



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Desarrollo de una ELISA indirecta usando una proteína recombinante de *Chlamydia abortus* como antígeno, como prueba diagnóstica en caprinos

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

Diana Berenice Quiroga Ventolero

TUTOR PRINCIPAL:

Efrén Díaz Aparicio
INIFAP-CENID Salud Animal e Inocuidad

COMITÉ TUTOR:

Laura Cobos Marín
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Rigoberto Hernández Castro
Hospital General "Dr. Manuel Gea González"

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, octubre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi hermano, te amo por siempre.

A mis tías por darme su apoyo y su cariño.

A mi mamá, por todo, por siempre y para siempre... Gracias.

A mi abuelita... porque sólo se muere cuando se olvida y yo nunca te olvido.

A mi Lili, por acompañarme y apoyarme en todos los momentos buenos y malos que se presentaron en esta etapa de mi vida. Porque no me dejaste rendir

...

GRACIAS POR CREER EN MI

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Efrén Díaz Aparicio, mi tutor, por confiar en mí y tomarme en cuenta para este proyecto.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Laura Cobos Marín y el Dr. Rigoberto Hernández Castro, por brindarme de su conocimiento para realizar este trabajo.

A la Dra. Gabriela Palomares por estar ahí siempre, para apoyarme y ayudarme de todas las maneras posibles. Por todos sus consejos y sus palabras de aliento, por ser mi guía, gracias.

A la Dra. Sandra Cuevas y al Dr. Alejandro Benítez, por abrirme las puertas de sus laboratorios.

Al Dr. José Luis Cerriteño, por dedicarme de su tiempo para guiarme en la parte final de mi proyecto.

A la Dra. Beatriz Arellano y al equipo de seminario de investigación.

A mi mejor amiga Karli, y a mis Straps: Ale, Carlos, Noé y Farid, por su valiosa amistad y por ser parte de mi vida. “Nada de lo que hagamos en esta vida será legendario, a menos que tus amigos estén ahí para verlo”.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, CENID Salud Animal e Inocuidad.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por brindarme la oportunidad de seguir creciendo académicamente.

A CONACYT, por la beca proporcionada durante mi realización del programa de Maestría en Ciencias.

A los miembros del jurado.

A todos aquellos que en mayor o menor medida aportaron para que este trabajo pudiera realizarse.

Este proyecto fue realizado con el financiamiento de los proyectos:

SAGARPA CONACyT 2017-2-291311: “Desarrollo y transferencia de pruebas diagnósticas para Lentivirus y microorganismos causantes de aborto: *Chlamydia spp*, *Brucella melitensis*, *Leptospira spp* y *Coxiella burnetii*, en ovinos y caprinos”.

PAPIIT IT-201520 “Desarrollo y aplicación de nuevas pruebas diagnósticas en cabras”.

“A pesar de las dificultades y las tragedias de nuestras vidas y, en realidad gracias a ellas, todos tenemos la posibilidad de adoptar una perspectiva que nos transforme de víctimas en triunfadores”

Edith Eger. “La bailarina de Auschwitz”

CONTENIDO

RESUMEN ----- XV

ABSTRACT ----- XVI

I.	INTRODUCCIÓN -----	1
1.	Aborto Enzootico de los Pequeños Rumiantes -----	2
2.	Taxonomía del orden <i>Chlamydiales</i> -----	2
2.1	<i>Chlamydia abortus</i> -----	5
3.	Ciclo de desarrollo -----	6
3.1	Generalidades -----	6
3.2	Cuerpo elemental -----	7
3.2.1	Estructura -----	7
3.2.2	Adhesión y penetración a la célula del hospedero -----	8
3.3	Cuerpo reticular -----	11
3.3.1	Estructura -----	11
3.4	Infección crónica. Persistencia -----	12
3.5	Liberación bacteriana -----	14
4.	Estructura antigénica -----	14
4.1	Antígenos glicolipídicos -----	15
4.1.1	Lipopolisacárido -----	15
4.1.2	Glicolípido soluble -----	15
4.2	Antígenos proteicos -----	15
4.2.1	Proteína principal de membrana externa (OmpA) -----	16
4.2.1.1	Características estructurales -----	16
4.2.1.2	Función y contexto biológico -----	18
4.2.2	Proteínas ricas en cisteína -----	19

4.2.3	Proteínas polimórficas de membrana (Pmp)	20
4.2.4	Proteínas de choque térmico (Hsp)	20
5.	Mecanismos de patogenicidad	21
5.1	Adhesión	21
5.2	Inhibición de la fusión fagosoma – lisosoma	22
5.3	Sistemas de secreción	22
5.3.1	Sistema de secreción no flagelar tipo III (NF- T3SS)	23
5.3.2	Sistema de secreción tipo V (T5SS)	24
5.4	Resistencia a antibióticos	24
5.5	Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	25
5.5.1	Inhibición de trampas extracelulares de neutrófilos (NET's)	25
5.5.2	Evasión de la fagocitosis	26
5.5.3	Inhibición de la apoptosis	26
5.5.4	<i>Chlamydia</i> suprime el complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y II)	27
5.5.5	Agotamiento de linfocitos T	27
6.	Transmisión, patogenia y signos clínicos	28
6.1	Transmisión	28
6.2	Patogenia y signos clínicos	28
7.	Respuesta inmune contra <i>C. abortus</i>	30
7.1	Respuesta inmune innata	31
7.2	Respuesta inmune adquirida	33
7.2.1	Respuesta inmune celular	33
7.2.2	Respuesta inmune humoral	37
8.	Prevención y control	38
8.1	Manejo	38
8.2	Antibioterapia	38
8.3	Vacunación	39

9. Diagnóstico	40
9.1 Técnicas de diagnóstico directas	41
9.2 Técnicas de diagnóstico indirectas	43
10. Uso de proteínas recombinantes	45
II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
1. Justificación	48
2. Hipótesis	48
3. Objetivo principal	48
4. Objetivos específicos	48
III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Obtención de la proteína recombinante OmpA (rOmpA)	50
1.1 Inducción de la expresión de rOmpA en <i>E. coli</i> BL21	50
1.2 Lisis del cultivo <i>E. coli</i> BL21-pLATE/ <i>ompA</i> , inducido	50
1.3 Solubilización de cuerpos de inclusión	51
1.4 Diálisis de proteínas solubilizadas	51
1.5 Desnaturalización de proteínas	51
1.6 Purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad	52
1.7 Identificación de rOmpA mediante electroforesis SDS – PAGE y Western blot Anti-Histidinas	52
1.8 Cuantificación de rOmpA purificada	53
2. Reconocimiento inmunológico de la proteína	54
3. Estandarización de la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecta	54
IV. RESULTADOS	56

1. Sobreexpresión de la proteína recombinante OmpA	57
1.1 Detección de rOmpA mediante electroforesis de SDS – PAGE	57
1.2 Detección de rOmpA mediante Western blot	59
2. Purificación de la proteína recombinante OmpA	61
2.1 Identificación de rOmpA purificada mediante electroforesis SDS – PAGE	61
2.2 Identificación de rOmpA purificada mediante Western blot	62
3. Reconocimiento inmunológico de la proteína recombinante OmpA	62
4. Estandarización del ELISA – I	64
V. DISCUSIÓN	69
VI. CONCLUSIONES	78
VII. BIBLIOGRAFÍA	80
VIII. ANEXOS	109
1. ANEXO I. Soluciones para geles desnaturizantes de Poliacrilamida – Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y Western blot	110
2. ANEXO II. Soluciones para equilibrio y activación de columna Niquel-Sefarosa	112
3. ANEXO III. Soluciones para el desarrollo de la técnica de ELISA indirecto	114

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Características básicas del género <i>Chlamydia</i> (Adaptado de Sachse et al., 2015) -----	4
Cuadro 2. Densidades ópticas obtenidas para la estandarización de la técnica de ELISA indirecto -----	65
Cuadro 3. Promedios y desviaciones estándar para el suero negativo en sus diferentes diluciones, utilizando 50 ng de proteína purificada -----	66
Cuadro 4. Promedios y desviaciones estándar para el suero positivo en sus diferentes diluciones, utilizando 50 ng de proteína purificada -----	66
Cuadro 5. Promedios y desviaciones estándar para el suero negativo en sus diferentes diluciones, utilizando 100 ng de proteína purificada -----	67
Cuadro 6. Promedios y desviaciones estándar para el suero positivo en sus diferentes diluciones, utilizando 100 ng de proteína purificada -----	67
Cuadro 7. Diferencias entre promedios de suero positivo y negativo, en placa con 50 ng de antígeno -----	68
Cuadro 8. Diferencias entre promedios de suero positivo y negativo, en placa con 100 ng de antígeno -----	68
Figura 1. Ciclo de desarrollo clamidial -----	7
Figura 2. Electronografía de las diferentes formas clamidiales -----	8
Figura 3. Resumen de las interacciones conocidas de adhesinas de clamidia y receptores del hospedero -----	10
Figura 4. Electronografía de un cultivo clamidial tratado con penicilina -----	12
Figura 5. Modelo de la membrana externa de un cuerpo elemental -----	16
Figura 6. Análisis de secuencia de OmpA -----	17
Figura 7. Modelo de la composición del aparato T3SS clamidial -----	23

Figura 8. Patogenia del AEPR. Acontecimientos ocurridos en el epitelio coriónico materno y fetal -----	29
Figura 9. Determinación de la localización de la PR -----	57
Figura 10. Inducción de <i>E. coli</i> BL21-pLATE/ompACa -----	58
Figura 11. Western blot para la identificación de etiqueta de histidinas de la PR en cuerpos de inclusión -----	59
Figura 12. Western blot para la identificación de etiqueta de histidinas de la PR producida durante la inducción de <i>E. coli</i> BL21-pLATE/ompACa -----	60
Figura 13. rOmpA purificada por cromatografía de afinidad -----	61
Figura 14. Western blot para el reconocimiento de la proteína recombinante purificada -----	62
Figura 15. Western blot de la cepa BL21- pLATE/ompA inducida, enfrentada a pool de sueros positivos a cultivo celular -----	63
Figura 16. Western blot de rOmpA enfrentado a sueros de cabras positivas a <i>C. abortus</i> por cultivo celular -----	64
Figura 17. Western blot de rOmpA enfrentado a sueros de cabras negativas a <i>C. abortus</i> por cultivo celular -----	64

ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEPR	Aborto enzoótico de los pequeños rumiantes
Ag	Antígeno
ARN-r	Ácido ribonucleico ribosomal
AT	Autotransportador
ATP	Adenosin trifosfato
CA	Cuerpos aberrantes
CE	Cuerpo elemental
cHsp	Proteínas de choque térmico clamidiales
CI	Cuerpo intermedio
COMC	Complejo clamidial de membrana externa
CPA	Célula presentadora de antígeno
CPAF	Factor de actividad similar a proteasa clamidial
CR	Cuerpo reticular
CS	Secuencia constante
DIVA	Diferenciación de animales vacunados e infectados
DO	Densidad óptica
DOF	Diario Oficial de la Federación
ELISA – I	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima indirecto
FC	Fijación del complemento
GAG's	Glicosaminoglicanos
GLXA	Exoantígeno glicolipídico
hpi	Horas post-infección
HS	Heparán sulfato
Hsp	Proteína de choque térmico
IDO	Indoelamina 2,3-dioxigenasa

IFN- γ	Interferón gamma
IL	Interleucina
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
KDO	Ácido ceto-3-desoxi-2 octulosónico
LB	Caldo de lisogenia
LPS	Lipopolisacárido
ME	Membrana externa
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MHC I y II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II
MZN	Ziehl – Neelsen modificada
NADPH	Nicotidamida adenina dinucleótido fosfatasa
NET's	Trampas extracelulares de neutrófilos
NF-T3SS	Sistema de secreción no flagelar tipo III
NF κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	<i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
Omc	Proteínas ricas en cisteína
OmpA	Proteína principal de membrana externa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE ₂	Prostaglandina E2
PMP	Polimorfonucleares
Pmp	Proteína polimórfica de membrana
PR	Proteína recombinante
rADN	Ácido desoxirribonucleico recombinante
rOmpA	Proteína principal de membrana externa recombinante
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
T5SS	Sistema de secreción tipo V

TarP	Fosfoproteína de reclutamiento de actina
TD	Translocador
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocito T regulador
UA	Unidades de absorbancia
VS	Secuencia variable
WB	Western blot

RESUMEN

QUIROGA VENTOLERO DIANA BERENICE. Desarrollo de una ELISA indirecta usando una proteína recombinante de *Chlamydia abortus* como antígeno, como prueba diagnóstica en caprinos (bajo la asesoría de Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dra. Laura Cobos Marín y Dr. Rigoberto Hernández Castro).

