes economic losses in countries that are engaged in livestock activity. The disease causes abortion in pregnant ewes in the last third of gestation or, in some cases, the birth of weak lambs that do not exceed 48 h of life^(1,2). It is currently considered the most important pathology of chlamydial origin; since it represents a potential occupational zoonotic risk and for pregnant women who are in contact with infected animals⁽²⁾. In this order, different reports have been made in which, in addition to causing abortions, it causes other conditions, such as: febrile illness, development of

disseminated intravascular coagulation, acute renal failure and pulmonary edema⁽¹⁰⁾, septicemia and important lesions in the liver, kidney and heart; it is worth mentioning that these pathologies occurred after the abortion⁽¹¹⁾. It is also described as a causative agent of pelvic inflammatory disease⁽¹²⁾. In Mexico, the prevalence of antibodies against *C. abortus* was reported in exposed risk groups (workers and veterinarians) who were in contact with flocks with a history of abortion⁽¹³⁾. Finally, it has also been reported as a causative agent of pneumonia problems⁽¹⁴⁾, thus demonstrating the zoonotic potential of this bacterial species.

Chlamydia psittaci

Bacterium of avian origin that causes psittacosis in birds and with proven potential zoonotic risk. In the last five years, different studies have been carried out, evidencing the risk that this bacterial species represents for humans, mainly due to contact with infected birds⁽²⁾. In the first instance causing psittacosis, ornithosis⁽²⁾ or atypical pneumonia⁽¹⁵⁾. It has also been reported as a causative agent of genital infections in women⁽¹⁶⁾. It has been identified in patients with respiratory diseases; for example, pneumonia in farmers who worked with infected animals⁽¹⁷⁾. Similarly, it has been linked to pneumonia, pertussis and conjunctivitis⁽¹⁸⁾. Not least, associating the possible risk factors involved in the contagion of psittacosis in people who handle birds^(19,20). Recently, it was reported as a causative agent in an outbreak related to severe respiratory disease among workers of poultry slaughter plants in the USA⁽²¹⁾. There are currently no reports of contagion of *C. psittaci* from mammals to humans.

Chlamydia pecorum

This bacterium lodges naturally in the digestive tract and causes enteritis; in most cases, it occurs subclinically, thus avoiding the timely detection of the disease⁽²²⁾. *C. pecorum* has also been associated with other diseases, among them: arthritis, keratoconjunctivitis, encephalomyelitis, infertility, pneumonia and mastitis, and causing economic losses in production units⁽²²⁾. Despite the wide variety of pathologies with which this bacterial agent has been related, the zoonotic potential of this species of *Chlamydia* is still unknown⁽²³⁾.

TRANSMISSION

It has been widely documented that the way in which these organisms are mostly transmitted is through the oronasal route⁽¹⁾. *C. abortus* is excreted by infected ewes through vaginal fluids or placental remains, which contaminate water or food, the entry to susceptible animals is through the intake of these⁽²⁾.

C. psittaci is usually contained in the feces of birds and small ruminants, therefore, the main route of transmission of this pathogen is through the inhalation of aerosols contaminated by feces, in feeders or outdoor areas⁽⁷⁾.

Transmission of *C. pecorum* is thought to take place by the oral-fecal route or by ingestion or inhalation of bacteria contained in secretions of infected animals. Some studies have suggested transmission because of factors such as mutual grooming, inhalation and overcrowding⁽²²⁾.

DIAGNOSIS

Due to the variety of clinical pictures, animal hosts and since these agents are often diagnosed in combination with other infectious agents, a definitive diagnosis usually requires laboratory tests in most cases⁽²⁴⁾. The diagnosis of diseases of chlamydial origin is complicated and requires complex methodologies that require highly trained personnel to be able to carry out an ideal diagnosis⁽²⁴⁾. To make the diagnosis of *Chlamydia* species, the samples by choice are swabs (vaginal, conjunctival and/or rectal) preserved in a special transport medium for *Chlamydia* spp., sucrose-phosphate-glutamate (SPG)^(24,25); on the other hand, the diagnosis can be made by indirect (ELISA) or direct methods (cell culture and PCR)⁽²⁴⁾.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is an indirect diagnostic test that detects antibodies in serum of affected individuals against specific antigens of bacteria of this genus^(2,24), there are currently commercially available ELISA tests, among the disadvantages of this type of tests are cross-reactions between species (*C. abortus* and *C. pecorum*), which makes specific diagnosis difficult⁽²⁾. The assays that evaluate different antigens for the detection of species of *Chlamydia* spp. have been diverse. First, evaluating fragments of the MOMP through an indirect ELISA test (rOMP91B iELISA), which showed a sensitivity and specificity of 84.2 and 98.5 % respectively; the study showed that the indirect ELISA test was better at differentiating animals infected with *C. abortus* and *C. pecorum*⁽²⁶⁾. Later, another study evaluated different recombinant antigens, all of these were identified from the Polymorphic Outer Membrane Protein or POMP90. Of the 11 fractions identified, OMP90-3 and OMP90-4 were the most effective, showing a sensitivity of 95.7 and 94.3 % respectively and a specificity of 100 % for both. The findings of the study revealed that the ELISA test with the fragment rOMP90-4 was more sensitive than that of rOMP90-3, since it identified more positive samples for OEA and, in addition, both were superior to the complement fixation test (CFT)⁽²⁷⁾. Additionally, and in a complementary way to these studies, a study was carried out in which four experimental ELISA tests based on complete

EB of *C. abortus* (EB), a preparation from the outer membrane of complete bacteria (SolPr) and two recombinant fragments of POMP90 (rOMP90-3 and rOMP90-4), were evaluated against three commercial tests, the CHEKIT1 *Chlamydomphila abortus* test, Pourquier1 ELISA *Chlamydomphila abortus* and ImmunoComb Ovine *Chlamydomphila* Antibody. The results during the test showed that the commercial ELISA test ImmunoComb obtained the highest sensitivity (98.4 %) compared to the others; however, the specificity determined (65.4 %) was lower than all tests evaluated. The results at the end of the study determined that, of the eight ELISA tests evaluated, the test that offers the best results in terms of sensitivity and specificity was the ELISA test based on the recombinant fragment rOMP90-3, with values of 96.8 % and 100 % respectively, this study showed that this experimental ELISA test can be an adequate alternative for the serological diagnosis of OEA⁽²⁸⁾.

A study carried out in 2018 adds to these results, which compared three commercial tests (IDvet, MVD-Enfer and LSI) for the detection of antibodies against *C. abortus* in ewes, vaccinated animals were evaluated for different periods of time to measure the production of antibodies between animals that aborted and animals that reached term, the results revealed that the most sensitive test was the LSI (94.74 %) followed by MVD-Enfer (78.95 %) and finally IDvet (73.68 %), all three kits detected high levels of antibodies in ewes that aborted compared to those that had lambs without complications. The most sensitive test in this study is based on the identification of chlamydial lipopolysaccharide (LPS), which shows cross-reaction with all species of the genus *Chlamydia*, it is determined suitable for identifying ewes infected with any species of *Chlamydia*, but it is not considered specific for *C. abortus*⁽²⁹⁾. Finally, a study revealed the disadvantages of this type of commercial tests in terms of cross-reactions between *C. abortus* and *C. pecorum*, carrying out the evaluation in different flocks, serological tests revealed a low seropositivity of *C. abortus* using an ELISA test based on peptides (1.2 %) in Australian ewes and a moderate seropositivity in a Swiss flock with a clinical history of abortion associated with *C. abortus* (26.9 %). Using CFT and ELISA tests, seropositivity was significantly higher, suggesting cross-reactivity between these two species. Additionally, using a real-time PCR test to detect DNA of *C. pecorum* in Australian animals seropositive for *Chlamydia* spp., it was concluded that the seropositivity of *Chlamydia* may be related to cross-reactivity with endemic infections of *C. pecorum*⁽³⁰⁾. Due to the disadvantages shown by this type of tests, it is advisable to complement them with a more specific one such as PCR tests⁽²⁴⁾.

Cell culture

Due to their obligate intracellular nature, these bacteria require live media for their isolation; due to this, cell culture (McCoy cells by choice) is currently used for this purpose⁽²⁴⁾, until a few years ago, this technique was considered the gold standard for the diagnosis of *Chlamydia* spp.⁽¹⁾; however, the development of new methodologies, such as

nucleic acid amplification (PCR and sequencing), employed to improve diagnosis are currently considered the gold standard for diagnosing *Chlamydia* spp. infections⁽⁸⁾. Other tests such as polymerase chain reaction, which is a much more specific technique for the detection and typing of species of *Chlamydia* spp., is used much more frequently because it has a greater sensitivity and specificity compared to cell culture⁽²⁾.

Polymerase chain reaction test

This test detects specific DNA of any organism; therefore, it is a much more sensitive and specific test than cell culture when identifying the genus and species involved in the affected individuals⁽²⁴⁾. In the last 15 yr, the use of this technique has become very relevant, and its different variants reveal better results compared to those mentioned above, such as: i) processing a greater number of samples, ii) less time to obtain results, iii) the use of different types of samples for diagnosis, iv) organisms do not have to be one hundred percent viable and v) greater sensitivity and specificity. Since its use in veterinary diagnostic laboratories was implemented, the genes used to identify these bacterial agents have been different: major outer membrane protein (MOMP), polymorphic membrane proteins (Pmps), 16S and 23S⁽²⁴⁾. PCR methodologies for the specific detection of *Chlamydia* species are varied, to mention a few: The PCR test “Touchdown enzyme time release” to amplify different DNA sequences in the variable regions of the spacer rRNA genes 16S and 16S-23S specific for the identification of species of this bacterial genus; for example, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci*⁽³¹⁾. Another variant of this test, the PCR- RFLP test that identifies in the first instance the presence of the *omp2* gene specific to the family Chlamydiaceae and later, by digestion with the restriction enzyme *AluI*, has the ability to identify a total of nine species of the genus *Chlamydia*, among these, *C. abortus*, *C. pecorum*⁽³²⁾ and *C. psittaci*⁽³³⁾. Additionally, a variant focused on the 16S gene specific to the family Chlamydiaceae but using a real-time PCR test demonstrated high specificity when evaluating samples of different *Chlamydia* species against other bacterial genera⁽³⁴⁾; additionally, this variant can also be used for the specific identification of *Chlamydia* species using specific primers for each one⁽³⁵⁾. Later, a multiplex PCR test was developed for the identification of *C. abortus*, *C. pecorum* and *Coxiella burnetii*, involved as causative agents of abortion, this test, unlike the aforementioned ones, helps to simultaneously identify the three species, this test proved to be highly specific and rapid for the detection of these bacterial agents⁽³⁶⁾.

TREATMENT

Antibiotics

For the treatment of pathologies of chlamydial origin, antibiotics are the drugs of choice, since bacterins, in the case of OEA, are only available in some European countries and the costs required for their implementation are very high^(2,7). The administration of

tetracycline, penicillin and chloramphenicol for the treatment of infections caused by these bacterial agents has been shown to inhibit the growth of these organisms⁽²⁴⁾, it is important to emphasize that the use of antibiotics should be in a controlled manner to minimize the development of resistance by the pathogen. Although antibiotics serve to reduce losses due to these pathogens, these types of treatments do not eliminate bacteria; since affected animals continue to shed the organisms; therefore, their prophylactic use is not recommended⁽³⁷⁾. In European countries, in addition to the use of antibiotics, the administration of bacterins is also implemented in the case of OEA to prevent and control the disease in flocks with susceptible animals, this is because it is the only disease of chlamydial origin for which there are commercially available bacterins⁽²⁾.