Chlamydia abortus es uno de los principales agentes causales de aborto infeccioso en pequeños rumiantes, generando pérdidas económicas en la industria pecuaria a nivel mundial. Actualmente la clamidiosis en caprinos es considerada una enfermedad endémica en México; sin embargo, no existen en el mercado pruebas diagnósticas a precio accesible y de origen nacional, de ahí la necesidad de desarrollar técnicas diagnósticas sensibles y específicas que permitan la identificación y el control de la enfermedad. Entre los desafíos que representa la implementación de técnicas diagnósticas, se destaca la dificultad del aislamiento del agente etiológico; así como la purificación de los antígenos directamente de la bacteria, debido a que se requiere de cultivo celular para su crecimiento y multiplicación. Este trabajo tiene como objetivo la obtención de un antígeno proteico recombinante de *C. abortus*, para establecer y evaluar una prueba de ELISA indirecta para el diagnóstico de la clamidiosis en caprinos empleando la proteína mayor de la membrana externa de *C. abortus* recombinante (OmpA), expresada en *Escherichia coli* BL21. La expresión de la proteína se realizó con la inducción de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido en concentración de 1.5 mM y se obtuvo la sobreexpresión de la proteína de ~38 kDa. La proteína recombinante se recuperó de la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), se purificó mediante cromatografía de afinidad y se identificó con Western blot usando un anticuerpo contra la etiqueta de histidinas (anti-6xHis) y se verificó su inmunorreactividad con sueros de animales confirmados como positivos a *C. abortus* mediante el aislamiento de la bacteria. Se estandarizó la ELISA indirecta; sin embargo, no fue posible establecer el punto de corte, por no contar con el número de sueros suficientes

Palabras clave: *Chlamydia abortus*, rOmpA, proteína recombinante, ELISA indirecto

ABSTRACT

QUIROGA VENTOLERO DIANA BERENICE. Development of an indirect ELISA using a recombinant protein of *Chlamydia abortus* as antigen, as a diagnostic test in goats (Advisors: Dr. Efrén Díaz Aparicio, Dr. Laura Cobos Marín and Dr. Rigoberto Hernández Castro).

Chlamydia abortus is one of the main causal agents of infectious abortion in small ruminants, generating economic losses in the livestock industry worldwide. Currently, chlamydiosis in goats is considered an endemic disease in Mexico; however, there are no affordable diagnostic tests of national origin on the market, so it is necessary to develop sensitive and specific diagnostic techniques that allow the identification and control of chlamydiosis. Also, among the challenges posed by the implementation of diagnostic techniques is the difficulty of isolating the etiological agent, as well as the purification of antigens directly from the bacterium, since cell culture is required for its growth and multiplication. Therefore, the objective of this work is to obtain a recombinant protein antigen of *C. abortus*, to establish and evaluate an indirect ELISA test for the diagnosis of chlamydiosis in goats. The recombinant antigen is the major outer membrane protein of *C. abortus* (OmpA), expressed in *Escherichia coli* BL21. Protein expression was performed with induction of isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside at 1.5 mM concentration and overexpression of ~38 kDa protein was obtained. The recombinant protein was recovered from the insoluble fraction (inclusion bodies), purified by affinity chromatography and identified by Western blot using an antibody against histidine tag (anti-6xHis) and verified for immunoreactivity with sera from *C. abortus* positive animals by cell culture. Indirect ELISA was standardized; however, it was not possible to establish the cut-off point, due to not having enough sera.

Key words: *Chlamydia abortus*, rOmpA, recombinant protein, indirect ELISA

INTRODUCCIÓN

1. ABORTO ENZOÓTICO DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES (AEPR)

Chlamydia abortus es el agente causal del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR). Anteriormente llamada *Chlamydia psittaci* tipo I o *Chlamydophila abortus* (Andersen, 1991; Everett et al., 1999). La enfermedad se describió por primera vez en Escocia en 1936 (Greig, 1936), aunque su agente etiológico no se identificó hasta 1950 (Stamp et al., 1950). Es una enfermedad de distribución mundial, siendo la principal causa de aborto infeccioso en pequeños rumiantes en países como Reino Unido (Aitken, 2000), Países bajos (van den Brom et al., 2012), Alemania (Runge et al., 2012) y España (Navarro et al., 2009).

En México, la enfermedad se ha estudiado desde 1996, cuando se informó el aislamiento de *Chlamydia abortus*, en infecciones subclínicas entéricas en rebaños de ovejas de cinco Estados del país (Escalante et al., 1996), en 1997 se informó del primer aislamiento en un aborto caprino (Escalante et al., 1997) y fue en 2001 cuando se informó de infecciones en humanos con *Chlamydia* spp., a partir de ganado caprino (Escalante et al., 2001). También se ha identificado al microorganismo mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de hisopos vaginales, en rebaños ovinos con historial de abortos en el Estado de México (Jiménez et al., 2008), y en rebaños caprinos del Estado de Guanajuato (Campos et al., 2014; Mora et al., 2015) adicionalmente se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra este agente en equinos del Estado de México y de la Ciudad de México (Rubio et al., 2017).

A pesar de estas investigaciones, la enfermedad se encontraba clasificada según lo publicado en el Diario Oficial de la Federación, en el grupo 1 del “Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria”. Este grupo, está compuesto por las enfermedades y plagas que no se encuentran en el territorio nacional (DOF, 1999). A partir del 29 de noviembre de 2018 ha sido reclasificada y publicada en el DOF, dentro del grupo 3, el cual está constituido por aquellas enfermedades y plagas que se encuentran presentes en el territorio nacional y son consideradas como endémicas (DOF, 2018).

2. TAXONOMÍA DEL ORDEN CHLAMYDIALES

La clasificación actual del orden *Chlamydiales*, está establecida en el Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (Ed. Springer, Nueva York, 2011), donde se da a conocer la división en familias:

Chlamydiaceae, *Clavichlamydiaceae*, *Criblamydiacidae*, *Parachlamydiaceae*, *Piscichlamydiaceae*, *Rhabdochlamydiaceae*, *Simkaniaceae* y *Waddliaceae* (Kuo et al., 2011; Sachse et al., 2015).

De las ocho familias que integran el orden, la familia *Chlamydiaceae* es la que mayor interés produce desde el punto de vista médico y veterinario, ya que los microorganismos de las otras familias tienen como hospedadores principalmente a invertebrados, peces y plantas. La clasificación de los miembros de la familia *Chlamydiaceae* se basa en el análisis filogenético de las secuencias ARNr 16S, separando así, sus miembros de las demás bacterias (Storz y Page, 1971).

En 1999 Everett et. al., hicieron una nueva clasificación de la familia *Chlamydiaceae*, incluyendo en el análisis genético de la subunidad 23S del ARNr; demostrando así, que dicha familia agrupaba dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*, y la existencia de nueve especies diferentes. Si bien la extensión de especies fue ampliamente aceptada por la comunidad científica, la introducción de dos géneros diferentes fue cuestionada debido a que los umbrales de identidad de las secuencias 16S de ARNr propuesto para otros taxones bacterianos no separan consistentemente a las especies *Chlamydia* de *Chlamydophila*, el genoma de ambos miembros de *Chlamydiaceae* son muy similares, los valores de identidad de la secuencia de ARNr de los miembros conocidos varían de 93.0 % a 99.7 % para el ARNr 16S, y de 91.8% a 99.5 % para el ARNr 23S, los valores de similitud de proteínas conservadas entre los miembros de ambos géneros son del 82 % y además no existen características fenotípicas claras que se distingan entre ellos (Sachse et al., 2015). Por consenso, el género ha sido reunificado en *Chlamydia* integrado por once especies: *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. avium* y *C. gallinacea* (Sachse et al., 2015) con la adición de dos nuevas especies recientemente descritas, *C. avium* (Sachse et al., 2014), así como 'Candidatus *C. ibidis*' (Vorimore et al., 2013)

Las diferentes especies de este género tienen un amplio rango de hospederos y tropismos variables (Beeckman et al., 2014). Causan múltiples enfermedades crónicas y agudas. Entre estas enfermedades se encuentran los trastornos reproductivos, respiratorios, cardiovasculares, gastrointestinales y enfermedades sistémicas; así como conjuntivitis, artritis y encefalitis en humanos, animales de producción, especies de compañía y fauna silvestre (Wheelhouse y Longbottom, 2012; Sachse et al., 2014; Sachse et al., 2015) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características básicas del género *Chlamydia* (Adaptado de Sachse et al., 2015)

	Hospedero natural	Otros hospederos	Sitio de infección
<i>C. abortus</i>	Ovino, caprino	Bovinos, porcinos	Sistema genital y respiratorio
<i>C. avium</i>	Paloma, loro	---	Sistema respiratorio
<i>C. caviae</i>	Cobayo	Equinos	Ocular y sistema reproductor
<i>C. felis</i>	Felino	---	Ocular y sistema Respiratorio
<i>C. gallinacea</i>	Gallina	Aves de corral	Sistema respiratorio
<i>C. muridarum</i>	Roedor	---	Sistema gastrointestinal
<i>C. pecorum</i>	Bovino, koala	Ovinos, caprinos, porcinos	Sistema gastrointestinal, respiratorio y genital
<i>C. pneumoniae</i>	Humano, equino, koala	Anfibios, reptiles	Sistema respiratorio y cardiovascular
<i>C. psittaci</i>	Aves	Mamíferos	Sistema respiratorio
<i>C. suis</i>	Porcino	Rumiantes	Sistema gastrointestinal y genital
<i>C. trachomatis</i>	Humano	---	Ocular

2.1 *Chlamydia abortus*

Chlamydia abortus es el agente causal del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes (AEPR). Es una bacteria que posee una pared celular similar a la pared de las Gram negativas, sin embargo, carece de péptidoglicano, probablemente como consecuencia de la adaptación a la vida intracelular (Kosma, 1999). Debido a su aparente inhabilidad de producir ATP, este microorganismo depende del metabolismo de células hospederas para su multiplicación (Moulder, 1991).

Chlamydia abortus incluye cepas causantes de abortos, principalmente en pequeños rumiantes, pero también en bovinos (Blumer et al., 2011) y porcinos (Salinas et al., 2012), acompañados en algunos casos de esterilidad (Papp et al., 1993), así como posibles casos de epididimitis, artritis, conjuntivitis y neumonía (Rodolakis y Laroucau, 2015). Además, se debe considerar el riesgo zoonótico que representa, sobre todo para mujeres embarazadas en áreas rurales (Rodolakis y Mohamad, 2010) en las que puede causar abortos y septicemia grave tras la inhalación de aerosoles infecciosos (Pospischil et al., 2002; Walder et al., 2005). Junto a *Brucella melitensis*, constituye una de las principales causas de aborto infeccioso en pequeños rumiantes en prácticamente cualquier región del mundo donde se críe este tipo de ganado, con excepción de Australia y Nueva Zelanda (Rodolakis y Laroucau, 2015). Por otro lado, aunque los hospedadores habituales de *C. abortus* son mamíferos, esta bacteria se ha aislado en seis especies diferentes de aves marinas (Herrmann et al., 2000). Además, se han descrito casos de aborto clamidial en mujeres embarazadas (Buxton, 1986; Pospischil et al., 2002; Walder et al., 2005).

Las diferentes cepas de *C. abortus* son muy homogéneas entre sí desde el punto de vista fenotípico (Vretou et al., 1996), antigénico (Salinas et al., 1995) y genómico (Laroucau et al., 2009). Solo tres cepas: dos griegas LLG y POS (Siarkou et al., 2002) y la francesa AB16 (Laroucau et al., 2000) presentan diversidad antigénica en sus proteínas polimórficas de membrana (Pmp) (Vretou et al., 1996; Laroucau et al., 2000), difieren en la morfología de las inclusiones intracitoplasmáticas y reaccionan de forma diferente al ser expuestas a anticuerpos monoclonales contra la proteína principal de la membrana externa (OmpA) (Vretou et al., 2001). Además, estas tres cepas difieren del resto en cuanto a su virulencia (Bouakane et al., 2003), lo que sugiere que las Pmp juegan un papel importante en esta característica en *C. abortus*. Un avance importante en el campo de la investigación de *C. abortus* se produjo en 2005, cuando se publicó la secuencia genómica completa de este microorganismo lo que

ha supuesto una valiosa herramienta que permite abordar estudios que están ampliando el conocimiento sobre los mecanismos moleculares e inmunopatológicos de las infecciones clamidiales (Thomson et al., 2005).

3. CICLO DE DESARROLLO

3.1 GENERALIDADES

Las bacterias del orden *Chlamydiales* son microorganismos intracelulares obligados, es decir, que no poseen la capacidad de multiplicarse fuera de una célula eucariota hospedera, ya que necesitan obtener de ellas los compuestos energéticos y los metabolitos intermedios para la síntesis de su material genético y proteínas. Se distingue de otras bacterias intracelulares obligadas porque su crecimiento se asocia a un ciclo de desarrollo bifásico único entre procariontes, con dos formas distintas: el **cuerpo elemental (CE)** y el **cuerpo reticular (CR)**. Cada una de estas posee una composición, estructura y biología particular que está intrínsecamente relacionada con las funciones que desempeña en las distintas fases del ciclo de desarrollo (Longbottom y Coulter, 2003)

El CE es la forma extracelular metabólicamente inactiva e infecciosa, con una alta capacidad de adhesión y penetración en las células del hospedero, con el objetivo de permitir la diseminación de la infección entre células susceptibles. Tras la infección, los CE's son internalizados en vacuolas llamadas **inclusiones intracitoplasmáticas**. En estas inclusiones, los CE's se diferencian a CR, que es la forma metabólicamente activa. En esta fase el CR se multiplica repetidas veces por fisión binaria hasta que, entre las 48 y 72 horas post-infección, se produce una rediferenciación a CE, seguido de una lisis de la inclusión y la célula hospedera. Esto libera gran cantidad de CE, que infectarán a las células adyacentes, iniciando un nuevo ciclo (Abdelrahman y Belland, 2005).

Se ha observado que el ciclo normal de desarrollo se ve interrumpido bajo el efecto de citocinas como el IFN- γ (Shemer y Sarov, 1985; Beatty et al., 1993; Summersgill et al., 1995; Brown et al., 2001), ciertos antibióticos como la penicilina (Hogan et al., 2004), la privación de factores nutricionales como el triptófano (Coles et al., 1993) y en modelos *in vitro* en coinfecciones de *C. abortus* con el virus de la diarrea epidémica porcina (Stuedli et al., 2005), lo que ocasiona la aparición de cuerpos reticulares anormales también llamados, **cuerpos aberrantes (CA)**, incapaces de reorganizarse a CE (Hogan et

al., 2004). El efecto de estos factores inductores de los CA es reversible, ya que cuando se eliminan los CA se diferencian a CE normales. Los CA permanecen en el interior de la célula como agentes infecciosos latentes y se han asociado con la presencia de recidivas en las presentaciones crónicas y a la dificultad de la eliminación total del microorganismo (Figura 1) (Beatty et al., 1994; McKuen et al., 2013).

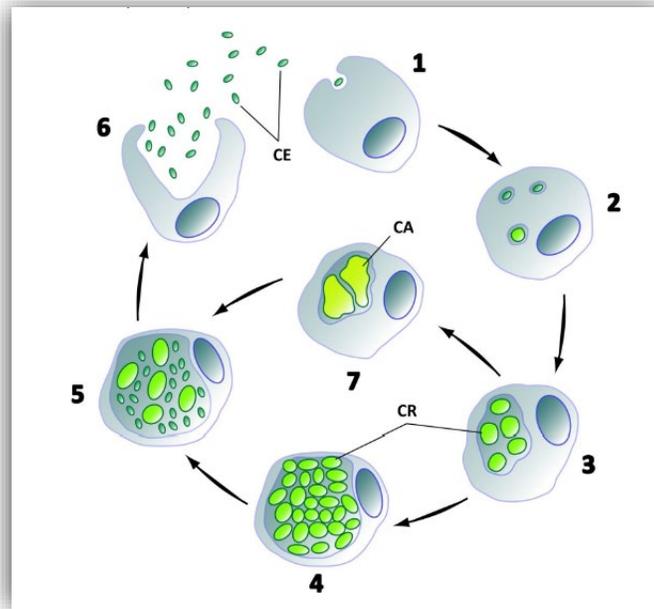


Figura 1. Ciclo de desarrollo de *Chlamydia*. 1. Adhesión y penetración en la célula hospedadora; 2. Diferenciación primaria (CE a CR); 3. División de los CR; 4. Multiplicación de CR y expansión de la inclusión clamidial; 5. Diferenciación secundaria (CR a CE); 6. Liberación de los CE; 7. Desarrollo de cuerpos aberrantes (CA) (persistencia). (Murcia, 2019).

3.2 CUERPO ELEMENTAL

3.2.1 Estructura

Mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) se puede observar que los CE son partículas esféricas de entre 0.2 – 0.3 μm de diámetro, en su interior se aprecia un nucleoide electrodenso, con numerosos ribosomas, además de material amorfo moderadamente electrodenso (Figura 2) (Matsumoto, 1988). Se han descrito dos proteínas responsables de la compactación del nucleoide de los CE. Hc1 y Hc2, codificadas por los genes *hctA* y *hctB* respectivamente, que tienen una actividad similar a la de histonas en células eucariotas (Brickman et al., 1993). Exteriormente el CE está rodeado

por una doble envoltura trilaminar, compuesta por una membrana interna o membrana citoplasmática, y una membrana externa, mejor conocida como COMC (por sus siglas en inglés *Chlamydial Outer Membrane Complex*). El COMC está formado por una red de proteínas ricas en aminoácidos azufrados unidos entre sí por puentes disulfuro intra e intermoleculares, responsables de su rigidez y escasa permeabilidad, lo que le confiere estabilidad en el medio externo y cierta resistencia a agentes fisicoquímicos y a estrés osmótico (Hatch, 1996).

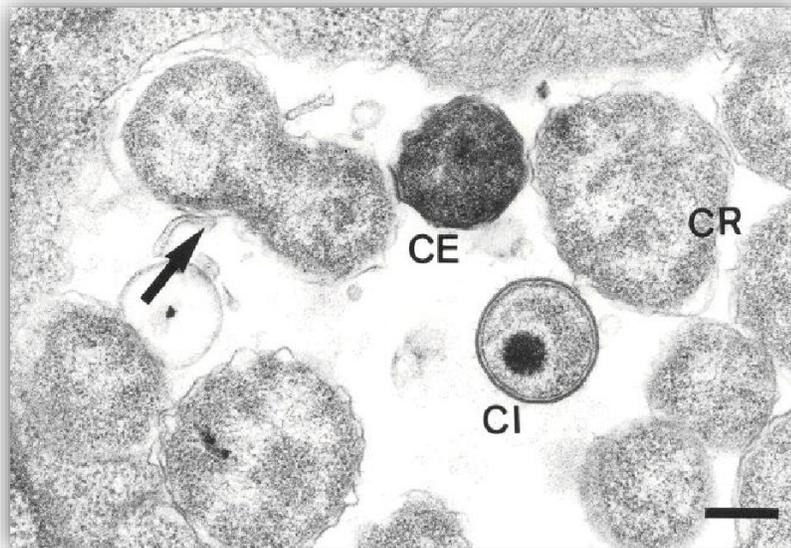


Figura 2: Electronografía de las diferentes formas clamidiales. Cuerpo elemental (CE), cuerpo intermedio (CI) y cuerpo reticular (CR), uno de ellos en fisión binaria (flecha). Barra: 0,25 μm . (Álvarez, D. 2018).

3.2.2 Adhesión y penetración a la célula del hospedero

El género *Chlamydia*, como microorganismos intracelulares obligados, han desarrollado, sistemas de adhesión y penetración a la célula hospedera. De manera general, se ha considerado a los CE como un elemento inerte que tienen un papel pasivo durante el ciclo de desarrollo. Sin embargo, estudios de genómica y proteómica, sugieren que los CE pueden ser también metabólicamente activos (Omsland et al., 2012) y producir una serie de proteínas específicas que juegan un papel activo durante la adhesión y penetración en la célula del hospedador (Clifton et al., 2004; Albrecht et al., 2011; Saka et al., 2011; Skipp et al., 2016). La capacidad de infectar distintos tipos celulares de diferentes especies indica que las adhesinas implicadas en el proceso reconocen receptores celulares conservados, pero

a pesar de la importancia de esta interacción para el estudio de la patogenia de la clamidiosis, todavía no se conocen todos los mecanismos involucrados en la misma (Abdelrahman y Belland, 2005). Las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* carecen de estructuras asociadas a la adherencia como la cápsula o las fimbrias, por lo que su pared juega un papel fundamental en este mecanismo. Algunas de las moléculas que participan en el proceso de adhesión son: proteína rica en cisteína B (OmcB), proteína principal de membrana externa (OmpA), proteínas polimórficas de membrana externa (Pmp), ligooligosacárido (LOS), proteína de choque térmico 70 (Hsp70) (Becker y Hegemann, 2014; Hegemann y Moelleken, 2012; Osaka y Hefty, 2014), así como glicosaminoglicanos; todas ellas presentes en el complejo de membrana externa clamidial (COMC) de los CE (Figura 3) (Gutierrez-Martin et al., 1997).

Se ha demostrado que el primer contacto entre los CE y las células hospedadoras se produce por interacciones electrostáticas entre las proteínas OmcB de la bacteria y glicosaminoglicanos tipo heparán sulfato de la célula hospedera (Su et al., 1996; Moelleken y Hegemann, 2008).

Posteriormente, la internalización de los CE se realiza debido a cambios en el citoesqueleto de actina de la célula hospedera (Carabeo et al., 2002), proceso que depende de factores procedentes de la bacteria y de la propia célula. La adhesión de la bacteria a la célula desencadena una cascada de reacciones que conducen a alteraciones en los reguladores de actina de la célula (Elwell et al., 2008). Al mismo tiempo, los CE secretan proteínas efectoras que modifican el citoesqueleto de la célula antes de su penetración a la misma. Una de las más estudiadas es la fosfoproteína TarP (Clifton et al., 2004), secretada por el T3SS que interactúa con el citoesqueleto de actina (Figura 3). La proteína TarP ha sido detectada en la porción citoplasmática de la membrana celular, cuando los CE están en la parte externa, confirmando de esta manera la presencia de un T3SS funcional en los CE. Igualmente, la proteína TarP, ha sido propuesta junto a la familia de proteínas Pmp como posible determinante de la especificidad y tropismo por ciertos tejidos que tienen los miembros de la familia *Chlamydiaceae* (Lutter et al., 2010). Una vez adheridos, los CE son fagocitados e incluidos en la célula hospedera en vacuolas citoplasmáticas rodeadas por membranas derivadas de la membrana plasmática de la célula infectada. *Chlamydia* es capaz de modificar las propiedades de la inclusión citoplasmática, retrasando su maduración y manteniéndola en las vías tempranas de la vía endocítica (Hackstadt et al., 1999), para evitar su fusión con lisosomas. Este fenómeno no ocurre cuando la célula infectada es un neutrófilo, por su gran capacidad de formar fagolisosomas (Register et al., 1986) teniendo un papel fundamental en la respuesta inmunitaria durante los primeros estadios de la infección clamidial

(Buendia et al., 1999). Sin embargo, la acción de los PMN se limita a las primeras 48 a 72 horas postinfección (pi), tiempo en el que las bacterias colonizan rápidamente otras poblaciones celulares (Barteneva et al., 1996).

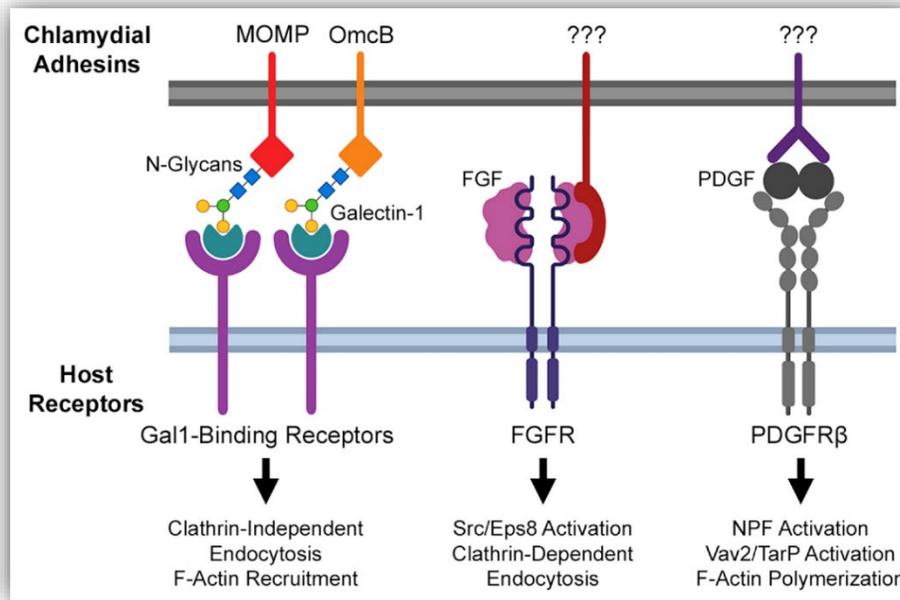


Figura 3. Interacciones conocidas de adhesinas de clamidia y receptores del hospedero (Caven y Carabeo. 2020).

Tras penetrar en la célula la inclusión clamidial se transporta utilizando el sistema de microtúbulos de la célula hospedera a la región perinuclear, manteniéndose cerca del aparato de Golgi, donde se fusiona con vesículas que contienen esfingomielina (Hackstadt et al., 1996), colesterol (Carabeo et al., 2003) y otros lípidos de origen eucarionte que serán necesarios para la replicación, el crecimiento y estabilidad de la membrana de la inclusión, la rediferenciación de CR a CE, y si es el caso, la reactivación del estado de persistencia (Elwell y Engel, 2012).

3.3 CUERPO RETICULAR

3.3.1 Estructura

El CR posee un diámetro de entre 0.5 y 1 μm , es la forma intracelular, sin capacidad infecciosa y metabólicamente activa, producto de la diferenciación de los CE (Figura 2) (Longbottom y Coulter, 2003). En su interior se aprecia un material nuclear fibrilar muy poco denso y una gran cantidad de ribosomas en la periferia, lo que le confiere un aspecto granular y denota una intensa actividad biosintética. Los CR poseen una doble envoltura; una membrana interna o membrana citoplasmática y la membrana externa o pared celular bacteriana. Esta pared celular es más delgada y flexible que la de los CE, lo que la hace permeable al paso de nucleótidos ricos en energía (Bavoil et al., 1984), pero a su vez la vuelve una estructura sensible y osmóticamente frágil, incapaz de sobrevivir a un medio externo (Matsumoto, 1988). En su superficie también se aprecian proyecciones que son parecidas a la estructura del inyectisoma del T3SS, encontradas en los CE, pero en mayor cantidad (Matsumoto, 1982).

A partir de las 10 a las 16 horas postinfección, la mayor parte de los CR se encuentran en alguna fase de división (teniendo un tiempo de duplicación de 2 a 3 horas), momento en el que las bacterias se encuentran en crecimiento exponencial. La multiplicación de los CR tiene lugar dentro de la inclusión intracitoplasmática (Kuo et al., 2011).

Entre las 20 y 25 hpi pueden observarse nuevamente por MET, la presencia de CE en el interior de las inclusiones citoplasmáticas, junto con CR, además de una forma intermedia entre ambas estructuras, que se conoce como **cuerpo intermedio (CI)** (Figura 2), que representa una etapa de transición en la condensación del material nuclear del CR para originar el CE. Esta diferenciación es asincrónica, debido probablemente a variaciones en la expresión de una o varias señales dadas. Actualmente no se conocen con exactitud las señales que desencadenan el proceso de conversión de CR a CE. Lo que se conoce, es que este proceso comienza con una sobre regulación (*up-regulation*) de los genes que codifican las proteínas similares a histonas, con el fin de condensar el material nuclear (Hackstadt et al., 1991). Si bien, no existe un momento exacto para la finalización del ciclo (ya que los CR siguen dividiéndose y diferenciándose en CE, hasta que la célula hospedera no puede soportar la carga clamidial), esto puede ser entre las 48 y 72 hpi y posteriormente ocurre la lisis celular (Kuo et al., 2011).