Immunogens

In the past century, immunogens intended for the treatment and prevention of diseases worldwide have been one of the greatest achievements of public health; in this area, between 2 and 3 million lives are saved due to the implementation of these health measures⁽³⁸⁾. In the veterinary field, technological advances in the development of immunogens for disease control have had an important enhancement in the last 25 yr, from the use of complete bacteria, whether alive or dead, to the use of DNA immunogens, which offer safer measures for both the animal and the veterinarian who administers them⁽³⁹⁾.

In the last 70 yr, studies for the development of immunogens to combat diseases of chlamydial origin in animal species, mainly livestock (sheep, goats, cattle and pigs), focus on preventing economic losses in production units; however, the main objective is to preserve human health due to the zoonoses that some of these represent. Vaccine trials against *Chlamydia* spp. have increased in the last 10 yr, in these studies, the protein most used in the challenges against *Chlamydia* spp. has been the MOMP⁽⁴⁰⁾. Additionally, studies focused on the search for specific antigens of this surface protein have been carried out for a differentiation between species⁽⁴¹⁾. Later, different types of antigens have been used in the development of immunogens against chlamydial agents, the first tests traditionally used the EB, which were inactivated by treatments with ultraviolet light or live (attenuated) fixed with formalin. Later, in the mid-1990s, approaches in the use of other antigens for the development of subunit vaccines, such as recombinant proteins, synthetic peptides, expression vectors and DNA, began to be used for the challenge in murine models mainly⁽⁴⁰⁾.

In the case of *C. pecorum*, there are only two trials of vaccines against this agent, which have been challenged in murine models, although the results revealed an immune response in animals, these should be treated with caution because clinical cases of abortions are rarely related to *C. pecorum*⁽⁴²⁾.

Finally, although there are commercially available vaccines for the control and prevention of *C. abortus*, it is well documented that in the case of the live attenuated 1B *C. abortus* vaccine, it has the potential to reactivate and cause the disease in immunized animals⁽⁴³⁻⁴⁵⁾.

Of the total vaccine challenges against *Chlamydia* spp., only 5 % have been focused on *C. abortus*, evaluated in mice, cows, ewes and guinea pigs⁽⁴⁰⁾, the studies evaluate some proteins, mainly Pmps, looking for different variations or mutations that can serve as key points for the prevention of OEA⁽⁴⁶⁾.

Subunit vaccines, new technologies for the development of serodiagnostic tests and vaccine prototypes

To date, different studies that have identified these possible candidates, both for the diagnosis and for the development of vaccines⁽²⁾, have been developed. Immunoreactive proteins, expressed in infected animals, have been proposed as new candidates as marker antigens for the diagnosis and use of different virulence genes that can be used for the development of prototypes of subunit vaccines for the prevention and control of diseases caused by species of *Chlamydia* spp.⁽⁴⁷⁾. In the case of *C. abortus*, several studies have been carried out, evaluating different proteins. A study evaluated the humoral immune response triggered by some surface proteins (MOMP, MIP, Pmp13G) and associated with virulence (CPAF, TARP, SINC), this study showed that ewes that aborted showed a strong antibody response to surface antigens. Additionally, they identified that the most specific antigen for the serodiagnosis of human infections by *C. abortus* was Pmp13G; this protein did not show cross-reactivity with other species of *Chlamydia* spp. that affect humans⁽⁴⁷⁾.

Regarding the proteins currently used for the development of vaccine prototypes, studies have focused on three proteins that play a major role in the development cycle of the bacterium⁽⁴⁰⁾. Other proteins of this bacterial genus used as antigens in vaccine trials are the membrane surface proteins of *Chlamydia* spp., which have been shown to have highly conserved regions⁽⁴⁸⁾. Heat shock proteins (HSPs) and chlamydia protease-like activity factor (CPAF) proteins have also been considered as suitable candidates for the development of immunogens for the control and prevention of diseases of chlamydial origin, these have been shown to cause a strong inflammatory response in the host⁽⁴⁹⁾. Another study evaluates three different types of vaccines: DNA vaccine, phage vaccine (*OmpA*) and a commercial live attenuated, freeze-dried vaccine based on the strain 1B of *Chlamydia abortus*. Although the phage vaccine offers good results, it does not exceed that offered by the commercial vaccine; however, the study concludes that this novel vaccine administration system offers advantages that far outweigh commercial vaccines, such as: handling, more efficient safety and relatively cheaper production⁽⁵⁰⁾. Other tests evaluated a combination with the polysaccharide *Lycium barbarum* (LBP3a), the results demonstrated

good protection in mice challenged with *C. abortus* using a polysaccharide LBP3a combined with a DNA vaccine encoding the MOMP of *C. abortus*⁽⁵¹⁾.

Later, other proteins have been proposed, such as those belonging to the family of Pmps, these have been shown to have the immunogenic potential for the development of immunogens against *C. abortus*⁽²⁾. One study evaluated Pmp18D in two different formulations, FL (tyrosine kinase 3 ligand type Fms; Flt3L) and *Vibrio cholerae* ghosts (VCGs), to induce innate and cross-protective immunity against genital *C. abortus* infection. The evaluation was carried out with the regulation of the expression of the protein, by the activation and differentiation of different cell types. The results showed that the formulation that offers the best results is Pmp18D+VCG⁽⁵²⁾, as well as another variant, using an N-terminal fragment of this protein, called Pmp18D.1, the study evaluated its ability to induce an innate immune response in dendritic cells and activate the signaling pathways involved in the secretion of IL-1 β ⁽⁵³⁾. Other proteins used as combined antigens (MIP and CPAF) demonstrated 50 % efficacy against a commercial live attenuated vaccine; additionally, although there is release of the pathogen by immunized animals, these are released in smaller quantities compared to the negative control. Nevertheless, it was possible to observe in this study that, when these two proteins are administered individually, it has no effect against the experimental infection⁽⁵⁴⁾.

Several studies have been carried out against *C. psittaci*, using different types of proteins. Initially focused on the evaluation of the persistence of a DNA vaccine (pcDNA1-MOMP) and the expression of the recombinant protein (rMOMP) from the MOMP of an avian strain of *C. psittaci*, which causes respiratory problems in turkeys, the results showed that the persistence of the vaccine was 10 weeks and the expression of the protein was proportional to the persistence time⁽⁵⁵⁾. Subsequently, using a recombinant adenovirus vaccine using the same protein, it was evaluated in birds against avian chlamydia, the results of this study showed that this vaccine was safe, and that the protection rate reached up to 90 % in the challenged animals. Although the period of protection of the vaccine was six months, it is emphasized that the growth periods of the birds used for meat are approximately similar. However, birds intended for laying should be vaccinated twice because they have longer lifespans⁽⁵⁶⁾.

On the other hand, Pmps have also been used as candidates for the development of vaccines against *C. psittaci*; in this sense, a study developed and examined a recombinant vaccine administered due to the herpesvirus of turkeys, using the 5' end of the PmpD gene, which encodes the N-terminal fraction of this (pmpD-N). The evaluation of the recombinant virus (rHVT-pmpD-N) in the challenged birds revealed increased levels of specific antibodies against PmpD and a proliferation of specific lymphocytes against it. After the challenge with the strain *C. psittaci* CB7, a significant decrease in respiratory distress, lesions and bacterial load was found in the challenged group⁽⁵⁷⁾. One study evaluated the efficacy of

vaccination with plasmid proteins to prevent lung infection by *C. psittaci* in mice, in which a recombinant protein of CPSIT_p8 is used, which belongs to an important virulence factor in the form of a highly conserved “cryptic” plasmid of 7.5 kb. A recombinant of this protein was produced and challenged in a murine model. The results in this study showed that immunization significantly decreased the bacterial load in the lungs of the challenged mice, a lower level of IFN- γ was also observed. Its results conclude that the recombinant protein evaluated in this study induces significant protective immunity against *C. psittaci* and that it could be considered as a candidate for the development of a new vaccine for the prevention of infections caused by this bacterium⁽⁵⁸⁾.

However, other proteins involved in the virulence of this bacterium, such as chlamydial inclusion membrane proteins (Incs), have also been used as candidates in the development of vaccine prototypes. One study employed a recombinant of the transmembrane head protein CPSIT_0846 and challenged mice with respiratory tract infection caused by *C. psittaci*, the study revealed a strong cytokine profile with high levels of IFN- γ ; similarly, a strong humoral immune response was detected in the challenged mice, with high titers of specific IgG antibodies. The strong immune response correlated with a significantly reduced bacterial concentration and a decrease in the inflammatory pathology in the lungs of the mice after the challenge. The results of this study suggest that the protein CPSIT_0846 may be a possible candidate antigen for the development of a vaccine to induce protection against this type of infections⁽⁵⁹⁾.

For the detection of antibodies against *C. psittaci*, an ELISA test based on the N-terminal fragment of the PmpD (PmpD-N) was developed, the tests were performed to determine its sensitivity and specificity in experimentally infected and uninfected birds. The results of this study revealed that the ELISA-PmpD-N had a sensitivity and specificity of 97.9 %, 100 % respectively; in addition, there was no cross-reaction with positive serums for other avian pathogens. The results concluded that this protein fraction (PmpD-N) can be used as an antigen for the diagnosis of *C. psittaci* infections in birds⁽⁶⁰⁾. It should be noted that all studies have been carried out in *C. psittaci* of avian origin; however, since *C. psittaci* is genetically related to *C. abortus*⁽⁶¹⁾, with this evidence, the idea of focusing studies on the variant that affects small ruminants can be contemplated.

In *C. pecorum*, the most recent study focused on the development of vaccine prototypes using surface proteins has been carried out in experimentally infected ewes and evaluating two recombinant proteins: rMOMP and rPmpG, this study identified B-cell epitopes in asymptomatic animals, with arthritis related to this agent and animals immunized with a recombinant vaccine of these proteins. The results of this study conclude that these tests can help improve diagnostic tests for this agent in sheep flocks⁽⁶²⁾.

Later, a study evaluates a direct ELISA test using two recombinant protein antigens of this

bacterial species (rPmpG and rMOMP-G) and using the Pepscan method, a mapping and characterization of B-cell epitopes in these proteins was carried out in lambs with asymptomatic *C. pecorum* infections, with polyarthritis associated with *C. pecorum* and vaccinated with recombinant proteins. The results revealed that there is an immune response of antibodies against PmpG in the natural infection. Antibodies against MOMP-G increased in animals with polyarthritis. Finally, an epitope response was identified in immunized lambs and in naturally infected lambs⁽⁶³⁾.

CONCLUSIONS

Studies focused on the identification of immunoreactive proteins for the development of ELISA tests and vaccine prototypes against diseases caused by species of the genus *Chlamydia* that affect small ruminants have become very relevant in recent years, due to the importance in public health, animal welfare and economic importance that they represent.

Immunoassays with specific proteins of each species, such as Pmps, can be a key point to avoid cross-reactions between species, which would reduce erroneous results in veterinary diagnostic laboratories.