3.4 INFECCIÓN CRÓNICA. PERSISTENCIA

El término de persistencia puede definirse en microbiología como el resultado alternativo de una infección bacteriana, en el cual una subpoblación de bacterias logra hacerse “invisible” y escapa tanto de la respuesta inmune como de tratamientos antibióticos a largo plazo, sin causar alguna signología, o causando escasos signos que son insuficientes para su diagnóstico (Bavoil, 2014). En este sentido, el AEPR se asocia con estados de infección crónicos en los que los hospedadores alternan periodos de enfermedad clínica con periodos aparentemente asintomáticos y existen evidencias claras que sugieren que *Chlamydia* es capaz de entrar en estado de **latencia** o **persistencia**, asociado con procesos crónicos en el hospedador (Hogan et al., 2004). Diversos estudios del estado de persistencia clamidial *in vitro* coinciden en que las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* adquieren una estructura de CA, con apariencia semejante a los CR, pero pleomórficos y de mayores dimensiones (Figura 4). Además, presentan características de crecimiento alteradas, tales como incapacidad de diferenciación de CE e inhibición de división por fisión binaria (aunque siguen replicando su cromosoma). Estos CA son los que permanecen de forma inactiva en el interior del organismo infectado, pudiendo reactivarse posteriormente (Hogan et al., 2004; Wyrick, 2010; Schoborg, 2011).

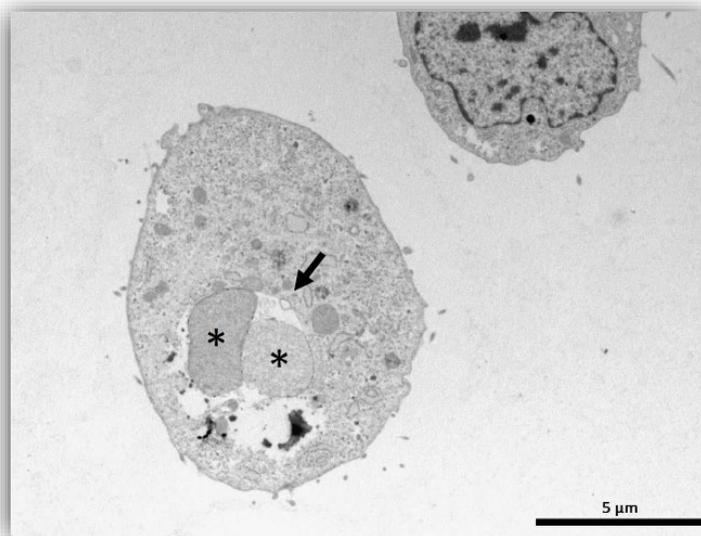


Figura 4. Electronografía de un cultivo de *Chlamydia* tratado con penicilina. La inclusión intracitoplasmática (flecha) contiene dos cuerpos reticulares anormalmente grandes, compatibles con cuerpos aberrantes (asteriscos). Barra: 5 μm. (Álvarez D., 2018).

Varios estudios *in vitro* indican que existen diferentes sistemas de inducción de estos CA, entre los cuales se encuentran:

- a) **Adición de antibióticos.** La adición de antibióticos tales como la eritromicina, ampicilina o penicilina al medio a partir de las 12 hpi, impide la reconversión de los CR a CE y promueve la aparición de pequeñas inclusiones en las células infectadas con CA en su interior. Los CA desaparecen al suprimir la presencia de antibióticos en el medio. Esto sugiere que una inadecuada terapia antimicrobiana puede permitir el mantenimiento de la infección clamidial persistente (Hogan et al., 2004).
- b) **Depleción de nutrientes.** La falta de nutrientes esenciales en el medio como aminoácidos (Coles et al., 1993), glucosa (Harper et al., 2000) o hierro (Raulston, 1997) da lugar a la aparición de formas aberrantes que desaparecen con la adición al medio del nutriente en cuestión (Kelder et al., 1996). Se ha establecido la hipótesis de que las fluctuaciones de hierro en el organismo debidas a la influencia de estradiol en el endometrio pueden influir en la persistencia clamidial *in vivo* (Kelder et al., 1996).
- c) **Adición de citocinas.** La exposición de cultivos celulares a diversas citocinas, principalmente IFN- γ , induce infecciones persistentes (Shemer y Sarov, 1985; Beatty et al., 1993; Summersgill et al., 1995; Brown et al., 2001). El mecanismo principal por el que esto ocurre es la activación de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) por IFN- γ , la cual degrada el triptófano (Byrne et al., 1986). Así, es una forma indirecta de depleción de un aminoácido esencial para el desarrollo del ciclo de multiplicación clamidial. La adición de triptófano al medio revierte el estado de persistencia. Otras citocinas como el TNF (Summersgill et al., 1995) y la IL-1 (Carlin y Weller, 1995) ejercen un efecto sinérgico al del IFN- γ sobre el crecimiento de *Chlamydia*.
- d) **Hormonales.** Las hormonas esteroideas, incluido el β - estradiol, también pueden mediar en los fenómenos de persistencia de *Chlamydia* a través de la IL-10, ya que parece existir una correlación entre los niveles de estas hormonas y de IL-10 durante las infecciones clamidiales (Kaushic et al., 2000).
- e) **Otros.** Se han observado formas de persistencia *in vitro* utilizando sistemas menos estudiados que los anteriores, por ejemplo, Koehler et al. (1997) observaron cómo *Chlamydia* adquiría características propias de persistencia (organismos viables, pero no cultivables) de forma espontánea, al infectar cultivos primarios de monocitos. También se han observado CR

anormalmente grandes en cultivos de *C. psittaci* infectados por bacteriófagos (Hsia et al., 2000), así como subpoblaciones de CA pleomórficos junto a CE y CR normales en cultivos continuos de *C. pneumoniae* no expuestos directamente a agentes estresantes (Kutlin et al., 2001).

3.5 LIBERACIÓN BACTERIANA

Hacia el final del ciclo de desarrollo una inclusión clamidial puede llegar a contener cientos de clamidias, ocupando prácticamente todo el citoplasma de la célula hospedera. Este ciclo de desarrollo finaliza con la lisis de la célula hospedera, normalmente entre las 48 y 72 horas tras el comienzo del ciclo. El mecanismo exacto de liberación no se conoce con exactitud, aunque se han postulado dos vías independientes y exclusivas entre sí, se ha observado que ocurren con la misma frecuencia en modelos *in vitro* (Hybiske y Stephens, 2007). La primera es una exocitosis lenta de la inclusión que deja a la célula hospedera intacta, mecanismo que se ha conservado en todo el género *Chlamydia* (Zuck et al., 2016); y la segunda vía, se refiere a una lisis de la inclusión intracitoplasmática, seguida de una lisis de la célula hospedera mediada por proteasas, mecanismo regulado por el gen *Pgp4* (Yang et al., 2015).

4. ESTRUCTURA ANTIGÉNICA

El orden *Chlamydiales* comprende un gran número de microorganismos relacionados tanto estructural como antigénicamente. Las bacterias de la familia *Chlamydiaceae* poseen una estructura antigénica compleja localizada en la pared celular, que de acuerdo con su naturaleza se pueden estudiar en dos grupos: glicolipídicos y proteicos (Henderson et al., 2004; Villegas et al., 2008).

4.1 ANTÍGENOS GLICOLIPÍDICOS

4.1.1 Lipopolisacárido

El lipopolisacárido (LPS), se encuentra localizado en la membrana externa de la bacteria y es el segundo antígeno de mayor importancia. Se compone de un glicolípido que es compartido por todas las especies de clamidias; por lo que constituye un epítipo específico de género (Kosma., 1999). El LPS clamidial es termoestable y consta de tres componentes principales: una porción lipídica (lípidico A), un núcleo oligosacárido compuesto por glucosa, heptulosa, galactosa, glucosamina y ácido cetó-3-desoxi-2-octulosónico (KDO) y una parte final que es muy variable, de naturaleza polisacárida llamada “antígeno O” (Martínez., 2006). En la cepa AB7 de *C. abortus*, se describió la localización del LPS, encontrándose en la zona externa de los CR, mientras que en CE se encuentra en la porción interna (Salinas et al., 1994), lo que puede explicar que, durante la respuesta inmunitaria humoral, los anticuerpos anti-LPS no confieran protección (Sandbulte et al., 1996).

4.1.2 Glicolípido soluble

Antígeno específico de género, también conocido como “exoantígeno glicolípido” (GLXA). Ha sido aislado de sobrenadantes de cultivos infectados por *C. trachomatis*, demostrando que se secreta durante la fase de la infección clamidial colaborando con la invasión a la célula hospedera (Vora y Stuart, 2003).

Sus componentes polisacárido y lipídico confieren actividad antigénica, y se ha demostrado que se encuentran en la membrana bacteriana y pueden ser liberados al microambiente celular y expresarse en la superficie de células infectadas, facilitando la infección de células vecinas (Webley et al., 2004).

4.2 ANTÍGENOS PROTEICOS

Se conoce como Complejo de Membrana Externa Clamidial o COMC (por sus siglas Chlamydial Outer Membrane Complex) al conjunto de proteínas que forman parte de la membrana externa que rodea a los CE. El COMC está formado por una red de proteínas ricas en aminoácidos azufrados que se unen entre sí por puentes disulfuro intra e intermoleculares, que aporta una gran rigidez y escasa permeabilidad a los CE (Hatch, 1996), lo que le confiere estabilidad en el medio externo y cierta

resistencia a agentes físico-químicos y a estrés osmótico (Figura 5) (Caldwell et al., 1981). A continuación se describen diversas proteínas que forman parte del COMC.

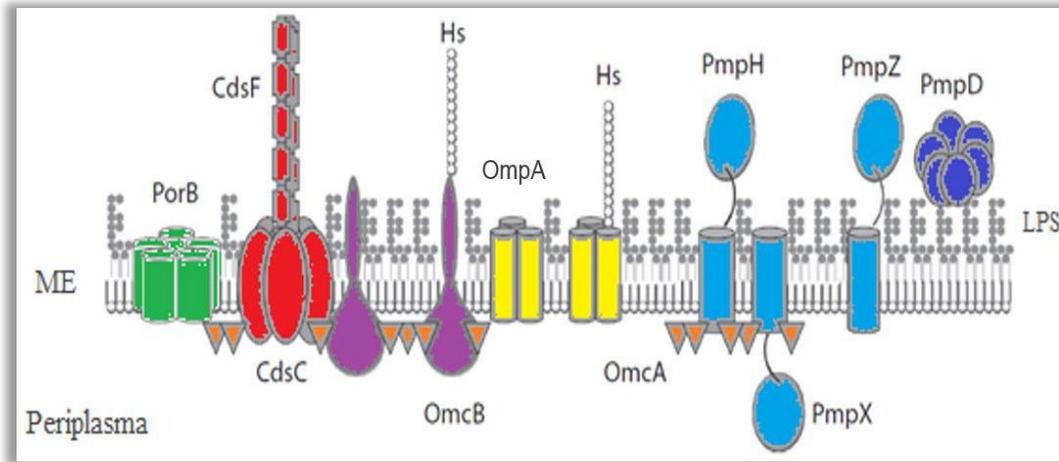


Figura 5. Modelo de la membrana externa de un cuerpo elemental. ME = Membrana externa, PorB = Porina B, CdsF y CdsC = Proteínas del SST3, OmpA, OmcB, OmcA = Proteínas del COMC, PmpH, PmpX, PmpD, PmpZ = proteínas poliméricas, LPS= Lipopolisacárido Hs= Proteínas de choque térmico. (Modificado de Nelson, 2012).

4.2.1 Proteína principal de membrana externa (OmpA)

Codificada por el gen *ompA*, la proteína principal de membrana externa (OmpA) tiene un peso molecular de entre 38 y 40 kDa y representa el 60% de la masa proteica del COMC (de la Maza, 2002; Caldwell H et al., 1981).

4.2.1.1 Características estructurales

Tiene una estructura de β -barril antiparalelo de 16 cadenas, sus giros β se extienden desde la región periplásmica y se amplían más allá de la superficie celular, en donde se han detectado regiones de dominio variable (Feher et al., 2013). Por medio de secuenciación se ha demostrado que la proteína posee cuatro dominios variables (VS1-4) y cinco dominios constantes (CS 1-5) (Figura 6). La variabilidad de las secuencias ha sido considerada como un mecanismo para que las bacterias escapen del sistema inmunológico de hospedador, también proporcionando especificidad hacia el tropismo celular (Atanu et al., 2013).

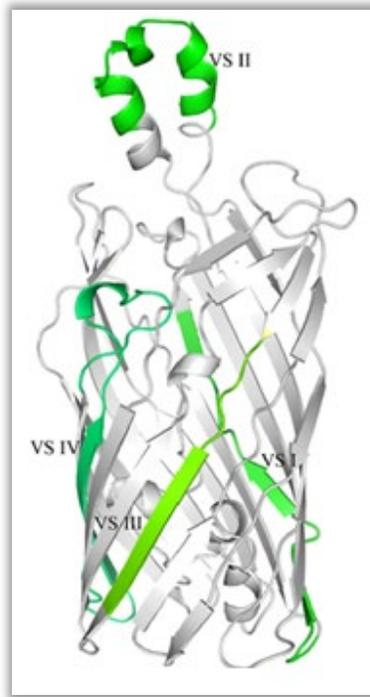


Figura 6. Análisis de la estructura terciaria de la secuencia de OmpA. Los cuatro dominios variables (VS) intercalados entre los cinco dominios constantes. (NCBI, 2018)

La proteína OmpA no se ancla de manera covalente al péptidoglicano y esto confiere su actividad de porina (Findlay et al., 2005), también tiene actividad de adhesina mediante interacciones electrostáticas e hidrofóbicas no específicas con la célula hospedera (Su et al., 1996). Contiene de 8 a 10 residuos de cisteína según la especie de *Chlamydia* spp (Hepler et al., 2018) y se ha demostrado que estos residuos forman enlaces disulfuro intermoleculares, formando monómeros y trímeros, e intramoleculares con otras proteínas ricas en cisteína, lo que aumenta la rigidez estructural de la membrana externa (Newhall y Jones., 1983; Yen et al., 2005).