C. abortus is the species of the genus that has been the most importance in the last decade; since the available commercial vaccines have not given satisfactory results for the prevention and control of OEA; in addition to the biological risk that it represents. The use of subunit vaccines as an option for prototype development has good levels of safety compared to commercial vaccines; since they do not represent a risk to the personnel who handles them and offer results equal to or superior to those offered by them.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Literature cited:

1. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* 2003;128:217–244.
2. Rodolakis A, Laroucau K. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Vet Microbiol* 2015;181:107-118.
3. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens R, Kuo CC, Rosselló-Móra R. *et al.* Emendation of the family *Chlamydiaceae*: Proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol* 2015;38:99–103.

4. Vorimore F, Hsia R-ching, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A. *et al.* Isolation of a new *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. PLoS One 2013;8(9):e74823.
5. Taylor-Brown A, Bachmann NL, Borel N, Polkinghorne A. Culture-independent genomic characterisation of *Candidatus Chlamydia sanzinia*, a novel uncultivated bacterium infecting snakes. BMC Genomics 2016;17(1):710.
6. Staub E, Marti H, Biondi R, Levi A, Donati M, Leonard CA, *et al.* Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature-sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. Sci Rep 2018;(1):5660
7. Bommana S, Polkinghorne A. Mini review: Antimicrobial control of chlamydial infections in animals: Current practices and issues. Front Microbiol 2019;10:1-9.
8. Borel N, Polkinghorne A, Pospischil A. A review on chlamydial diseases in animals: still a challenge for pathologists? Vet Pathol 2018;55:374-390.
9. Jelocnik M, Laurence M, Murdoch FR, Polkinghorne A. Detection of *Chlamydiaceae* in ocular swabs from Australian pre-export feedlot sheep. Aust Vet J 2019;97(10):401-403.
10. Johnson F, Matheson BA, Williams H, Laing AG, Jandial V, Davidson-Lamb R, *et al.* Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife. Br Med J 1985;290:592-594.
11. Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Gebbers FO. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). Swiss Med Wkly 2002;132:64-66.
12. Walder G, Meusburger H, Hotzel H, Oehme A, Neunteufel W, Dierich MP, *et al.* *Chlamydophila abortus* Pelvic Inflammatory Disease. Emerg Infect Dis 2003;9(12):1642-1644.
13. Barbosa Mireles MA, Salazar García F, Fernández Rosas P, Montes de Oca-Jiménez R. Detection of serologic antibodies against *Chlamydophila Abortus* in two groups of people exposed to risk in ovine farms in Xalatlaco, Mexico. Trop Subtrop Agroecosystem 2013;16:423-429.
14. Ortega N, Caro MR, Gallego MC, Murcia-Belmonte A, Álvarez D, del Río L, *et al.* Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. Irish Vet J 2016;69:78.
15. Fossádal ME, Grand M, Gaini S. *Chlamydophila psittaci* pneumonia associated to exposure to fulmar birds (*Fulmaris glacialis*) in the Faroe Islands. Infect Dis (Auckl)

2018;50:817-821.

16. Osman KM, Ali HA, Eljakee JA, Gaafar MM, Galal HM. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of multiple *chlamydiaceae* species isolated from genital infection of women in Egypt. *Microb Drug Resist* 2012;18:440-445.
17. Lagae S, Kalmar I, Laroucau K, Vorimore F, Vanrompay D. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J Med* 2014;63:399-407.
18. Cadario ME, Frutos MC, Arias MB, Origlia JA, Zelaya V, Madariaga MJ, *et al.* Epidemiological and molecular characteristics of *Chlamydia psittaci* from 8 human cases of psittacosis and 4 related birds in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017;49:323-327.
19. Čechová L, Halánová M, Babinská I, Danišová O, Bartkovský M, Marcinčák S, *et al.* Chlamydiosis in farmed chickens in Slovakia and zoonotic risk for humans. *Ann Agric Environ Med* 2018;25:320-325.
20. Tolba HMN, Abou Elez RMM, Elsohaby I. Risk factors associated with *Chlamydia psittaci* infections in psittacine birds and bird handlers. *J Appl Microbiol* 2019;126:402-410.
21. Shaw KA, Szablewski CM, Kellner S, Kornegay L, Bair P, Brennan S, *et al.* Psittacosis outbreak among workers at chicken slaughter plants, Virginia and Georgia, USA, 2018. *Emerg Infect Dis* 2019;25(11):2143–2145.
22. Walker E, Lee EJ, Timms P, Polkinghorne A. *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: A common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. *Vet J* 2015;206:252–260.
23. Rodolakis A, Mohamad KY. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Vet Microbiol* 2010;140:382.
24. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol* 2009;135:2-21.
25. Mora Diaz JC, Díaz Aparicio E, Herrera López E, Suarez Güemes F, Escalante Ochoa C, Jaimes Villareal S, *et al.* Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Vet Mex* 2015;2:11.
26. Longbottom D, Psarrou E, Livingstone M, Vretou E. Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein

- fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. FEMS Microbiol Lett 2001;195:157-161.
27. Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. J Clin Microbiol 2002;40:4235-4243.
 28. Wilson K, Livingstone M, Longbottom D. Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. Vet Microbiol 2009;135:38-45.
 29. O'Neill LM, O'Driscoll, Markey B. Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. Irish Vet J 2018;71:1-9.
 30. Bommana S, Jelocnik M, Borel N, Marsh I, Carver S, Polkinghorne A. The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock. J Med 2019;68:627-632.
 31. Madico G, Quinn TC, Boman J, Gaydos CA. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* and *C. psittaci* Using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. J Clin Microbiol 2000;38:1085-1093.
 32. Marsilio F, Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I. Diagnosis of ovine chlamydial abortions by PCR-RFLP performed on vaginal swabs. Vet Res Commun 2005;29:99-106.
 33. Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J. PCR Detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. J Clin Microbiol 2001;39:3072-3079.
 34. Condon K, Oakey J. Detection of *Chlamydiaceae* DNA in veterinary specimens using a family-specific PCR. Lett Appl Microbiol 2007;45:121-127.
 35. Nordentoft S, Kabell S, Pedersen K. Real-time detection and identification of *Chlamydophila* species in veterinary specimens by using SYBR green-based PCR assays. Appl Environ Microbiol 2011;77:6323-6330.
 36. Berri M, Rekiki A, Boumedine K, Rodolakis A. Simultaneous differential detection of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. BMC Microbiol 2009;9:130.
 37. Essig A, Longbottom D. *Chlamydia abortus*: new aspects of infectious abortion in sheep and potential risk for pregnant women. Curr Clin Microbiol Reports 2015;2:22-34.

38. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med* 2014;6(6):708-720.
39. Francis MJ. Recent advances in vaccine technologies. *Vet Clin North Am - Small AnimPract* 2018;48:231-241.
40. Phillips S, Quigley BL, Timms P. Seventy years of *Chlamydia* vaccine research - Limitations of the past and directions for the future. *Front Microbiol* 2019;10:1-18.
41. Hoelzle LE, Hoelzle K, Wittenbrink MM. Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. *Vet Microbiol* 2004;103:85-90.
42. Rekiki A, Bouakane A, Rodolakis A. Combined vaccination of live 1B *Chlamydophila abortus* and killed phase I *Coxiella burnetii* vaccine does not destroy protection against chlamydiosis in a mouse model. *Can J Vet Res* 2004;68(3):226–228.
43. García-Seco T, Pérez-Sancho M, Salinas J, Navarro A, Díez-Guerrier A, García N, *et al.* Effect of preventive *Chlamydia abortus* vaccination in offspring development in sheep challenged experimentally. *Front Vet Sci* 2016;3:67.
44. Laroucau K, Aaziz R, Vorimore F, Menard MF, Longbottom D, Denis G. Abortion storm induced by the live *C. abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild-type infection. *Vet Microbiol* 2018;225:31-33.
45. Longbottom D, Sait M, Livingstone M, Laroucau K, Sachse K, Harris SR, *et al.* Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine* 2018;36:3593-3598.
46. Burall LS, Rodolakis A, Rekiki A, Myers GSA, Bavoil PM. Genomic analysis of an attenuated *Chlamydia abortus* live vaccine strain reveals defects in central metabolism and surface proteins. *Infect Immun* 2009;77(9):4161–4167.
47. Forsbach-Birk V, Foddis C, Simnacher U, Wilkat M, Longbottom D, Walder G, *et al.* Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *J Clin* 2013;8:1-15.
48. Hagemann JB, Simnacher U, Longbottom D, Livingstone M, Maile J, Soutschek E, *et al.* Analysis of humoral immune responses to surface and virulence-associated *Chlamydia abortus* proteins in ovine and human abortions by use of a newly developed line immunoassay. *J Clin Microbiol* 2016;54:1883-1890.
49. Vasilevsky S, Stojanov M, Greub G, Baud D. Chlamydial polymorphic membrane

- proteins: Regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence* 2016;7(1):11–22.
50. Li W, Guentzel MN, Seshu J, Zhong G, Murthy AK, Arulanandam BP. Induction of cross-serovar protection against genital chlamydial infection by a targeted multisubunit vaccination approach. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(12):1537-1544.
51. Ling Y, Liu W, Clark JR, March JB, Yang J, He C. Protection of mice against *Chlamydomytila abortus* infection with a bacteriophage-mediated DNA vaccine expressing the major outer membrane protein. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;144:389–395.
52. Ling Y, Li S, Yang J, Yuan J, He C. Co-administration of the polysaccharide of *Lycium barbarum* with DNA vaccine of *Chlamydomytila abortus* augments protection. *Immunol Invest* 2011;40:1–13.
53. Pan Q, Pais R, Ohandjo A, He C, He Q, Omosun Y, *et al.* Comparative evaluation of the protective efficacy of two formulations of a recombinant *Chlamydomytila abortus* subunit candidate vaccine in a mouse model. *Vaccine* 2015;33:1865–1872.
54. Pan Q, Zhang Q, Chu J, Pais R, Liu S, He C, *et al.* *Chlamydomytila abortus* Pmp18.1 induces IL-1 β secretion by TLR4 activation through the MyD88, NF- κ B, and caspase-1 signaling pathways. *Front Cell Infect Microbiol Frontiers* 2017;7:514.
55. O’Neill LM, Keane OM, Ross PJ, Nally JE, Seshu J, Markey B. Evaluation of protective and immune responses following vaccination with recombinant MIP and CPAF from *Chlamydomytila abortus* as novel vaccines for enzootic abortion of ewes. *Vaccine* 2019;37:5428–5438.
56. Loots K, Vleugels B, Ons E, Vanrompay D, Goddeeris BM. Evaluation of the persistence and gene expression of an anti-*Chlamydomytila psittaci* DNA vaccine in turkey muscle. *BMC Vet Res* 2006;2:18.
57. Qiu C, Zhou J, Cao XA, Lin G, Zheng F, Gong X. Immunization trials with an avian chlamydial MOMP gene recombinant adenovirus. *Bioeng Bugs* 2010;1:267-273.
58. Liu S, Sun W, Chu J, Huang X, Wu Z, Yan M, *et al.* Construction of recombinant HVT expressing PmpD, and immunological evaluation against *Chlamydomytila psittaci* and Marek’s disease virus. *PLoS One* 2015;10(4):e0124992.
59. Liang M, Wen Y, Ran O, Chen L, Wang C, Li L, *et al.* Protective immunity induced by recombinant protein CPSIT_p8 of *Chlamydomytila psittaci*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:6385-6393.
60. Ran O, Liang M, Yu J, Yu M, Song Y, Yimou W. Recombinant protein CPSIT 0846

induces protective immunity against *Chlamydia psittaci* infection in BALB/c mice. *Pathog Dis* 2017;75:18.