De manera general, la estructura de la proteína está mucho más conservada que su secuencia y a medida que las especies divergen, hasta un punto donde no existe similitud detectable entre secuencias, aunque siguen compartiendo los mismos pliegues estructurales. Todas estas secuencias divergentes comparten características estructurales fuertemente conservadas, dentro de las que se incluyen: 1) número par de hebras transmembranales antiparalelas; 2) una abundancia relativamente alta de pequeños residuos hidrofóbicos en el centro de los filamentos transmembranales frente a los

membranales y; 3) porciones de residuos aromáticos en las interfaces de membrana (Sun G, et al 2007).

4.2.1.2 Función y contexto biológico

Inicialmente se ha demostrado que la unión transitoria del CE es una interacción electrostática mediada por heparán sulfato. El heparán sulfato se requiere para la invasión de diversas serovariedades de *Chlamydia* y debido a su fuerte carga negativa permite la unión a las proteínas de superficie bacteriana tales como OmpA y es un mecanismo que se ha propuesto para la unión temprana del CE con la célula hospedera, mediante la formación de un “puente molecular” entre el heparán sulfato (HS), OmpA y GAG bacteriano. También se ha demostrado que OmpA se une a GAG para mediar la invasión bacteriana (Campbell et al., 2006). En células epiteliales OmpA se une al receptor de HS, que generalmente se encuentra anclado covalentemente a la membrana plasmática y posee ectodominios de proteoglicanos. Estos proteoglicanos de HS se unen a un amplio espectro de ligandos celulares que incluyen factores de crecimiento, enzimas lipolíticas, inhibidores de proteasas y reguladores transcripcionales, aunque a la par funcionan como receptores para una variedad amplia de agentes infecciosos. Se ha demostrado que la bacteria no se internaliza después de la unión de OmpA a la célula diana, lo que indica una función principal en la adherencia y por lo tanto OmpA puede mediar solo un paso inicial de unión reversible para promover otras interacciones que pueden desencadenar la internalización real, como son la interacción de las proteínas polimórficas de membrana (Su et al., 1996).

La antigenicidad de los epítomos de OmpA se ha demostrado mediante clonación y expresión de porciones de la proteína o mediante el uso de péptidos sintéticos y se ha observado que los péptidos VS1 son capaces de detectar respuestas serológicas específicas de serovariedades, y de manera contradictoria se detecta poca reactividad para la región más variable de secuencia que es VS2. A pesar de esto se ha demostrado que los péptidos VS1 y VS2 son inmunogénicos (Zhong et al., 1994; Birk et al., 2013). Es conocido que OmpA puede modular la actividad de macrófagos, linfocitos T CD4+ y el tipo de respuesta inmune. Además, se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales contra VS, VS2 y VS4 inhiben la unión a la célula huésped y por lo tanto su internalización, por lo que se concluye que tiene una función de adhesión (Buzoni-Gatel et al., 1990; de Sa et al., 1995).

La conformación de las moléculas de OmpA nativas es crítica para la estimulación de respuestas inmunes protectoras. Se han realizado múltiples experimentos en modelo murino para conocer la

respuesta inmune que se desarrolla ante la vacunación con OmpA. Los resultados dicen que rOmpA administrada vía intravaginal no produce respuesta inmunitaria, mientras que de manera intramuscular aumenta la respuesta de manera significativa, mediada por una hipersensibilidad de tipo IV con mayor presencia de citocinas como IFN- γ una mejor respuesta Th1. También se ha experimentado la vacunación con ADN para la proteína OmpA, en donde se obtiene una mejor respuesta de células T cooperadoras, y linfocitos B de memoria, de igual manera se observa una disminución significativa en los signos clínicos (Harkinezhad et al., 2009).

La proteína OmpA es de gran importancia para *Chlamydia abortus*, ya que interviene en la virulencia, adhesión, invasión y evasión de la respuesta inmune del huésped. Es necesario desarrollar más investigación de esta proteína de *C. abortus* y así poder considerarla como una opción para desarrollar técnicas de diagnóstico o vacunas mediante el uso de proteínas recombinantes.

4.2.2 Proteínas ricas en cisteína

La **proteína rica en cisteína A** [OmcA, Omp3, EnvA, CT444 o Small CRP (cysteine-rich protein)] es codificada por el gen *omp3*, que al igual que el gen *omp2*, se transcribe durante la condensación de los CR a CE. Es una lipoproteína de 12 kDa y es el tercer componente más abundante de COMC (Everett y Hatch., 1995; Hatch, 1996).

La **proteína rica en cisteína B** (OmcB, Omp2, EnvB, CT443 o Large CRP) es codificada por el gen *omp2* y su transcripción se relaciona estrechamente con el ciclo de desarrollo, ya que al igual que OmcA, ocurre en el momento de la condensación de los CR a CE (Lambden et al., 1990). Tiene un peso molecular de aproximadamente 70 kDa y es la segunda proteína en abundancia después de OmpA (Everett y Hatch., 1995). Debido a su elevado contenido de aminoácidos azufrados una de sus funciones es estructural (Ting et al., 1995). Los análisis de la proteína OmcB han mostrado que la proteína se encuentra en la superficie de CE y participa en la adhesión a las células epiteliales mediante su primer motivo de unión a heparina XBBXB, que es indispensable para esta unión (Lian et al., 2021). Esta proteína también es un potente inmunógeno, lo que la convierte en un marcador útil para estudios serológicos del género *Chlamydia* (Bas et al., 2001).

4.2.3 Proteínas polimórficas de membrana (Pmp)

Constituyen una familia de proteínas multigénicas, con regiones altamente conservadas de peso molecular de entre 85, 90 y 105 kDa, son ricas en serina y fenilalanina, son polimórficas debido a que sus genes sufren mutaciones que originan variaciones en su estructura, el número de genes de esta familia varía de acuerdo con la especie: hay 18 genes *pmp* en *C. abortus*, 22 genes en *C. psittaci*, 16 en *C. pneumoniae* y 9 en *C. trachomatis*. Estas proteínas contienen motivos tetrapeptídicos conservados; el primero, formado por dos glicinas, una alanina y, en la última posición una isoleucina, leucina o valina, y el segundo es un motivo formado por una fenilalanina, dos aminoácidos variables y una asparagina, ambos en su porción N-terminal (Vasilevsky et al., 2016). También actúan como citolisinas contribuyendo a la rotura de la célula hospedadora y a la salida del CE (Villegas et al., 2008; Marques et al., 2010). Pertenecen al grupo de proteínas autotransportadoras del sistema de secreción tipo V (T5SS) y participan en el proceso de adhesión de la célula hospedadora (Vasilevsky et al., 2016). Tienen una amplia variabilidad inter e intraespecífica. Las más conservadas en *C. abortus* son Pmp H, D, B y A (Van Lent et al., 2016). Inmunológicamente la variación en la expresión de estas proteínas puede desempeñar un papel en la evasión de la respuesta inmune al momento de su ingreso y establecimiento en la célula hospedadora. Las Pmp pueden inducir respuestas inmunes específicas de tipo celular y humoral, haciéndolas potenciales candidatas como antígenos vacunales (Wheelouse et al., 2012).

4.2.4 Proteínas de choque térmico (Hsp)

Las proteínas de choque térmico (Hsp, por sus siglas en inglés heat shock proteins) constituyen un grupo de proteínas con una estructura muy conservada durante la evolución, presentes en todos los organismos, aparecen como respuesta a situaciones de estrés tales como los incrementos de temperatura. Se le atribuye función de chaperonas moleculares y actúan plegando, agregando y ensamblando proteínas, también tienen actividad en el transporte intracelular y la degradación de elementos dañados, además de una función de reparación de proteínas dañadas, eliminando una señal para la apoptosis (Georgopoulos y Welch, 1993; Srivastava et al., 1998; Zugel y Kaufmann, 1999).

En las especies clamidiales, las cHsp (Por sus siglas en inglés, Chlamydial Heat Shock Proteins) más estudiadas son cHsp60 y cHsp7. Son unas de las principales dianas de la respuesta inmune humoral en infecciones por *C. abortus* (Hechard et al., 2004), así mismo se ha demostrado que cHsp60 es capaz de activar macrófagos (Kol et al., 1999).

5. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

El género *Chlamydia* tiene un genoma altamente conservado y reducido. *C. abortus*, por ejemplo, tiene un genoma de 1.14 Mpb y *C. trachomatis* de 1.04 Mpb (Stephens et al., 1998; Thomson et al., 2005), de los cuales aproximadamente dos tercios de sus proteínas se comparten entre especies. Las diferencias se centran en la “zona de plasticidad”, una región con alta diversidad genómica que codifica una matriz de factores de virulencia (Elwell et al., 2016). Dentro de los mecanismos de patogenicidad de *Chlamydia* se encuentran:

5.1 ADHESIÓN

Como primer contacto directo entre el patógeno y el objetivo, la adhesión es un requisito previo para los pasos posteriores en el proceso de infección y es la base de la especificidad de la célula hospedera para la mayoría de los patógenos. La adhesión suele ser un proceso multifactorial en el que participan varias proteínas microbianas y del hospedero (Falkow, 1991; Finlay y Falkow, 1997; Pizarro-Cerda y Cossart, 2006; Nobbs et al., 2009; Bardiau et al., 2010). Los patógenos intracelulares obligados, en particular, se basan en estructuras superficiales especializadas para mediar en las interacciones específicas con células eucariotas (Kline et al., 2009). Por lo tanto, la invasión exitosa de *Chlamydia* requiere la adhesión inicial del cuerpo elemental infeccioso (CE) a la célula huésped como primer paso para la absorción e inicio del ciclo de desarrollo intracelular (revisado por Hackstadt 1999; Dautry-Varsat et al. 2005 y Campbell y Kuo 2006).

La unión del CE a la superficie de la célula hospedera consta de dos pasos individuales: una interacción electrostática reversible inicial con glicosaminoglicanos (GAG) como heparán sulfato (Zhang y Stephens, 1992; Su et al., 1996), seguido de una unión irreversible dependiente de la

temperatura de un ligando de *Chlamydia* a un receptor desconocido de la célula hospedera que induce la internalización del CE (Hegemann y Moelleken, 2012). Los ligandos bacterianos que se han logrado caracterizar a la actualidad incluyen a las proteínas OmpA (Su et al., 1990), OmcB, Pmp21 (PmpD), Pmp6, Pmp20, Hsp70 (Wehrl et al., 2004; Moelleken y Hegemann, 2008) y componentes del T3SS, como CopB, CopD, y LcrV (Hegemann y Moelleken, 2012).

5.2 INHIBICIÓN DE LA FUSIÓN FAGOSOMA-LISOSOMA

Las especies de *Chlamydia* al ser microorganismos intracelulares obligados ingresan a las células del hospedero a través de fagocitosis (Friis et al., 1972). De manera normal un fagosoma que ha incluido a un patógeno se fusionará con un lisosoma, posteriormente el fagolisosoma producirá hidrolasas ácidas para erradicar al patógeno. La supervivencia intracelular depende de la capacidad de evitar la destrucción de lisosomas del hospedero. Tras la fagocitosis de los CE ocurren dos eventos: se inicia la inhibición de la fusión del fagolisosoma y la transformación del CE a CR. Esta inhibición del fagolisosoma se mantiene durante la mayor parte del ciclo de desarrollo de *Chlamydia* (Todd y Storz., 1975). Los estudios ultraestructurales indican que los lisosomas marcados con ferritina no se fusionan con fagosomas que contengan clamidias, lo que le permite a la bacteria evadir eficazmente las enzimas bactericidas (Wyrick y Brownridge., 1978), aunado a que el microambiente dentro de la vacuola que contiene a *Chlamydia* es modificado por este microorganismo. Después de la internalización inicial, la inclusión no se acidifica y se mantiene aislada de la ruta lisosómica endosómica (Heinzen et al., 1996; Escalante-Ochoa et al., 1998). Esta ausencia de acidificación previene la formación de la vesícula endosómica portadora (Clague et al., 1994), una vesícula grande y esférica, que regula el paso del endosoma temprano a tardío (Aniento et al., 1993).

5.3 SISTEMAS DE SECRECIÓN

Aproximadamente el 10% de las proteínas que codifica el genoma de *Chlamydia* corresponden a proteínas efectoras de virulencia (Betts-Hampikian y Fields, 2010), que son liberadas a través de sistemas de secreción especializados a la superficie bacteriana, al lumen de la inclusión, la membrana de inclusión y al citoplasma de la célula hospedadora (Fields, 2012).

5.3.1 Sistema de secreción no flagelar de tipo III (NF-T3SS)

El NF-T3SS, es un determinante de virulencia de bacterias Gram-negativas en el que 20 proteínas forman un aparato, comúnmente conocido como “inyectisoma”, para lograr la secreción vectorial y la translocación de proteínas efectoras. A diferencia de otros sistemas, los genes NF-T3SS de *Chlamydia* no se encuentran en plásmidos de virulencia ni se organizan en islas de patogenicidad. Los genes efectores parecen estar dispersos por todo el cromosoma en todas las especies de *Chlamydia*, mientras que los componentes del “inyectisoma” se agrupan en tres loci principales (Stephens et al., 1998). El inyectisoma se forma por varias proteínas, entre ellas CdsJ, que abarca el espacio periplásmico y se asocia con las proteínas integrales de membrana CdsR-V y la proteína de membrana interna CdsD; además posee un anillo compuesto por CdsC, que es necesario para que la aguja atraviese la membrana externa y forme estructuras hexámicas similares a las estructuras ‘tipo roseta’ (Figura 7) (Matsumoto, 1982; Tanzer y Hatch, 2001).

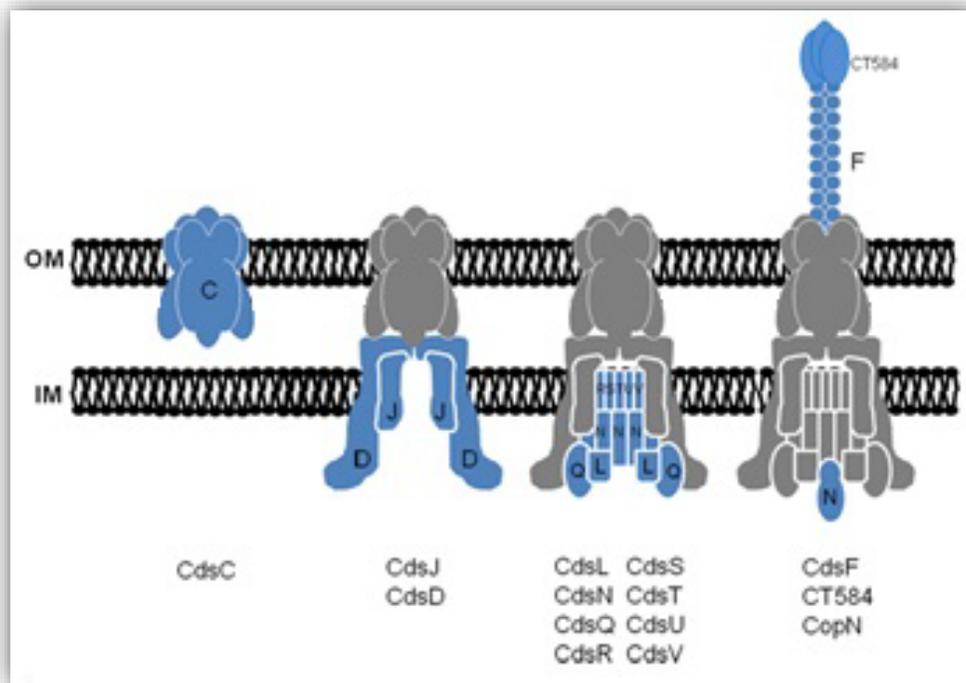


Figura 7. Modelo de la composición del aparato T3SS de *Chlamydia*. El aparato basal abarca la membrana interna (IM) y la membrana externa (OM) (Modificado de Hampikian y Fields., 2010).

Se ha analizado que las proteínas CopB y CopB2 permiten la traslocación de efectores a través de la membrana plasmática de la célula (Peters et al., 2007), mientras que las principales proteínas efectoras secretadas son; la fosfoproteína de reclutamiento de actina (TarP) que participa en la inclusión de *C. trachomatis* al inducir cambios tempranos en el citoesqueleto durante su internalización en la célula eucariota (Clifton et al., 2005); y las proteínas de inclusión de membrana IncA, IncB e IncC, que median las interacciones hospedero-patógeno (Hackstadt, 2012; Moore y Ouellette, 2014) como son la reorganización del citoesqueleto de la célula eucariota, el anclaje del centrosoma, la adquisición de lípidos y la resistencia a la apoptosis (Moore y Ouellette, 2014).

5.3.2 Sistema de secreción tipo V (T5SS)

El sistema de secreción tipo V o autotransportador (AT) es el mecanismo de secreción más difundido que emplean las bacterias Gram negativas para liberar factores de virulencia involucrados en el inicio de la infección, la progresión de la enfermedad y la evasión del sistema inmune. Las proteínas AT se caracterizan por tres dominios, 1) una secuencia señal (SS), 2) un dominio pasajero (DP) N-terminal diverso que confiere la función efectora y 3) un dominio translocador (TD) C-terminal conservado. El TD se inserta en la membrana externa (ME) al ensamblarse en un poro de barril β que facilita la translocación del DP a la superficie bacteriana (Dautin y Berstein 2007; Henderson et al., 2004).

Las bacterias del género *Chlamydia* poseen un gran número de genes autotransportadores en comparación con otras bacterias gram negativas, lo que sugiere un papel importante de estas proteínas de *Chlamydia* en su patogenia. Las proteínas Pmp comparten muchas de las características de los autotransportadores clásicos (Tanzer y Hatch, 2001). Este grupo diverso de proteínas de superficie ha sido implicado en la adhesión (Wehrl et al., 2004) y la respuesta inmune (Tan et al., 2010).

5.4 RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

En la mayoría de los casos, las infecciones por *Chlamydia* spp. se pueden resolver fácilmente mediante el tratamiento con antibióticos como los derivados de tetraciclina y macrólidos, sin embargo, el uso indebido y excesivo de antibióticos, y la automedicación, se vuelven factores de riesgo que aumentan la aparición de resistencia de las especies de clamidia a los antibióticos en los últimos años, estos factores representan un problema crítico y grave de salud pública en todo el mundo (Borel et al.,

2016). De hecho, las especies de *Chlamydia* desarrollan resistencia a los antibióticos a través de diversos mecanismos (Mestrovic y Ljubin-Sternak., 2018) por ejemplo, la resistencia a la azitromicina con frecuencia resulta de mutaciones en la región de la peptidil transferasa de los genes del ARNr 23S, lo que afecta la unión reversible a la subunidad ribosómica grande cerca del centro de la peptidil transferasa y un efecto bacteriostático debido a la inhibición de la síntesis de proteínas (Fohner et al., 2017; de Barbeyrac., 2013). Por otro lado, la resistencia a la tetraciclina a menudo se asocia con islas genómicas integradas en el cromosoma de las clamidias, lo que afecta la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas al unirse a su ribosoma (con una alta afinidad por la subunidad 30S) y evitar la unión de aminoacyl tRNA en el sitio aceptor (Griffin et al., 2010). Se ha demostrado que el mecanismo de resistencia a las fluoroquinolonas está asociado con la presencia de una mutación en la región determinante de la resistencia a las quinolonas *gyrA*, que afecta la inhibición de dos enzimas bacterianas de la familia de las topoisomerasas de clase II: la ADN girasa y la ADN topoisomerasa IV (Naeem et al., 2016). En el caso de la resistencia a la rifampicina, una sustitución de nucleótidos en el gen *rpoB* es responsable, lo que afecta la inhibición de la transcripción bacteriana al interactuar con la subunidad beta de la ARN polimerasa dependiente del ADN bacteriano (Chen y Kaye., 2011).

5.5 MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

5.5.1 Inhibición de trampas extracelulares de neutrófilos (NET's)

La erradicación de bacterias por parte de los neutrófilos generalmente incluye funciones comunes de estas células, es decir, fagocitosis, liberación de defensinas y formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), que son estructuralmente una malla de fibras de ADN que contiene histonas y enzimas proteolíticas antimicrobianas, liberadas al espacio extracelular. Los microorganismos son inmovilizados en estas trampas extracelulares, donde encuentran una concentración letal de agentes antimicrobianos (Brinkmann et al., 2004). El proceso de extravasación de neutrófilos al sitio de infección de la mucosa está regulado por la integrina β -2 de superficie, CD18, además de citocinas como IL-8 e IL-17 (Barteneva et al., 1996; Molestina et al., 1999; Scurlock et al., 2011). Recientemente, Rajeeva et al. 2018 han sugerido una estrategia de evasión de neutrófilos utilizada por *C. trachomatis* que da como resultado la parálisis de la extrusión de NET's por parte de la célula huésped. La escisión y liberación del receptor 2 de formil -péptido de superficie de neutrófilos (FPR2) por el factor de actividad similar a la proteasa clamidial (CPAF) juega un papel en este proceso como un objetivo de

CPAF que afecta el estallido oxidativo que interfiere con la activación de neutrófilos mediada por químicos (Porter et al., 2005).

5.5.2 Evasión de la fagocitosis

Chlamydia tiene la capacidad de inhibir el estrés oxidativo a través de NADPH oxidasa en neutrófilos humanos y en células HeLa (Tauber et al., 1989). El mecanismo utilizado implica la reubicación del sustrato 1 de la toxina botulínica C3 relacionado con Ras (Rac1), que es una subunidad reguladora de NADPH oxidasa reduciendo la eficiencia de la fagocitosis (Boncompain et al., 2010). Se sugiere que NADPH oxidasa se reubica en el lado interno de la membrana de inclusión clamidial lo que promueve la función glucolítica bacteriana, afectando de manera negativa la generación de energía de la célula hospedera (Szaszák et al., 2011).

5.5.3 Inhibición de la apoptosis

Chlamydia es capaz de infectar e inhibir la función de defensa contra la apoptosis de la célula hospedera al reducir el procesamiento de procaspasa con la inducción de IL-8; por lo tanto, se mantiene la expresión de la proteína antiapoptótica de leucemia de células mieloides (Mcl-1) a través de la activación de las vías PI3K/Akt y ERK1/2 (Sarkar et al., 2015). Esto permite que la bacteria resida y se esconda dentro del neutrófilo hasta por 90 horas en comparación con las 10 horas en los neutrófilos no infectados (Van Zandbergen et al., 2004). Cuando los neutrófilos infectados sufren apoptosis y finalmente son ingeridos por los macrófagos vecinos, las bacterias pueden replicarse y persistir por más tiempo. La infección de macrófagos a través de neutrófilos apoptóticos induce la secreción del factor de crecimiento tumoral beta (TGF- β) en comparación con el TGF- α después de la infección directa de macrófagos con bacterias (Rupp et al., 2009), lo que facilita que las bacterias se mantengan ocultas, es decir, permanece protegido cuando es absorbido por macrófagos. CPAF contribuye a la actividad antiapoptótica de las clamidias al degradar a las proteínas proapoptóticas (BH3-*only* BCL-2, BIM, PUMA y BAD) (Pirbhai et al., 2006). Se ha observado que la proteína BIM desaparece durante la infección por *Chlamydia* y esta desaparición podría ser inhibida por los inhibidores del proteasoma (Fischer et al., 2004). Estas moléculas proapoptóticas transmiten señales de muerte a las mitocondrias inhibiendo las moléculas pro/antiapoptóticas de BCL-2 que activan la proteína BAX y BAK (Dong et al., 2005). Por tanto, la degradación de las moléculas proapoptóticas confiere resistencia a la apoptosis durante la infección celular por clamidia.

5.5.4 *Chlamydia* suprime el complejo principal de histocompatibilidad de clase I y II (MHC I y II)

En la infección por *C. trachomatis*, CPAF es responsable de degradar el factor de transcripción *Upstream-1* (USF-1) y el factor regulador X5 (RFX5). USF-1 es un factor de transcripción constitutivo expresado de forma ubicua necesario para la expresión de la inducción de IFN- γ del transactivador de clase II (CIITA) que media la expresión de MHC de clase II (Pirbhai et al., 2006); mientras que RFX5 es un miembro del complejo del factor de transcripción RFX que se requiere para unirse al factor regulador *Upstream-1* (RFX1) de la cadena pesada del MHC de clase I y los genes de microglobulina $\beta 2$ ($\beta 2M$) (Gobin et al., 1998). Es importante destacar que CPAF es homólogo entre especies, y también se ha demostrado que CPAF recombinante de *C. pneumoniae* degrada RFX5, lo que afecta la expresión de MHC de clase I (Fan et al., 2002).

5.5.5 Agotamiento de linfocitos T

El aumento de la expresión de la proteína de muerte celular programada (PD-1) es indicativo del agotamiento de las células T (Barber et al., 2006). La unión de PD-1 a sus ligandos (PD-L1 y PD-L2) en las células presentadoras de antígenos suprime la activación mediada por la señalización del receptor de células T, lo que confiere a las células T persistencia en el "estado agotado", que se caracteriza por la falta de respuesta a la exposición al antígeno, pérdida de citotoxicidad y producción de citocinas como, IL-2, TNF e IFN γ (Wherry et al., 2004). En un análisis de perfiles transcripcionales, Porcella et al. informan que las cepas de *C. trachomatis* que contienen plásmidos aumentan dos veces la expresión de PD-L1 en células epiteliales humanas en comparación con las cepas deficientes en plásmido (Porcella et al., 2015). Además de PD-L1, otras moléculas relacionadas con la inmunosupresión, por ejemplo, la proteína β inhibidora de NF- κ B (NF- κ BI β) y la proteína inductora del factor de necrosis tumoral α (TNF α IP3) también se expresan en niveles más altos en células epiteliales infectadas con cepas portadoras de plásmidos que sugieren que uno de los ocho genes codificados por el plásmido puede actuar para desactivar funciones inmunitarias específicas, lo que subraya la necesidad de seguir investigando y comprender mejor el mecanismo de supresión inmunitaria del plásmido (Wong et al., 2019)

6. TRANSMISIÓN, PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

6.1 TRANSMISIÓN

Los CE se eliminan principalmente y en mayor número, en secreciones vaginales de animales infectados en los momentos previos y posteriores al aborto o parto, igualmente se encuentran en placenta. En ganado caprino son más frecuentes las descargas vaginales y comienzan desde las dos semanas antes del aborto lo que explicaría la mayor incidencia de abortos en esta especie en comparación con los ovinos (Rodolakis y Laroucau, 2015). Una vez en el medio ambiente, los CE eliminados pueden permanecer viables durante varias semanas o meses (Nietfield, 2001). Entre animales el contagio se da por ingestión de los CE (Caro et al., 2009; Kerr et al., 2005). Otra vía de infección es la aerógena, a través de aerosoles presentes en ambientes contaminados (Buxton et al., 1990). También existen otras rutas como son la venérea, la leche y calostro (Rodolakis et al., 1998; Martínez., 2021).