61. Liu SS, Chu J, Zhang Q, Sun W, Zhang TY, He C. Development of a novel PmpD-N ELISA for *Chlamydia psittaci* infection. *Biomed Environ Sci* 2016;29:315-322.
62. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DSAB, Jolley KA, Keijzers WC, *et al.* Multi locus sequence typing of *Chlamydia* reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species. *PLoS One* 2010;5(12):e14179.
63. Desclozeaux M, Jelocnik M, Whitting K, Saifzadeh S, Bommana S, Potter A, *et al.* Safety and immunogenicity of a prototype anti-*Chlamydia pecorum* recombinant protein vaccine in lambs and pregnant ewes. *Vaccine* 2017;35(27):3461–3465.

Toluca Estado de México.

11 de noviembre, 2022

DR. CARLOS A. SANDOVAL-CASTRO
EDITOR DE LA REVISTA
Tropical and Subtropical Agroecosystems

PRESENTE

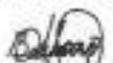
Por este conducto le envío un cordial saludo, al tiempo de poner a su consideración el trabajo titulado "LA PREDICCIÓN *IN SILICO* DETERMINA LA PRESENCIA DE EPÍTOPOS INMUNOGÉNICOS ALTAMENTE ESPECÍFICOS EN FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA DE LA MEMBRANA POLIMÓRFICA (PMP17G) DE *Chlamydia abortus*" Por los coautores Fernando De Jesús-Aldama, Roberto Montes-de-Oca-Jiménez*, Beatriz Arellano-Reynoso y Jorge Antonio Varela-Guerrero.

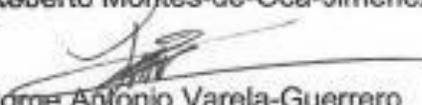
Para nuestro grupo de trabajo, el presente artículo y su publicación en su prestigiada revista es importante. En la búsqueda de nuevas tecnologías para el diagnóstico y prevención del aborto enzoótico ovino y caprino; el presente trabajo determinó *in silico* la presencia de epítopos con potencial inmunogénicos específicos contra *Chlamydia abortus* de dos fragmentos de la proteína PMP17G, los cuales serán de utilidad para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y desarrollo de inmunógenos. Los autores declaran el interés de la publicación en la Revista Tropical and Subtropical agroecosystem y que no hay ningún conflicto de interés.

ATENTAMENTE


M EN C. Fernando De Jesús-Aldama


DR. Roberto Montes-de-Oca-Jiménez*


DRA. Beatriz Arellano-Reynoso


DR. Jorge Antonio Varela-Guerrero

*Corresponding: Roberto Montes de Oca Jiménez. romojimenez@yahoo.com.

[Servicio de ayuda de la revista](#)

IDIOMA

Escoge idioma

Español (España) ▼

Entregar

TAMAÑO DE FUENTE

A A A

[OPEN JOURNAL SYSTEMS](#)

INFORMACIÓN

- [Para lectores/as](#)
- [Para autores/as](#)
- [Para bibliotecarios/as](#)

[INICIO](#) [ACERCA DE](#) [ÁREA PERSONAL](#) [BUSCAR](#) [ACTUAL](#) [ARCHIVOS](#) [AVISOS](#)

Inicio > Usuario/a > Autor/a > **Envíos activos**

Envíos activos

ACTIVO/A [ARCHIVAR](#)

ID.	DD-MM ENVIAR	SECC	AUTORES/AS	TÍTULO	ESTADO
4615	11-12	ART	de Jesús Aldama, Montes de Oca...	LA PREDICCIÓN IN SILICO DETERMINA LA PRESENCIA DE...	Asignación en espera

Elementos 1 - 1 de 1

Empezar un nuevo envío

[HAGA CLIC AQUÍ](#) para ir al primer paso del proceso de envío en cinco pasos.

ISSN: 1870-0462

USUARIO/A

Ha iniciado sesión como...

robertomontes

- [Mis revistas](#)
- [Mi perfil](#)
- [Cerrar sesión](#)

AUTOR/A

Envíos

- [Activo/a \(1\)](#)
- [Archivar \(0\)](#)
- [Nuevo envío](#)

CONTENIDO DE LA REVISTA

Buscar

Ámbito de la búsqueda

Todo ▼

Buscar

Examinar

- [Por número](#)
- [Por autor/a](#)
- [Por título](#)
- [Por secciones](#)
- [Otras revistas](#)

[Servicio de ayuda de la revista](#)

IDIOMA

Escoge idioma

Español (España) ▼

Entregar

TAMAÑO DE FUENTE

A A A

[OPEN JOURNAL SYSTEMS](#)

INFORMACIÓN

- [Para lectores/as](#)
- [Para autores/as](#)
- [Para bibliotecarios/as](#)

[INICIO](#) [ACERCA DE](#) [ÁREA PERSONAL](#) [BUSCAR](#) [ACTUAL](#) [ARCHIVOS](#) [AVISOS](#)

Inicio > Usuario/a > Autor/a > Envíos > #4615 > **Resumen**

#4615 Resumen

RESUMEN [REVISIÓN](#) [EDICIÓN](#)

Envío

Autores/as

Fernando de Jesús Aldama, Roberto Montes de Oca Jiménez, Beatriz Arellano-Reynoso, Jorge Antonio Varela Guerrero

Título

LA PREDICCIÓN IN SILICO DETERMINA LA PRESENCIA DE EPÍTOPOS INMUNOGÉNICOS ALTAMENTE ESPECÍFICOS EN FRAGMENTOS DE LA MEMBRANA POLIMÓRFICA (PMP17G) DE Chlamydia abortus

Archivo original

[4615-20220-3-SM.DOCX](#) 2022-11-12

Archivos comp.

[4615-20221-1-SR.PDF](#) 2022-11-12 [AÑADIR UN ARCHIVO COMPLEMENTARIO](#)

Emisor/a

Roberto Montes de Oca Jiménez

Fecha de envío

noviembre 12, 2022 - 10:24

Sección

Artículos de Investigación

Editor/a

Ninguno asignado/a

Estado

Estado

Asignación en espera

Iniciado

2022-11-12

Modificado por última vez

2022-11-12

USUARIO/A

Ha iniciado sesión como...

robertomontes

- [Mis revistas](#)
- [Mi perfil](#)
- [Cerrar sesión](#)

AUTOR/A

Envíos

- [Activo/a \(1\)](#)
- [Archivar \(0\)](#)
- [Nuevo envío](#)

CONTENIDO DE LA REVISTA

Buscar

Ámbito de la búsqueda

Todo ▼

Buscar

Examinar

- [Por número](#)
- [Por autor/a](#)
- [Por título](#)
- [Por secciones](#)
- [Otras revistas](#)

Autores/as

Nombre	Fernando de Jesús Aldama 
URL	https://orcid.org/0000-0001-8549-6102
Institución	Universidad Autónoma del Estado de México
País	México
Resumen biográfico	Salud Animal
Nombre	Roberto Montes de Oca Jiménez 
URL	https://orcid.org/0000-0001-9994-0948
Institución	Universidad Autónoma del Estado de México
País	México
Resumen biográfico	Salud Animal
Contacto principal para la correspondencia editorial.	
Nombre	Beatriz Arellano-Reynoso 
URL	https://orcid.org/0000-0002-3067-2719
Institución	Universidad Nacional Autónoma de México
País	México
Resumen biográfico	Bacteriología
Nombre	Jorge Antonio Varela Guerrero 
URL	https://orcid.org/0000-0001-6887-5979
Institución	Universidad Autónoma del Estado de México
País	México
Resumen biográfico	Salud Animal

PALABRAS CLAVE

[agricultura](#)
[agroecosistemas](#)
[biodiversidad](#) [bovinos](#)
[cabras](#) [cambio climático](#)
[composición química](#)
[consumo](#) [crecimiento](#)
[digestibilidad](#) [diversidad](#)
[forraje](#) [OVINOS](#) [pastoreo](#)
[prevalencia](#)
[productividad](#)
[rendimiento](#)
[rumiantes](#) [salinidad](#)
[sostenibilidad](#)
[sustentabilidad](#)

Título y resumen

Título	LA PREDICCIÓN IN SILICO DETERMINA LA PRESENCIA DE EPÍTOPOS INMUNOGÉNICOS ALTAMENTE ESPECÍFICOS EN FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA DE LA MEMBRANA POLIMÓRFICA (PMP17G) DE <i>Chlamydia abortus</i>
Resumen	El Aborto Enzoótico Ovino es una enfermedad infecto contagiosa provocada por la bacteria Gram negativa e intracelular obligada <i>Chlamydia abortus</i> . Para el diagnóstico en campo, se emplean pruebas serológicas de uso comercial; sin embargo, algunas de estas pruebas tienen porcentajes de sensibilidad y especificidad bajos debido a las reacciones cruzadas que muestran los antígenos empleados frente a otros patógenos. Para el diagnóstico más certero, es necesario desarrollar pruebas con antígenos más específicos como las Pmp's, comprobando la presencia de epítomos específicos empleando nuevas tecnologías. El presente trabajo determinó in silico la presencia de epítomos con potencial inmunogénicos específicos contra <i>Chlamydia abortus</i> de dos fragmentos de la proteína PMP17G. Se realizó la clonación y secuenciación de los fragmentos y a partir del análisis de estos, con el empleo de dos softwares bioinformáticos se detectó la presencia de epítomos contra <i>C. abortus</i> POMP90-3 (ocho epítomos) y POMP90-4 (un epítomo). El análisis in silico nos permitió predecir e identificar de manera eficiente epítomos específicos contra <i>C. abortus</i> en ambos fragmentos de la proteína, los cuales serán de utilidad para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y desarrollo de inmunógenos.

Indexación

Palabras clave	Aborto Enzoótico Ovino, ELISA, epítomos, in silico, Proteína de la Membrana Polimórfica
Idioma	es

Organismos colaboradores

Organismos	—
------------	---

Metadatos específicos de OpenAIRE

Identificación del proyecto	—
-----------------------------	---

LA PREDICCIÓN *IN SILICO* DETERMINA LA PRESENCIA DE EPÍTOPOS INMUNOGÉNICOS ALTAMENTE ESPECÍFICOS EN FRAGMENTOS DE LA PROTEÍNA DE LA MEMBRANA POLIMÓRFICA (PMP17G) DE *Chlamydia abortus*.

IN SILICO PREDICTION DETERMINES THE PRESENCE OF HIGHLY SPECIFIC IMMUNOGENIC EPITOPES IN FRAGMENTS OF THE POLYMORPHIC MEMBRANE PROTEIN (PMP17G) OF *Chlamydia abortus*.

Fernando De Jesús-Aldama¹, Roberto Montes-de-Oca-Jiménez^{2*}, Beatriz Arellano-Reynoso³, Jorge Antonio Varela-Guerrero^{1,2}

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5 carretera Toluca-Atlacomulco, C.P. 50295 San Cayetano Morelos, México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, El Cerrillo Piedras Blancas C.P. 50295, Toluca, Estado de México, México.

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria C.P. 04510 Coyoacán. Ciudad de México.

*Corresponding author: Roberto Montes de Oca Jiménez,

E-mail address: romojimenez@yahoo.com.