6.2 PATOGENIA Y SIGNOS CLÍNICOS

Tras la infección oro-nasal, el microorganismo se establece en órganos linfoides faríngeos, y tras un periodo de multiplicación breve, se produce la diseminación por vía hemolinfática hacia otros órganos hasta alcanzar el tejido placentario (Nietfield, 2001) permaneciendo la cabra infectada, hasta su próxima gestación, tiempo donde el microorganismo se reactiva, produciendo el aborto, dos a tres semanas antes de la fecha estimada del parto o con la presentación de corderos muertos o débiles que mueren pocos días después del nacimiento (Aitken, 2000). Generalmente en la especie caprina resulta frecuente la retención placentaria, endometritis y vaginitis, mientras que en ovinos raramente se presenta esta signología (Rodolakis et al., 1998). Los cambios patológicos que se producen en la placenta son resultado de la multiplicación de las bacterias y se hace evidente a partir del día 90 de gestación y podría estar asociado a cambios hormonales (Leaver et al., 1987). Hacia las etapas finales de la gestación, entre los días 125 a 140, la placenta se encuentra masivamente infectada por *C. abortus* y las alteraciones en la unión fetoplacentaria pueden provocar el aborto. Mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha observado que la infección comienza en el epitelio coriónico y la multiplicación clamidial produce una lisis celular y la liberación de CE. Tanto el LPS clamidial como otros componentes antigénicos celulares y bacterianos, actúan como señales de alarma, activando

macrófagos y linfocitos Th1 con un aumento de IFN- γ del lado materno (Entrican, 2002). Posteriormente se da la colonización de células del trofoblasto, resultando en una respuesta inflamatoria dirigida por neutrófilos y la destrucción masiva de las células del corion, lo que provoca alteraciones en el equilibrio hormonal que puede producir un descenso brusco en la producción de progesterona y aumento en los niveles de prostaglandina E₂ (PGE₂), dando como resultado la inducción del parto. Este descenso en los niveles de progesterona induce al descenso en la producción de serpina, que es una proteína que regula la proliferación de linfocitos en útero (Peltier et al., 2000). El descenso de serpina potencializa la activación de linfocitos Th1, que incrementan la producción de IFN- γ , lo que activa a los macrófagos maternos y fetales que liberan citocinas proinflamatorias, como TNF que activa a células NK (por sus siglas en inglés *natural killer*), que tienen la capacidad de atacar a las células infectadas del epitelio coriónico. El TNF también provoca vasoconstricción de los vasos sanguíneos que irrigan la placenta, aunado a la liberación de IL-8 por parte del epitelio vascular, que causa fenómenos de trombosis en los vasos afectados, lo que provoca lesiones necróticas y la quimiotaxis de neutrófilos hacia el foco de infección (Figura 8) (Entrican, 2002).

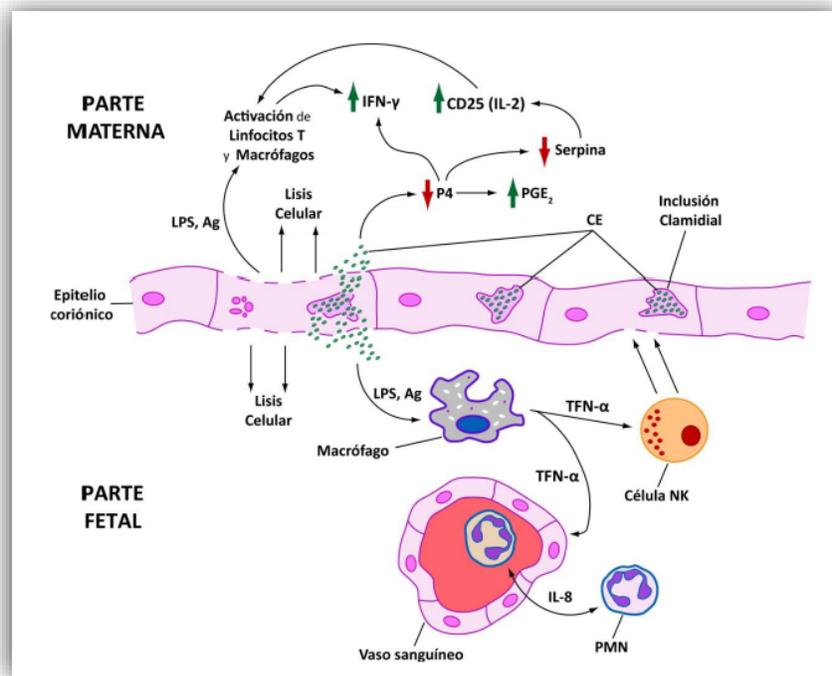


Figura 8. Patogénesis del AEP. Acontecimientos ocurridos en el epitelio coriónico materno y fetal (adaptado de Entrican, 2002).

La placentitis que se produce por este proceso puede dar lugar al aborto por distintas causas en combinación. Por una parte, la inflamación de la barrera placentaria provoca una menor eficiencia en el intercambio materno-fetal de nutrientes y gases. Además, la arteritis del placentoma afecta el riego sanguíneo de toda la placenta ocasionando necrosis y la colonización de un gran número de placentomas podría originar la destrucción de células del trofoblasto y, por lo tanto, la falta de producción de hormonas placentarias que controlan la gestación (Navarro et al., 2004; Sammin et al., 2009). La infección induce una respuesta inmunitaria protectora lo que evita que las hembras infectadas aborten en sus gestaciones posteriores, aunque siguen excretando bacterias ocasionalmente durante partos y estros aproximadamente en los tres años posteriores, favoreciendo así la diseminación de la bacteria en el rebaño (Papp et al., 1993; Entrican et al., 1998). En hembras no gestantes, *C. abortus* es capaz de producir una infección latente que no estimula una inmunidad protectora, con la consiguiente reactivación y multiplicación del microorganismo durante la siguiente gestación (Longbottom et al., 2013), mientras que en nacidos infectados se han descrito lesiones como neumonía, encefalitis, hepatitis e incluso miocarditis (Miller et al., 1990; Navarro et al., 2004; Longbottom et al., 2013). Esto puede deberse a la inmadurez del sistema inmunitario de estos animales que sería incapaz de evitar la diseminación del patógeno hacia varios órganos (Navarro et al., 2004).

7. RESPUESTA INMUNE CONTRA *C. abortus*

La familia *Chlamydiaceae* al ser patógenos intracelulares, activan mecanismos que les permiten permanecer y multiplicarse en el interior de la célula utilizando la maquinaria metabólica de ésta. Por lo que el hospedador debe ser capaz de eliminar a las bacterias que permanecen en el interior de sus células y mantener su integridad y funcionalidad. Esta serie de mecanismos biológicos tiene como objetivo proteger al organismo hospedador de la invasión y el establecimiento de una infección. Por lo tanto, el éxito del establecimiento de la infección dependerá de la capacidad del hospedador para establecer una respuesta inmunitaria efectiva contra el patógeno (Entrican et al., 2004).

7.1 RESPUESTA INMUNE INNATA

En la respuesta inmune innata se incluyen mecanismos externos de protección, como son la barrera física que supone la piel y el aumento de la temperatura corporal, barreras químicas como la bajada del pH o sustancias antimicrobianas segregadas por el organismo como pueden ser la lisozima o la espermina y barreras biológicas como la microbiota. Los mecanismos internos de protección se refieren a los mecanismos de defensa celular llevados a cabo por células especializadas para tal fin como pueden ser los neutrófilos o polimorfonucleares (PMN), macrófagos y células NK, a los que se van a sumar la acción de diversos elementos solubles como son el complemento y ciertas citocinas (Abbas et al., 2003).

Los PMN son células efectoras importantes en la respuesta innata del sistema inmunitario (Mayadas et al., 2014). Vigilan constantemente el organismo en busca de signos de infecciones microbianas y cuando las encuentran, responden rápidamente para atrapar y matar a los patógenos invasores. Se reconocen tres funciones antimicrobianas principales para los neutrófilos: fagocitosis, desgranulación y liberación de material nuclear en forma de trampas extracelulares de neutrófilos (NET). Estas funciones se consideraban, hasta hace poco tiempo, el único propósito de los neutrófilos, sin embargo, la investigación actual realizada ha revelado que los neutrófilos poseen un repertorio muy diverso de respuestas funcionales que van más allá de la simple destrucción de microorganismos. Hoy en día se reconoce que los neutrófilos son células complejas transcripcionalmente activas (Ericson et al., 2014) que producen citocinas (Tecchio y Cassatella, 2016), modulan las actividades de las células vecinas, contribuyen a la resolución de la inflamación (Greenlee-Wacker, 2016), regulan a los macrófagos para las respuestas inmunitarias a largo plazo (Chen et al., 2014), participan activamente en varias enfermedades, e incluso tienen un papel en la inmunidad de memoria innata (Netea et al., 2016). En las infecciones por *C. abortus* se ha observado en modelos murinos que al depletar la población de PMN, los animales presentan una mayor carga bacteriana, se acelera el proceso de aborto y se aumenta la tasa de mortalidad (Buendia et al., 1999a). Sin embargo, el papel de los PMN es limitado cuando los animales son infectados por segunda vez con *C. abortus*, ya que su ausencia no altera el desarrollo normal de la gestación, aunque si se ve afectada la producción temprana de citocinas (Montes de Oca et al., 2000).

Los macrófagos son un componente celular esencial del sistema inmunitario innato, son de vida prolongada, y con una amplia distribución en los tejidos linfoides y no linfoides de todo el cuerpo

(Epelman et al., 2014). Tienen funciones fundamentales en la homeostasis y muchos procesos fisiológicos, incluida la función metabólica, la eliminación de desechos celulares, la reparación y remodelación de tejidos. Su papel en la respuesta inmune se basa en su capacidad fagocítica, cuyo proceso se lleva a cabo en el fagosoma, en donde intervienen diferentes proteínas como lisozima, lactoferrina, catepsinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, para degradar a los microorganismos y llevar a cabo la presentación de antígenos (Epelman et al., 2014). En las infecciones por *Chlamydia*, la fagocitosis de estas bacterias induce su maduración y la secreción de IL-6, IL-2 y TNF (Schramm et al., 1996).

La IL-6 es también secretada por linfocitos, mastocitos, células endoteliales, queratinocitos y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta al TNF. Tiene actividad pirogénica y regula la activación de macrófagos, y el desarrollo y la diferenciación de linfocitos B, activación de linfocitos T citotóxicos y células plasmáticas. En la perspectiva de la respuesta inmune innata, la IL-6 induce el reclutamiento de células de la respuesta inmune y promueve la apoptosis de los neutrófilos, mediando la inflamación para controlar la infección (Cunningham et al., 2013). La producción temprana de IL-6 previene respuestas inmunitarias exacerbadas dependientes de IFN- γ , lo que podría explicar aspectos de la fisiopatología de la infección clamidial (Croker et al., 2003; Entrican et al., 2004). En pacientes asintomáticos con infecciones por *Chlamydia* se han podido detectar altas concentraciones de esta citocina en suero y se ha relacionado con un papel protector en el control de la infección, dado que los ratones deficientes en IL-6, son significativamente más susceptibles a la infección a través de vías respiratorias (Zhang et al., 2010), por lo que es necesaria para controlar la infección clamidial al limitar la replicación y la colonización por el patógeno (Sun et al., 2017).

La IL-12 es una proteína heterodimérica de dos subunidades (p35, p40) producida por células fagocíticas y células dendríticas en infecciones producidas por microorganismos intracelulares, y actúa principalmente a través de STAT4 para inducir la producción de IFN- γ por parte de células T y NK. Como la IL-12 participa en el desarrollo de la respuesta Th1, se cree que representa un vínculo importante entre la inmunidad innata y la adaptativa. Tiene su función sobre células NK y linfocitos T, incrementando su actividad citolítica, también dirige la diferenciación de la respuesta inmune hacia una respuesta Th1, induciendo la producción de IFN- γ y otras citocinas proinflamatorias (Zundler y Neurath. 2015). Respecto a *C. abortus*, el tratamiento con IL-12 exógena confiere protección inmediata

y a largo plazo en ratones susceptibles BALB/c (Huang et al., 1999). Se ha observado que la IL-12 se produce en fases tempranas de la infección por *C. abortus* (Buendia et al., 1999b) y su rol puede estar involucrado en la patología asociada con la infección (Del Rio et al., 2001).

Las células NK por su parte, se encargan de destruir directamente a las células infectadas por patógenos intracelulares, además son una fuente temprana de IFN- γ (Zhang et al., 2017). Se ha comprobado que la depleción de esta población celular en animales infectados con *C. abortus* provoca un aumento de la susceptibilidad del animal, con una mayor morbilidad y carga bacteriana en hígado y una disminución sustancial en la concentración de IFN- γ en suero (Buendia et al., 2004).