RESUMEN

El Aborto Enzoótico Ovino es una enfermedad infecto contagiosa provocada por la bacteria Gram negativa e intracelular obligada *Chlamydia abortus*. Para el diagnóstico en campo, se emplean pruebas serológicas de uso comercial; sin embargo, algunas de estas pruebas tienen porcentajes de sensibilidad y especificidad bajos debido a las reacciones cruzadas que muestran los antígenos empleados frente a otros patógenos. Para el diagnóstico más certero, es necesario desarrollar pruebas con antígenos más específicos como las Pmp's, comprobando la presencia de epítomos específicos empleando nuevas tecnologías. El presente trabajo determinó *in silico* la presencia de epítomos con potencial inmunogénicos específicos contra *Chlamydia abortus* de dos fragmentos de la proteína PMP17G. Se realizó la clonación y secuenciación de los fragmentos y a partir del análisis de estos, con el empleo de dos softwares bioinformáticos se detectó la presencia de epítomos contra *C. abortus* POMP90-3 (ocho epítomos) y POMP90-4 (un epítomo). El análisis *in silico* nos permitió predecir e identificar de manera eficiente epítomos específicos contra *C. abortus* en ambos fragmentos de la proteína, los cuales serán de utilidad para el desarrollo de técnicas de diagnóstico y desarrollo de inmunógenos.

Palabras clave: Aborto Enzoótico Ovino, ELISA, epítomos, *in silico*, Proteína de la Membrana Polimórfica

INTRODUCCIÓN

Chlamydia abortus es una bacteria intracelular obligada con un ciclo de desarrollo bifásico único compartido entre todas las especies del género; el cual, se divide en dos estructuras morfológicas bien definidas, el cuerpo elemental y el cuerpo reticular (Klasinc et al., 2021). *C. abortus* es un patógeno de importancia en pequeños rumiantes, ya que es el agente causal del Aborto Enzoótico Ovino (AEO); esta enfermedad provoca aborto en hembras gestantes en el último tercio de gestación y por consecuencia diversas pérdidas económicas (Essig y Longbottom, 2015; Rodolakis y Laroucau, 2015). Además, se ha relacionado a esta bacteria como agente primario de artritis, conjuntivitis, mastitis y neumonía (Yin et al., 2014). Se ha documentado en diversos estudios el potencial zoonótico de *C. abortus*, principalmente para mujeres que entran en contacto directo o indirecto con animales infectados causando diversas patologías (Cheong et al., 2019), tales como coagulación intravascular diseminada después del parto, falla renal aguda, edema pulmonar, enfermedad pélvica inflamatoria (Walder et al., 2003), sepsis durante el embarazo (Walder et al., 2005), neumonía (Ortega et al., 2016) y como agente del síndrome de dificultad respiratoria aguda (Pichon et al., 2020).

En México, el AEO es considerada como una enfermedad endémica y de reporte obligatorio, la presencia de este patógeno se ha reportado en ovinos y caprinos en diversos estudios desde hace varios años como uno de los agente causales de aborto en ovinos (Escalante-Ochoa et al., 1996) y caprinos (Escalante-Ochoa et al., 1997). Por otro lado, fue reportada la presencia de anticuerpos contra este agente en rebaños caprinos del estado de Guanajuato, en los que se registró una frecuencia de 4.87% (Campos-Hernández et al., 2014). Posteriormente en 2015, en el mismo estado, *Chlamydia* spp. se identificó en cabras lecheras mediante cultivo celular en el 26,98% de las muestras (Mora Díaz et al., 2015).

A partir del año 2000 se continuó con diversas investigaciones para demostrar un panorama más claro de la presencia de *C. abortus* en México, una de estas investigaciones fue la realizada por Jimenez-Estrada et al, (2008) en el municipio de Xalatlaco, Estado de México, donde se identificó la presencia de este agente mediante pruebas de ELISA y PCR, en donde obtuvo una frecuencia de 21.3% y 0.65% respectivamente. Por otro lado en 2014, en esa misma entidad en diferentes municipios evaluaron muestras de suero en bovinos de leche para determinar la presencia de anticuerpos contra *C. abortus* empleando una ELISA indirecta encontrando una frecuencia del 0.73% de animales positivos (Praga-Ayala et al., 2014). Otro estudio realizado en diferentes unidades de producción ovina ubicadas en diferentes municipios (Atlacomulco, Calimaya, Coatepec Harinas, Santa María Rayón, Temascalcingo, Tenango del Valle, Xonacatlán Zumpango) de esta entidad, se emplearon dos técnicas de diagnóstico, aislamiento (68.44%) para *Chlamydia* spp. y PCR (6.46%) específico para *C. abortus* (datos no publicados) (De Jesus-Aldama, 2019).

En el mismo año en rebaños caprinos con problemas de aborto en diferentes estados de la república (Coahuila, Jalisco, Querétaro, Puebla y Veracruz), se identificó con por aislamiento (23.1%) y por PCR específico (9.6%) (Sánchez, 2014). En Guanajuato, en rebaños caprinos lecheros se identificaron anticuerpos contra *C. abortus* (4.87%); dichos animales seropositivos se identificaron en seis de nueve unidades de producción evaluadas

(66.6%) (Campos-Hernández et al., 2014). También se determinó la presencia del agente por medio de ELISA (9.60%), aislamiento (26.98%) y PCR (23.8%) (Mora et al., 2015).

En otras especies como equinos que convivían con ovinos seropositivos a *C. abortus* se identificaron títulos de anticuerpos contra *C. abortus* en equinos (1.32%) que convivían con bovinos (48%), caprinos (12.5%) y ovinos (29.7%). Dicho estudio reveló que el 75% de los equinos seropositivos a *C. abortus* se obtuvieron en unidades de producción ovina seropositivas a *C. abortus* (Rubio-Navarrete et al., 2017). Aunque la evidencia sobre la presencia de *C. abortus* en México es cada vez más evidente, el uso de inmunógenos como método de diagnóstico para la prevención y control del AEO no son implementados en el país.

Una alternativa para el control del AEO es la aplicación de vacunas atenuadas e inactivadas, fundamentalmente en países europeos; las cuales, disminuyen las tasas de abortos y las cargas bacterianas. Sin embargo, no eliminan por completo al agente de animales infectados (Bommana y Polkinghorne, 2019). Adicionalmente, hay evidencias en el caso del empleo de la vacuna 1B de *Chlamydia abortus*, que la bacteria puede reactivarse y provocar abortos en animales inmunizados con ésta (Laroucau et al., 2018; Longbottom et al., 2018). Estas limitaciones en la vacunación han generado la necesidad de desarrollar vacunas más seguras y eficaces para el control y la prevención del AEO. Recientemente se desarrolló una vacuna inactivada (INMEVA®; Laboratorios Hipra S.A., Amer, Spain); la cual demostró una reducción en trastornos reproductivos y excreción del patógeno en animales desafiados de manera considerable (Montbrau et al., 2020). Sumado a esto, las vacunas de subunidades han demostrado ser más seguras y económicas que las disponibles comercialmente, tanto vacunas combinadas (MIP/CPAF) (O'Neill et al., 2019) o empleadas como refuerzo (COMC y (OG)-COMC) (Livingstone et al., 2021), su uso en modelos experimentales redujo considerablemente las tasas de abortos y la excreción del patógeno en los animales desafiados. En México la vacunación para la prevención y control del AEO no ha sido implementado, ya que los inmunógenos no se comercializan y no existe ninguno de su tipo en el país, lo cual, dificulta el control de la enfermedad en rebaños ovinos y caprinos a nivel nacional.

El serodiagnóstico específico del AEO se ve limitado debido a las reacciones cruzadas que presentan algunas de las pruebas comerciales disponibles actualmente con bacterias del mismo género y con algunas bacterias Gram-negativas como *Acinetobacter* dado que, estas se desarrollan en base a antígenos compartidos entre las especies de este género, (O'Neill et al., 2018). La falta de pruebas lo suficientemente específicas y sensibles contra el AEO, ha conducido a diversos estudios enfocados en identificar factores de virulencia y proteínas de superficie, que pudieran ser empleados como dianas para el desarrollo de pruebas de ELISA más eficientes revelando resultados prometedores en el diagnóstico específico de *C. abortus* (Forsbach-Birk et al., 2013; Hagemann et al., 2016). Otra alternativa ha sido la identificación *in silico* de epítopes inmunogénicos en proteínas de *C. abortus*; el cual, se ha realizado desde principios del año 2000, evaluando proteínas de superficie, como la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Vretou et al., 2001) y proteínas polimórficas de membrana externa (POMP) (Vretou et al., 2003). Se han estudiado los factores de virulencia en diferentes especies de *Chlamydia* (Rahman et al., 2016), así como el desarrollo de microensayos empleando

péptidos sintéticos que representan epítomos de células B de proteínas inmunodominantes de algunas especies del género (Sachse et al., 2018); debido a lo mencionado anteriormente, el presente estudio tuvo como objetivo identificar y caracterizar *in silico* la presencia de epítomos inmunogénicos en dos fragmentos de la Proteína de la Membrana Polimórfica (pmp17G) que puedan ser empleados para la detección específica del AEO a través de dos softwares bioinformáticos.

MATERIALES Y METODOS

Se empleó un aislamiento de *C. abortus* previamente identificado por medio de aislamiento en cultivo celular y PCR específica, la extracción de DNA se realizó a partir de cultivo celular, empleando el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA, USA) (de Oliveira et al., 2018) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Identificación de los genes *POMP90-3* y *POMP90-4*.

La identificación de los fragmentos superpuestos *POMP-3* y *POMP90-4* de *C. abortus* se realizó a través de dos pruebas de reacción en cadena de la polimerasa (Longbottom et al., 2002) empleando los siguientes iniciadores: *POMP90-3F* (3'-TATTGTCCTCCAGGCA-'5), *POMP90-3R* (3'-ATCAGCATAAATAGCCCCG-'5) y *POMP90-4F* (3'-TCCACTTCAAAGG-'5), *POMP90-4R* (3'-GTTCCCATCGAAGGTA-'5) respectivamente (Longbottom et al., 2002). Las reacciones se prepararon en un volumen final de 50 µL; los cuales contenían: 25.0 µL de Master mix (IBI Scientific, USA), 0.4 µM de cada iniciador, 50-100ng de ADN molde y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen deseado. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Primer G (Techne, UK) empleando las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C durante 10 min., seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 44 °C por 1 min para ambos pares de iniciadores y extensión durante a 72 °C por 1 min. Finalmente una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (10 mg/mL) a 90 Volts por 40 min. y visualizados en una cámara de UV.

Construcción de plásmidos

Una vez identificados ambos fragmentos, las bandas de ADN de interés de ambas amplificaciones de PCR se cortaron del gel y se trataron de acuerdo con el protocolo de purificación, “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante, para purificar el ADN (Hireche et al., 2016). El ADN purificado se empleó para clonar los fragmentos de interés, en el vector de clonación “pGEM-T easy vector system” (Promega, USA), el cual es un vector linealizado con una sola timidina 3'-terminal en ambos extremos. La reacción de ligazón se llevó a cabo mediante la incubación a 16 °C durante toda la noche, el resultado final de dicho procedimiento fue la construcción de dos plásmidos recombinantes pGEM-T-*POMP90-3* y pGEM-T-*POMP90-4*.

Transformación celular

Para el proceso de transformación celular, se empleó la cepa bacteriana de *E. coli* DH5 α químicamente competentes empleando el método de CaCl₂ (Illingworth et al., 2017), las células y los plásmidos recombinantes (pGEM-T- POMP90–3 y pGEM-T- POMP90–4) se cotransformaron y se sembraron en agar selectivo Luria Bertani (LB) (500 μ L) suplementado con ampicilina (100 μ g/mL), Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)/X-Gal, con concentraciones finales de 96 μ g/mL y 40 μ g/mL respectivamente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs., finalmente las colonias resultantes se seleccionaron a través del método de selección de colonias azul-blancas (Nabi et al., 2016).

Purificación de los plásmidos recombinantes

Los plásmidos recombinantes (pGEM-T- POMP90–3 y pGEM-T- POMP90–4) se purificaron a partir de células de *E. coli* DH5 α transformadas, obtenidas previamente de cultivos de 10 mL de caldo LB con antibiótico; posteriormente los cultivos se trataron de acuerdo con el protocolo para purificación de plásmidos “High-Speed Plasmid Mini Kit” (IBI Scientific, USA).

Análisis de los plásmidos recombinantes

La clonación de ambos plásmidos recombinantes se confirmó mediante amplificación por PCR y digestión enzimática (*EcoRI* y *NcoI*) (Promega, USA); adicionalmente se secuenciaron dichos plásmidos recombinantes para su análisis posterior.

Secuenciación y análisis de los plásmidos recombinantes

Una vez confirmada la clonación de ambos fragmentos en los plásmidos recombinantes y posterior a su purificación, se cuantificó la concentración (ng/ μ L) de ADN plasmídico en un Nanodrop Q5000 UV-Vis Spectrophotometer (Quawell, USA) para su secuenciación.

Predicción de epítopes *in silico*

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el software Mega X (Wasissa et al., 2021). Las secuencias de aminoácidos se evaluaron mediante el software bioinformático Immune Epitope Database Analysis Resource (<http://tools.iedb.org/bcell/>) y BepiPred - 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) para la identificación de epítos con potencial inmunogénico a partir de secuencias de aa obtenidas en este estudio.

RESULTADOS

Detección de los genes *POMP90-3* y *POMP90-4*.

El uso de los iniciadores (Longbottom et al., 2002) para la identificación específica de los fragmentos superpuestos 3 y 4 de la Proteína de la Membrana Polimórfica de *C. abortus*, resultaron en dos productos de 245 pb (*POMP90-3*) y 209 pb (*POMP90-4*) (figura 1).

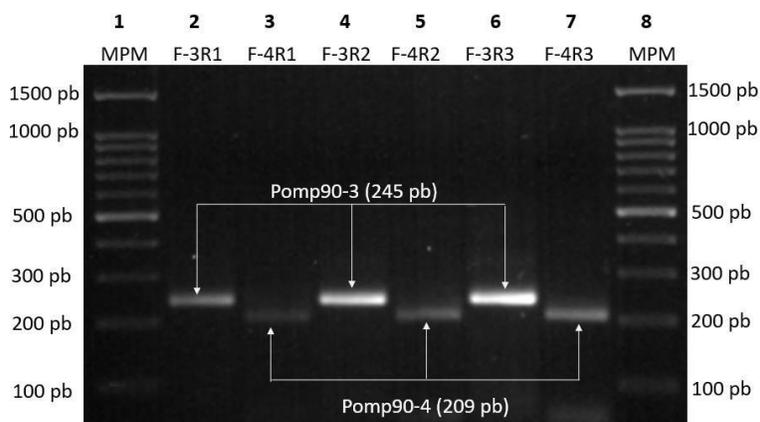


Figura 1. Identificación específica de los fragmentos 3 y 4 del gen de la proteína de la membrana polimórfica (*POMP90*) de *Chlamydia abortus*. Carril 1 y 8: Marcador de Peso Molecular, Carriles: 2, 4 y 6. Fragmento 3 (245 pb) y Carriles: 3, 5 y 7. Fragmento 4 (209 pb).

Análisis de restricción enzimática de la construcción de los plásmidos recombinantes.

Una vez obtenidas las construcciones recombinantes (pGEM-T- *POMP90-3* y pGEM-T- *POMP90-4*), fueron sometidas a una evaluación por medio de digestión enzimática empleando enzimas de restricción de acuerdo con el mapa de clonaje múltiple de dicho vector, empleando las enzimas (*EcoRI* y *NcoI*) (Promega, USA). Una vez finalizada la digestión enzimática, se evaluaron los resultados con una electroforesis en gel de agarosa; el cual, se observaron dos fragmentos 3015 correspondiente al plásmido y 245 pb para el fragmento recombinante (rOMP90-3); de igual forma, para el fragmento 4 se obtuvieron dos fragmentos de 3015 correspondiente al plásmido y 209 pb para el fragmento recombinante (rOMP90-4). El análisis de restricción confirmó la presencia de los genes *POMP90-3* y *POMP90-4* en el plásmido pGEM-T-Easy. Alternativamente, se realizó una prueba de PCR para la identificación de los fragmentos a partir de la purificación de los plásmidos, comprobando de esta forma la presencia de los fragmentos *POMP90-3* y *POMP90-4* dentro de vector pGEM-T Easy. Finalmente ambos plásmidos recombinantes fueron secuenciados para el análisis de sus secuencias. (figura 2).

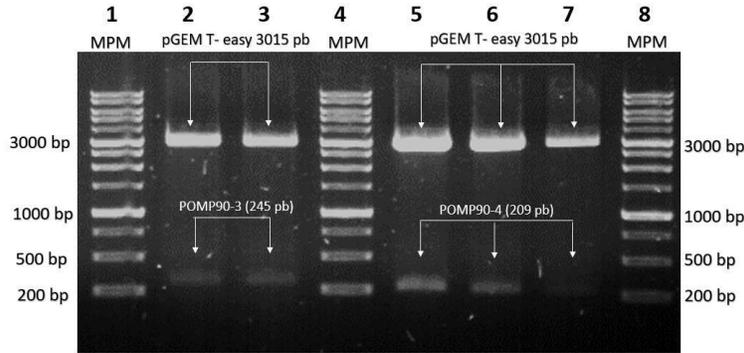


Figura 2. Identificación de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4 a través de digestión enzimática con enzimas de restricción *NcoI* y *NdeI*. Carril 1, 5 y 8, marcador de peso molecular. Carril 2-4, pGEM T- easy (3015 pb) y rOMP90-3 (245 pb). Carril 4 y 5 pGEM T- easy POMP90-4 (209 pb).

Predicción de epítopes *in silico*

Identificación de epítopes inmunogénicos fragmento rOMP90-3 de *Chlamydia abortus*

Con un total de 75 residuos que conforman la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-3, al ser evaluado por los dos softwares, se observó que la secuencia conservada al 100% predijo ocho epítopes de diferentes tamaños. Ambas evaluaciones nos demostraron variaciones en cuanto a la predicción de los epítopes; IEDB predijo un total de ocho epítopes, los más grandes son tres: dos de ocho y uno de quince residuos (figura 3), BepiPred predijo ocho, los más grandes fueron dos, uno de ocho y otro de quince residuos; estos ocho epítopes coinciden en ambos programas; sin embargo, Immune Epitope Database predijo una adicional, siendo nueve los epítopes predichos por este programa, una ligera diferencia entre ambos programas, el resto son más pequeños de uno y dos residuos que varían en ambos programas al punto de estar presentes o no en uno u otro de los programas. Adicionalmente, realizamos la predicción de epítopes discontinuos y estructuras 3D en ambos fragmentos empleando el software “ElliPro: Antibody Epitope Prediction”, esta predicción demostró cuatro epítopes discontinuos. Además, las estructuras tridimensionales de los epítopes discontinuos demuestran que estos se encuentran expuestos en la superficie de la estructura de todo el fragmento rOMP90-3 (Figura 4); el programa identificó un total de cuatro epítopes discontinuos con sus respectivas estructuras tridimensionales.

Figura 4. Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rOMP90-3 de *C. abortus*. Representación gráfica de cómo se estructuran teóricamente los epítomos discontinuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de ésta.

Identificación de epítomos inmunogénicos del fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*

Con un total de 62 residuos que conforman la secuencia de aminoácidos del fragmento rOMP90-4, la secuencia conservada al 100% predijo un epítomo de 12 aminoácidos. “BepiPred 2.0” evaluó cada residuo de la secuencia proteínica; el cual, determinó un resultado similar al predicho por “Immune Epitope Database”; con la diferencia de que este programa excluyó un aminoácido al inicio del epítomo predicho en comparación al primero (Figura 5). De igual forma, realizamos la predicción de epítomos discontinuos y estructuras 3D de dicho fragmento. Además, las estructuras tridimensionales de los epítomos discontinuos demuestran que éstos se encuentran expuestos en la superficie de la estructura de todo el fragmento rOMP90-4 (Figura 6). “BepiPred 2.0” evaluó cada residuo de la secuencia proteínica, este programa determinó un resultado similar al predicho por “Immune Epitope Database”; con la diferencia de que este programa excluyó un aminoácido al inicio del epítomo predicho en comparación al primero.

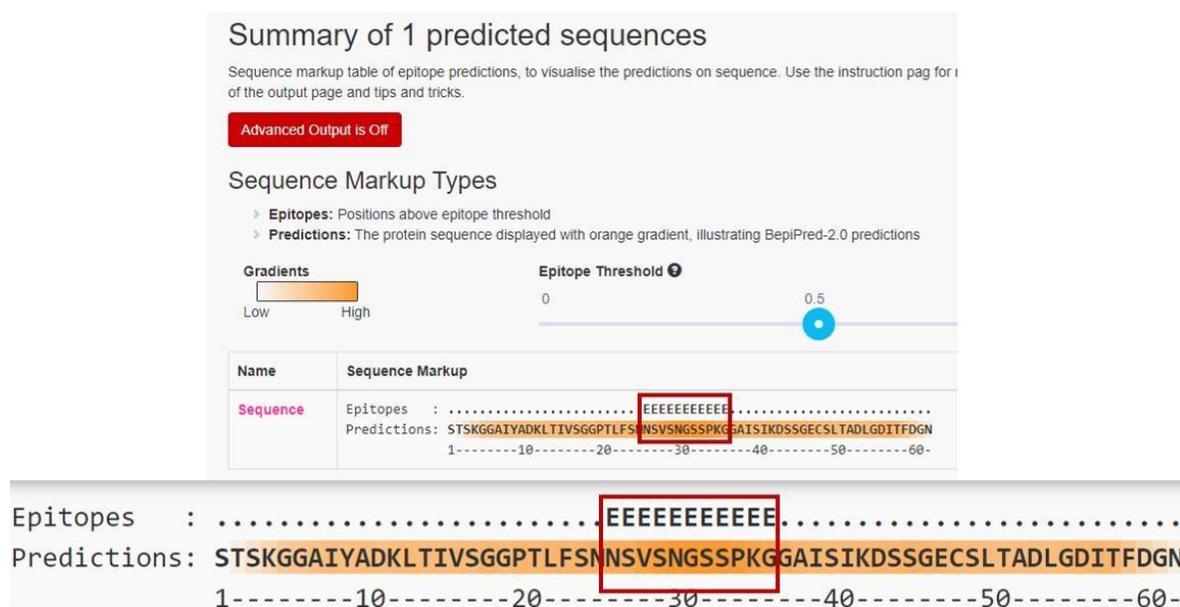


Figura 5. Epítomos predichos (11 Epítomos) por el programa “BepiPred 2.0” en la secuencia correspondiente al fragmento rOMP90-4 (enmarcado en rojo).

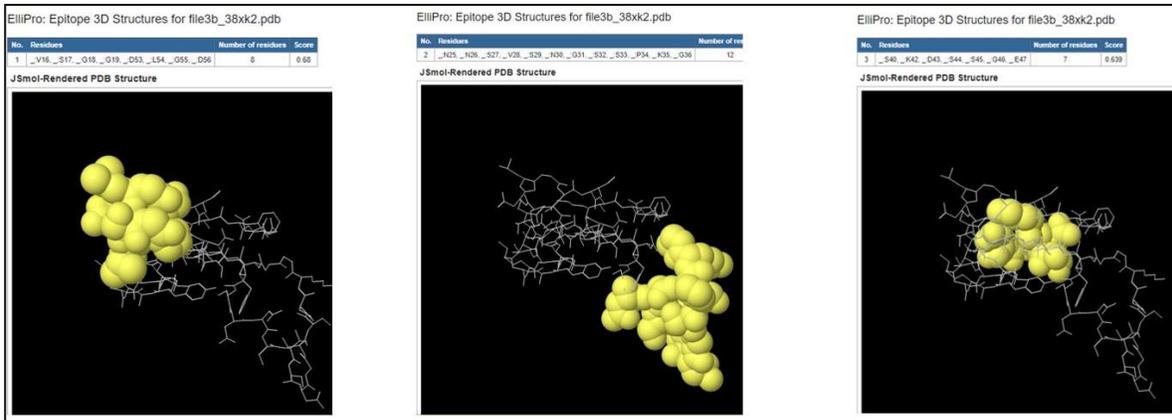


Figura 6. Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rOMP90-4 de *Chlamydia abortus*. Representación gráfica de cómo se estructuran teóricamente los epítomos discontinuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de esta.

DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo fue determinar la presencia *in silico* de epítomos con potencial inmunogénico en dos fragmentos de la proteína PMP17G de *C. abortus*, agente causal del AEO, enfermedad infecto contagiosa con potencial zoonótico ampliamente documentado (Rodolakis y Laroucau, 2015). Debido a que las pruebas comerciales disponibles actualmente presentan reacciones cruzadas con otras especies del género se dificulta el diagnóstico específico del agente (Bommana et al., 2019). Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la presencia de epítomos con potencial inmunogénico en los dos fragmentos analizados rOMP90-3 y rOMP90-4.

La capacidad de predecir epítomos solo a partir de secuencias de antígenos es una tarea compleja y a pesar del esfuerzo sustancial por innovar y actualizar los algoritmos matemáticos en los cuales se basan estos programas, se ha logrado un avance limitado durante la última década en la precisión de los métodos de predicción de epítomos, especialmente para aquellos que se basan únicamente en la secuencia del antígeno (Jespersen et al., 2017). El presente trabajo realizó la clonación y transformación celular de un aislado obtenido en rebaños en el Estado de México.

Aunque en la mayoría de los casos este tipo de herramientas se han empleado para el desarrollo de vacunas recombinantes (Soria-Guerra et al., 2015; Aguilar-Montes de Oca et al., 2022); en el presente estudio y otros realizados anteriormente, se ha demostrado que estos también pueden emplearse para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico, debido a la naturaleza de las mismas; por lo cual, es posible emplearlas para dicho fin como ya se ha llevado a cabo en el caso de *C. suis* (De Puyssseylr et al., 2018).

Cabe mencionar que a pesar de que el empleo de estas herramientas tiene muchas ventajas y optimizan los tiempos de trabajo en el laboratorio, es importante recalcar que, al igual que para el desarrollo de vacunas

recombinantes, todas las herramientas bioinformáticas disponibles actualmente proporcionan una lista completa de epítomos para diseñar pruebas de serodiagnóstico. Sin embargo, esta solo es la etapa inicial del proceso ya que, una vez predichos los epítomos en la secuencia diana, se deben evaluar cuáles péptidos serán los más adecuados para las subsecuentes evaluaciones. Actualmente la evaluación de péptidos sigue siendo un desafío, debido a que implementar el proceso de validación requiere de tiempos importantes (Soria-Guerra et al., 2015) y el cotejo con pruebas acreditadas como óptimas para el diagnóstico del AEO por la WOA (WOA, 2018).

De acuerdo a estudios realizados previamente, demuestran que los estudios *in silico* son más rápidos y eficientes que los empleados de manera habitual y ha contribuido dentro del desarrollo del presente trabajo de investigación optimizando los tiempos, evitando el proceso de producción de los fragmentos recombinantes; ya que, una vez identificados los péptidos específicos dentro de las secuencias de ambos fragmentos, existen empresas dentro del ramo que se dedican a la síntesis de los mismos para que puedan emplearse de forma prácticamente inmediata una vez sintetizados.

Las secuencias conservadas en su totalidad en las secuencias de nucleótidos y las de aminoácidos de ambos fragmentos, se procedió a realizar el mapeo de ambas secuencias; se determinó para el fragmento rOMP90-3 un total de ocho epítomos y para el fragmento rOMP90-4 un solo epítomo de un tamaño de doce residuos. Un estudio que desarrolló una ELISA recombinante empleó el mapeo de la secuencia completa de la proteína PmpC (2140 aa) de *C. suis* y detectó un total de 9 epítomos de diferentes tamaños, detectado al final un residuo de nueve aa óptimo para el diagnóstico específico de este patógeno; ya que, la ELISA rPmpC detectó todos los sueros de control positivo y contrastó con la técnica de fijación del complemento (CFT) y contó con un 100% de especificidad contra *C. suis*. Es importante resaltar estos resultados porque las secuencias completas de epítomos predichos por los programas pueden ser o no óptimos en su totalidad como se observó en dicho estudio (De Puysselyr et al., 2018) y esto se verá reflejado hasta que se pueda realizar la evaluación y validación de los epítomos predichos en el presente estudio. Hay que considerar que en cuanto al fragmento rOMP90-3 se mostró un epítomo adicional predicción con Immune Epitope Database (nueve) y con BepiPred 2.0 (ocho) con ambos programas, siendo solamente dos de los ocho predichos iguales para los dos programas, por lo cual debemos de ser prudentes al momento de elegir con cuál se decidiría trabajar en el futuro (Jespersen et al., 2017).

El mapeo de secuencias de proteínas enfocado en la proteína de la membrana externa PorB de *C. trachomatis* para el desarrollo de una vacuna contra este patógeno que afecta al humano, determinó características fisicoquímicas, la estructura secundaria, 3D y la predicción del sitio funcional (epítomos inmunogénicos) (Pourhajibagher y Bahador, 2016). Por esto, se destaca el empleo reciente de este tipo de modelos *in silico* para la predicción de epítomos que pudieran servir para el desarrollo de diferentes pruebas o inmunógenos contra las bacterias de este género y lo más importante es que puedan ser lo suficientemente sensibles y específicas para un diagnóstico adecuado y preciso. En el caso de *C. abortus* sería deseable poder diferenciar esta entre otras

dos especies que afectan a los pequeños rumiantes como causantes de abortos: *C. pecorum* y *C. psittaci* (Walker et al., 2015) (Osman *et al.*, 2011; Rodolakis y Laroucau, 2015).

Además de servir para la predicción y mapeo de secuencias de proteínas, también se puede determinar la estructura conformacional de las proteínas y observar de manera teórica la ubicación del epítipo de interés (Jespersen et al., 2017). El presente estudio mostró una representación gráfica de las estructuras conformacionales 3D (epítipes discontinuos) de cada uno de los epítipes predichos por este programa (Vita et al., 2019), existen dos tipos de epítipes, lineales y discontinuos. Al no ser 100% lineales debemos darnos una idea de la ubicación de estos epítipes y si en realidad se encuentran expuestos en la estructura 3D (Vita et al., 2019); ya que, las proteínas están en su forma natural en esta conformación y con la ayuda de estos programas, tenemos la posibilidad de predecir estas estructuras a partir de secuencias lineales (Ansari y Raghava, 2010; Jespersen *et al.*, 2017); además, la predicción discontinua de epítipes de células B requiere de la visualización de una estructura 3D del antígeno (Soria-Guerra et al., 2015).

CONCLUSIONES

La proteína de la membrana polimórfica es una alternativa viable para el desarrollo de pruebas serológicas específicas contra *C. abortus*.

La predicción *in silico* de epítipes inmunogénicos optimiza tiempos y costos de inversión para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico.

Se lograron identificar diferentes epítipes inmunogénicos en las secuencias de los fragmentos rOMP90-3 y rOMP90-4, los cuales resultaron ser específicos para la especie *C. abortus*.

Las estructura conformacionales de los epítipes predichos demuestran su exposición en la superficie lo que hace posible su reconocimiento por los anticuerpos contra las mismas.

BIBLIOGRAFÍA

146. Ansari, H. R., & Raghava, G. P. 2010. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. Immunome research, 6, 1-9. doi.org/10.1186/1745-7580-6-6.
147. Aguilar-Montes de Oca, S., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Carlos Vázquez-Chagoyán, J., Barbabosa-Pliego, A., Eliana Rivadeneira-Barreiro, P., & C Zambrano-Rodríguez, P. (2022). The Use of Peptides in Veterinary Serodiagnosis of Infectious Diseases: A Review. Veterinary sciences, 9(10), 561. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100561>.
148. Bommana, S., & Polkinghorne, A. 2019. Mini Review: Antimicrobial Control of Chlamydial Infections in Animals: Current Practices and Issues. Frontiers in microbiology, 10, 113. 10, 1–9. doi:10.3389/fmicb.2019.00113.

149. Bommana, S., Jelocnik, M., Borel, N., Marsh, I., Carver, S., & Polkinghorne, A. 2019. The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock. *Journal of medical microbiology*, 68(4), 627–632. doi:10.1099/jmm.0.000951.
150. Campos-Hernández, E., Vázquez-Chagoyán, J. C., Salem, A. Z., Saltijeral-Oaxaca, J. A., Escalante-Ochoa, C., López-Heydeck, S. M., & de Oca-Jiménez, R. M. 2014. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical animal health and production*, 46(6), 919–924. doi.org/10.1007/s11250-014-0585-6.
151. Cheong, H. C., Lee, C., Cheok, Y. Y., Tan, G., Looi, C. Y., & Wong, W. F. (2019). *Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis*. *Microorganisms*, 7(5), 146. doi:10.3390/microorganisms7050146.
152. De Jesus-Aldama, F. 2019. Aislamiento e Identificación Molecular de *Chlamydia abortus* en Ovinos del Estado De México [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de México. Repositorio institucional – Universidad Autónoma del Estado de México.
153. de Oliveira, J., Rozental, T., de Lemos, E., Forneas, D., Ortega-Mora, L. M., Porto, W., da Fonseca Oliveira, A. A., & Mota, R. A. 2018. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta tropica*, 183, 19–22. doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.010.
154. De Puyssseleyr, K., Kieckens, E., De Puyssseleyr, L., Van den Wyngaert, H., Ahmed, B., Van Lent, S., Creasy, H. H., Myers, G., & Vanrompay, D. 2018. Development of a *Chlamydia suis*-specific antibody enzyme-linked immunosorbent assay based on the use of a B-cell epitope of the polymorphic membrane protein C. *Transboundary and emerging diseases*, 65(2), e457–e469. doi.org/10.1111/tbed.12783.
155. Escalante-Ochoa, C., Díaz-Aparicio, E., Segundo-Zaragoza, C., & Suárez-Güemes, F. 1997. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: first report. *Revista latino americana de microbiología*, 39(3-4), 117–121.
156. Escalante-Ochoa, C., Rivera-Flores, A., Trigo-Tavera, F., & Romero-Martínez, J. (1996). Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep, through cell culture isolation. *Revista latinoamericana de microbiologia*, 38(1), 17–23.
157. Essig, A., Longbottom, D. *Chlamydia abortus: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women*. *Current Clinical Microbiology Reports* volume, 22–34 (2015). doi:10.1007/s40588-015-0014-2.
158. Forsbach-Birk, V., Foddiss, C., Simnacher, U., Wilkat, M., Longbottom, D., Walder, G., Benesch, C., Ganter, M., Sachse, K., & Essig, A. 2013. Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *PloS one*, 8(11), e80310. doi.org/10.1371/journal.pone.0080310.
159. Hagemann, J. B., Simnacher, U., Longbottom, D., Livingstone, M., Maile, J., Soutschek, E., Walder, G., Boden, K., Sachse, K., & Essig, A. 2016. Analysis of Humoral Immune Responses to Surface and Virulence-Associated *Chlamydia abortus* Proteins in Ovine and Human Abortions by Use of a Newly Developed Line Immunoassay. *Journal of clinical microbiology*, 54(7), 1883–1890.

160. Hireche, S., Ababneh, M. M., Bouaziz, O., & Boussena, S. 2016. Seroprevalence and molecular characterization of *Chlamydia abortus* in frozen fetal and placental tissues of aborting ewes in northeastern Algeria. *Tropical animal health and production*, 48(2), 255–262. doi:10.1007/s11250-015-0944-y.
161. Illingworth, M., Hooppaw, A. J., Ruan, L., Fisher, D. J., & Chen, L. 2017. Biochemical and Genetic Analysis of the *Chlamydia* GroEL Chaperonins. *Journal of bacteriology*, 199(12), e00844-16. doi:10.1128/JB.00844-16.
162. Atalla, Hatem & Alzuheir, Ibrahim & Jalboush, Nasr. (2017). Detection of *Chlamydothyla abortus* antibody in active reproductive rams in sheep herds in northern Palestine. *Revue de médecine vétérinaire*. 168. 192-196.
163. Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., & Marcatili, P. 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic acids research*, 45(W1), W24–W29. doi:10.1093/nar/gkx346.
164. Klasinc, R., Reiter, M., Digruber, A., Tschulenck, W., Walter, I., Kirschner, A., Spittler, A., & Stockinger, H. 2021. A Novel Flow Cytometric Approach for the Quantification and Quality Control of *Chlamydia trachomatis* Preparations. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(12), 1617. doi.org/10.3390/pathogens10121617.
165. Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Menard, M. F., Longbottom, D., & Denis, G. 2018. Abortion storm induced by the live *Chlamydia abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild-type infection. *Veterinary microbiology*, 225, 31–33. doi:10.1016/j.vetmic.2018.09.012.
166. Livingstone, M., Wattedgedera, S. R., Palarea-Albaladejo, J., Aitchison, K., Corbett, C., Sait, M., Wilson, K., Chianini, F., Rocchi, M. S., Wheelhouse, N., Entrican, G., & Longbottom, D. 2021. Efficacy of Two *Chlamydia abortus* Subcellular Vaccines in a Pregnant Ewe Challenge Model for Ovine Enzootic Abortion. *Vaccines*, 9(8), 898. doi:10.3390/vaccines9080898.
167. Longbottom, D., Fairley, S., Chapman, S., Psarrou, E., Vretou, E., & Livingstone, M. 2002. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydothyla abortus*. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4235–4243. doi:10.1128/JCM.40.11.4235-4243.2002.
168. Longbottom, D., Sait, M., Livingstone, M., Laroucau, K., Sachse, K., Harris, S. R., Thomson, N. R., & Seth-Smith, H. 2018. Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine*, 36(25), 3593–3598. doi:10.1016/j.vaccine.2018.05.042.
169. Montbrau, C., Fontseca, M., March, R., Sitja, M., Benavides, J., Ortega, N., Caro, M. R., & Salinas, J. 2020. Evaluation of the Efficacy of a New Commercially Available Inactivated Vaccine Against Ovine Enzootic Abortion. *Frontiers in veterinary science*, 7, 593. doi:10.3389/fvets.2020.00593.

170. Mora Diaz, J. C., Díaz Aparicio, E., Herrera López, E., Suarez Güemes, F., Escalante Ochoa, C., Jaimes Villareal, S., & Arellano Reynoso, B. 2015. Isolation of *Chlamydia abortus* in dairy goat herds and its relation to abortion in Guanajuato, Mexico. *Veterinaria México OA*, 2(1), 01-11.
171. Nabi, H., Rashid, I., Ahmad, N., Durrani, A., Akbar, H., Islam, S., Bajwa, A. A., Shehzad, W., Ashraf, K., & Imran, N. 2017. Induction of specific humoral immune response in mice immunized with ROP18 nanospheres from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology research*, 116(1), 359–370. doi:10.1007/s00436-016-5298-5.
172. O'Neill, L. M., Keane, O. M., Ross, P. J., Nally, J. E., Seshu, J., & Markey, B. 2019. Evaluation of protective and immune responses following vaccination with recombinant MIP and CPAF from *Chlamydia abortus* as novel vaccines for enzootic abortion of ewes. *Vaccine*, 37(36), 5428–5438. doi:10.1016/j.vaccine.2019.06.088.
173. O'Neill, L. M., O'Driscoll, Á., & Markey, B. 2018. Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish veterinary journal*, 71, 13. doi:10.1186/s13620-018-0124-2.
174. Ortega, N., Caro, M. R., Gallego, M. C., Murcia-Belmonte, A., Álvarez, D., Del Río, L., Cuello, F., Buendía, A. J., & Salinas, J. 2016. Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Irish veterinary journal*, 69, 8. doi:10.1186/s13620-016-0067-4.
175. Osman, K. M., Ali, H. A., ElJakee, J. A., & Galal, H. M. 2011. *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 30(3), 939–948. doi.org/10.20506/rst.30.3.2088.
176. Pichon, N., Guindre, L., Laroucau, K., Cantaloube, M., Nallatamby, A., & Parreau, S. 2020. *Chlamydia abortus* in Pregnant Woman with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Emerging infectious diseases*, 26(3), 628–629. doi.org/10.3201/eid2603.191417.
177. Pourhajibagher, M., & Bahador, A. 2016. Designing and in Silico Analysis of PorB Protein from *Chlamydia Trachomatis* for Developing a Vaccine Candidate. *Drug research*, 66(9), 479–483. doi.org/10.1055/s-0042-110319.
178. Praga-Ayala, A. R., Montes de Oca-Jiménez, R., Ortega-Santana, C., Salem, A. Z. M., Cubillos-Godoy, V., Fernández-Rosas, P., & Monroy-Salazar, H. G. 2014. Low seroprevalence of *Chlamydia abortus* in dairy cows of hot environment in southern of. *Life Science Journal*, 10457.
179. Rahman, K., Chowdhury, E. U., Sachse, K., & Kaltenboeck, B. 2016. Inadequate Reference Datasets Biased toward Short Non-epitopes Confound B-cell Epitope Prediction. *The Journal of biological chemistry*, 291(28), 14585–14599. doi.org/10.1074/jbc.M116.729020.
180. Rodolakis, A., & Laroucau, K. 2015. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary microbiology*, 181(1-2), 107–118. doi:10.1016/j.vetmic.2015.07.010.
181. Rubio-Navarrete, I., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Acosta-Dibarrat, J., Monroy-Salazar, H.G., Morales-Erasto, V., Fernández-Rosas, P. and Odongo, E.N. 2017. Prevalence of *Chlamydia abortus* Antibodies in

- Horses from the Northern State of Mexico and Its Relationship with Domestic Animals. *Journal of equine veterinary science*, 56, 110-113.
182. Sachse, K., Rahman, K. S., Schnee, C., Müller, E., Peisker, M., Schumacher, T., Schubert, E., Ruetzger, A., Kaltenboeck, B., & Ehrlich, R. 2018. A novel synthetic peptide microarray assay detects *Chlamydia* species-specific antibodies in animal and human sera. *Scientific reports*, 8(1), 4701. doi.org/10.1038/s41598-018-23118-7.
183. Sánchez-Rocha, L., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Palomares-Resendiz, G., Barradas-Piña, Francisco, & Díaz-Aparicio, E. 2021. Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras con historial de abortos en México. *Abanico veterinario*, 11, e118. Epub 10 de Octubre de 2022. doi.org/10.21929/abavet2021.26.
184. Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., & Rosales-Mendoza, S. 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *Journal of biomedical informatics*, 53, 405–414. doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003.
185. Vita, R., Mahajan, S., Overton, J. A., Dhanda, S. K., Martini, S., Cantrell, J. R., Wheeler, D. K., Sette, A., & Peters, B. 2019. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic acids research*, 47(D1), D339–D343. doi:10.1093/nar/gky1006.
186. Vretou, E., Giannikopoulou, P., Longbottom, D., & Psarrou, E. 2003. Antigenic organization of the N-terminal part of the polymorphic outer membrane proteins 90, 91A, and 91B of *Chlamydomphila abortus*. *Infection and immunity*, 71(6), 3240–3250. doi.org/10.1128/IAI.71.6.3240-3250.2003.
187. Vretou, E., Psarrou, E., Kaisar, M., Vlisidou, I., Salti-Montesanto, V., & Longbottom, D. 2001. Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydomphila abortus*). *Infection and immunity*, 69(1), 607–612. doi.org/10.1128/IAI.69.1.607-612.2001.
188. Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Würzner, R., & Ploner, F. 2005. An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydomphila abortus*. *Obstetrics and gynecology*, 106(5 Pt 2), 1215–1217. doi:10.1097/01.aog.0000161060.69470.9c.
189. Walder, G., Meusburger, H., Hotzel, H., Oehme, A., Neunteufel, W., Dierich, M. P., & Würzner, R. 2003. *Chlamydomphila abortus* pelvic inflammatory disease. *Emerging infectious diseases*, 9(12), 1642–1644. doi:10.3201/eid0912.020566.
190. Walker, E., Lee, E. J., Timms, P., & Polkinghorne, A. 2015. *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: A common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. *Veterinary journal*, 206(3), 252–260. doi:10.1016/j.tvjl.2015.09.022.
191. Wasissa, M., Lestari, F. B., Nururrozi, A., Tjahajati, I., Indarjulianto, S., & Salasia, S. 2021. Investigation of chlamydomphilosis from naturally infected cats. *Journal of veterinary science*, 22(6), e67. doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e67.
192. World Organization for animal Health (WOAH) 2018. – Manual terrestre: Chapter 3.7.5. - Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydomphilosis) 59, 1456–1465. Disponible en: <https://www.woah.org/es/que->

hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/enfermedades-animales/?_alphabet=C (fecha de consulta: 20 de abril de 2020).

193. Yin, L., Schautteet, K., Kalmar, I., Bertels, G., Van Driessche, E., Czaplicki, G., Borel, N., Longbottom, D., Frélin, D., Dispas, M., Al, E., 2014. Prevalence of *Chlamydia abortus* in Belgian ruminants. *Prevalentie. VLAAMS Diergeneeskd. Tijdschr.* 83, 164–170. doi:10.1128/AEM.68.12.5911.