7.2 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA

La respuesta inmune adaptativa se activa cuando los mecanismos inmunitarios innatos no son suficientes para detener la infección. Es una respuesta antígeno-específica que establece memoria inmunológica, de modo que exposiciones repetidas al mismo antígeno (Ag), provocan una respuesta de mayor rapidez, intensidad y eficacia. Existen dos tipos de respuesta adquirida: la respuesta humoral, mediada por los anticuerpos (Ac) secretados por las células plasmáticas derivadas a su vez de los linfocitos B; y la respuesta celular, en la que intervienen mayoritariamente los linfocitos T citotóxicos (CD8+). El que se lleve a cabo una u otra dependerá del espectro de citocinas secretadas por los linfocitos T cooperadores (Th o CD4+), activados tras reconocer el determinante antigénico procesado y presentado por las células presentadoras de antígeno (CPA), como las células dendríticas, macrófagos y linfocitos B. Así, en la respuesta inmunitaria humoral juegan un papel predominante los linfocitos Th2, mientras que en la respuesta celular son esenciales los Th1 (Janeway et al., 2001). En el caso de los patógenos intracelulares como *C. abortus* la respuesta inmunitaria protectora será principalmente de tipo celular, mientras que la respuesta humoral tiene un papel de mayor relevancia en la prevención y/o resolución de las reinfecciones (Abbas et al., 2003).

7.2.1 Respuesta inmune celular

Las células T efectoras detectan antígenos peptídicos derivados de diferentes tipos de patógenos. Los péptidos de patógenos intracelulares que se multiplican en el citoplasma son transportados a la

superficie celular por moléculas MHC de clase I y presentados a las células T CD8+. Estos se diferencian en células T citotóxicas que destruyen a las células infectadas. Los antígenos peptídicos de patógenos que se multiplican en vesículas intracelulares y los derivados de bacterias y toxinas extracelulares ingeridas son transportados a la superficie celular por moléculas MHC de clase II y presentados a las células T CD4+. El encuentro inicial con el antígeno específico en presencia de señales coestimuladoras desencadena la activación de las células T, para entrar a la fase G1 del ciclo celular. Al activarse, deben reingresar al ciclo celular y dividirse rápidamente para producir un gran número de progenie que se diferenciará en células T efectoras. Su proliferación y diferenciación están impulsadas por interleucina-2 (IL-2), que es producida principalmente por linfocitos Th1. Esta citocina también impulsa la proliferación de linfocitos B y células NK (Janeway et al., 2001).

En la infección en modelos murinos con *C. abortus* se ha demostrado que la depleción de linfocitos T CD4+, produce una menor morbilidad tras la infección. Este hecho podría estar asociado con la producción exacerbada de citocinas y con la inducción de apoptosis por parte de los linfocitos T CD4+. Así en una primoinfección de *C. abortus*, la ausencia de linfocitos T CD4+ se encuentra asociada a la nula producción de IFN- γ (Del Río et al., 2001; Martínez et al., 2006); también provoca un incremento de la carga bacteriana en hígado. Por otra parte, los linfocitos T CD8+, específicamente la subpoblación CD8+ CD28-, son capaces de regular las respuestas inflamatorias exacerbadas provocadas por los linfocitos T CD4+ (Jiang y Chess, 2000). Esto se ha comprobado *in vivo* en ratones con depleción de linfocitos T CD8+, en donde se observó que se aumenta la mortalidad entre un 75% a 100% (Ortega et al., 2006). Por lo que se ha sugerido que la respuesta a la infección por *C. abortus*, se debe a un rápido establecimiento de la respuesta inmune innata, el reclutamiento de linfocitos T CD8+ y de la producción temprana de IFN- γ (Del Río et al., 2000).

El TNF es la citocina responsable de dirigir la respuesta inmune específica de tipo celular (Th1). Es producida por macrófagos en respuesta a una activación directa por LPS bacteriano o de manera indirecta por la acción de linfocitos T cooperadores. Es miembro de una familia de proteínas involucradas en la regulación inmunitaria y la inflamación. Esta citocina tiene una función esencial, ya que sirve como señal de alarma para la activación de células de la inmunidad específica, mediando la mayoría de las funciones inmunitarias e inflamatorias. También regula el crecimiento de un gran número de tipos celulares, activa a macrófagos para incrementar su propia producción y la de otras citocinas como, IL-1, IL-6, factor estimulante de colonias macrófagos (M-CSF), factor estimulante de

colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). También tiene función de quimiocina al foco inflamatorio de PMN y células NK productoras de IL-12 (Mehta et al., 2018). Se ha sugerido que el TNF puede actuar junto con linfocitos T CD8+ en la resolución de la infección por *Chlamydia*, también se ha asociado su función en la patogénesis de la infección, donde parece contribuir al daño placentario, siendo la causa principal del aborto (Buxton et al., 2002).

La presencia de TNF tiene una acción directa en la activación de macrófagos y como resultado de esto, se obtiene la producción de IFN- γ , por parte de este linaje celular. El IFN- γ es una de las citocinas que se encuentran en mayor cantidad durante las primeras fases de la infección clamidial y es crucial para el control de sus infecciones. Tiene un papel esencial en la defensa contra numerosos patógenos intracelulares (Elahi et al., 2000; Bregenholt et al., 2001). El IFN- γ , en bajas concentraciones, induce cuerpos aberrantes, no infecciosos, incapaces de replicarse. Este efecto puede ser revertido al añadir triptófano al cultivo. Su actividad clamidiostática *in vivo* se basa en la activación de ciertas enzimas catalíticas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS) (Rottenberg et al., 2000). La enzima IDO se encarga de catalizar la degradación del triptófano, que es un aminoácido esencial para el crecimiento de *Chlamydia*. Sin embargo, algunas especies de *Chlamydia* parecen ser capaces de adquirir o generar su propio triptófano, inhibiendo la actividad de IDO (Rottenberg et al., 2002; Schoborg 2011.). Los resultados en un modelo murino sugieren que los altos niveles de IFN- γ detectados en el organismo durante los primeros días de la infección, controlan la dispersión de las bacterias hasta la llegada de otras subpoblaciones leucocitarias, como linfocitos T CD8+ al foco inflamatorio (Montes de Oca et al., 2000a). No obstante, aún no se conoce con exactitud cómo se establece el balance necesario entre una producción suficiente de IFN- γ que proteja contra la infección y que al mismo tiempo no produzca una respuesta inflamatoria que pueda ser perjudicial para el organismo, ya que se ha comprobado que en altas concentraciones esta citocina resulta citotóxica y en animales gestantes, la presencia de IFN- γ en la placenta, controla el crecimiento de *C. abortus*, pero también produce lesiones en el trofoblasto placentario, lo que facilitaría a la presentación del aborto (Kerr et al., 2010).

Otro de los mecanismos que utilizan los macrófagos activados por IFN- γ , es la producción de la enzima iNOS, (Huang et al., 2002), una molécula con gran potencial microbicida. En estudios *in vitro* se comprobó que altas concentraciones de óxido nítrico (NO) secretado por la acción de iNOS, inhibe la producción de IL-12 por parte de los macrófagos, la inmunosupresión de la respuesta Th1 (Huang et

al., 2002) y una respuesta inflamatoria con gran daño celular (van der Veen, 2001). Por lo que una correcta modulación de iNOS, es importante para lograr una óptima inmunidad protectora y para reducir los posibles efectos dañinos causados por el NO durante la infección clamidial (Huang et al., 2002).

Por otra parte, se ha demostrado que los linfocitos T reguladores (Treg), tienen la capacidad de atenuar la respuesta inmunitaria celular y modulan la respuesta inmune innata, previniendo una respuesta excesiva, que podría generar un daño tisular grave, teniendo como consecuencia un aumento en la morbilidad y el cuadro patológico (Antunes y Kassiotis, 2010; Hou et al., 2015). Se sabe que los linfocitos Treg FoxP3+ secretan IL-10, que es particularmente importante en la regulación de las respuestas inmunitarias (Uhlrig et al., 2006; Maynard et al., 2007; Rubtsov et al., 2008).

La IL-10 es una de las principales citocinas antiinflamatorias secretada por macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T (CD4+ y CD8+) (Moore et al., 2003; Kamanaka et al., 2006). Esta citocina regula el equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2, modulando la actividad de linfocitos B, células NK, macrófagos y células dendríticas (Sabat et al., 2010; Scapini et al., 2011). En la infección clamidial la IL-10 suprime la secreción de varias moléculas proinflamatorias como IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-18 y TNF, así como la actividad de macrófagos y de la respuesta Th1, permitiendo el establecimiento de la respuesta Th2 que protege al hospedador de una excesiva respuesta inflamatoria (Moore et al., 2002; Couper et al., 2008a, 2008b; Buendia et al., 2009; Yilma et al., 2012). Al parecer varios antígenos clamidiales, tales como OmpA están asociados a la producción de IL-10 (Vats et al., 2007; Azenabor et al., 2011; Bermudez-Fajardo et al., 2011) y se ha demostrado que la expresión de esta citocina se incrementa durante la infección clamidial, lo que podría estar asociado con la aparición de infecciones crónicas (Han et al., 2006; Rizzo et al., 2008; Azenabor y York, 2010; del Rio et al., 2013, 2018). En el caso de infecciones por *C. abortus* en modelos murinos se ha observado que después de una elevada producción de IL-10, se disminuye la presencia de IFN- γ , TNF y linfocitos T CD4+ en los focos de infección del hígado y bazo (Del Rio et al., 2000). Posteriormente se comprobó en un modelo de infección crónica por *C. abortus* con ratones que sobreexpresaban IL-10, que tenían una respuesta inflamatoria moderada a *C. abortus*, permitiendo el establecimiento de una infección a largo plazo. Esto se relaciona con el establecimiento de infecciones persistentes (Del Rio et al., 2018).

7.2.2 Respuesta inmune humoral

Muchos microorganismos patógenos se multiplican en los espacios extracelulares de la célula, y la mayoría de los patógenos intracelulares se propagan moviéndose de una célula a otra a través de los fluidos extracelulares. Los espacios extracelulares están protegidos por la respuesta inmune humoral, en la que los anticuerpos producidos por las células B favorecen la destrucción, neutralizando o opsonizando microorganismos extracelulares con lo que evitan la propagación de infecciones intracelulares. La activación de los linfocitos B y su diferenciación en células plasmáticas secretoras de anticuerpos se desencadena por el contacto con el antígeno y suele requerir linfocitos T cooperadores para la activación de linfocitos B (Janeway et al., 2001).

Se ha demostrado mediante estudios *in vitro*, que varias Pmp de *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci* y *C. abortus* provocan una respuesta inmunitaria humoral (Livingstone et al., 2005), describiéndose la PmpD como un antígeno que genera anticuerpos neutralizantes que impiden la internalización de las bacterias (Crane et al., 2006). Se ha descubierto que el desarrollo de un adecuado ambiente inmunológico durante la activación de linfocitos T, con presencia de IL-12, así como la presencia de anticuerpos específicos (IgG2 e IgA), facilita y acelera el desarrollo de una respuesta protectora contra microorganismos intracelulares, por parte de los linfocitos T (Igjetseme et al., 2003; Moore et al., 2003). Tras la infección de *C. abortus* se establece una inmunidad de memoria eficaz y protectora que hace que los animales que hayan abortado no vuelvan a hacerlo por la misma causa (Essig y Longbottom. 2015).

Por otro lado, los linfocitos T y B durante el periodo de división y diferenciación necesario para ser activos contra un Ag determinado, tienen la capacidad de diferenciarse en una población de células de memoria. De esta manera se forma una reserva de linfocitos sensibles al Ag al que son capaces de reaccionar de una manera más rápida, ante una segunda exposición al mismo. En este sentido, se ha visto que el papel de los linfocitos B de memoria y especialmente, la presencia de Ac específicos es crucial en evitar las reinfecciones por *C. abortus* (Buendia et al., 2002, 2009). También se ha observado que la presencia de IFN- γ es menor durante la reinfección que durante la primoinfección y una rápida migración de linfocitos T CD4+ y CD8+ a los focos infecciosos, de los que aún no se ha esclarecido cual es función precisa en una infección secundaria (Montes de Oca et al. 2000b).

8. PREVENCIÓN Y CONTROL

8.1 MANEJO

Las medidas de manejo tienen como objetivo evitar la introducción de animales infectados en rebaños libres de la enfermedad. Para esto los animales sanos se pueden mantener en un sistema cerrado o incorporando animales de reposición procedentes de granjas libres de *C. abortus*. Por otro lado, si el patógeno ya se encuentra circulando en el rebaño, se debe aislar inmediatamente a las ovejas que abortan, retirar los restos del aborto y limpiar y desinfectar el área para evitar en la medida de lo posible la diseminación del microorganismo (Longbottom y Coulter, 2003). Estas medidas llegan a ser de difícil aplicación debido a la presencia de portadores asintomáticos y a la imposibilidad de distinguir animales vacunados de infectados mediante diagnóstico serológico convencional (Entrican et al., 2012).

8.2 ANTIBIOTERAPIA

Existe una amplia gama de antimicrobianos y terapias para el tratamiento de las infecciones por *Chlamydia*. Las tetraciclinas son los antibióticos más usados cuando las hembras están infectadas por *C. abortus*, con el fin de reducir la incidencia de abortos y muertes perinatales (Aitken, 2007). Sin embargo, el uso de antibióticos no garantiza evitar el aborto ni la eliminación del patógeno en el ambiente durante el parto (Longbottom y Coulter, 2003); por otro lado, existe el riesgo latente de la resistencia a los antibióticos. Aunque en *C. abortus* no se ha reportado resistencia a tetraciclinas, sí se han encontrado cepas resistentes de *Chlamydia suis*, aisladas de cerdos (Lenart et al., 2001; Dugan et al., 2004; Borel et al., 2016). A pesar de que la resistencia a los antibióticos en clamidias es un hallazgo clínico *in vivo*, se ha demostrado en condiciones *in vitro* que *C. suis* es capaz de desarrollarla a través de la acumulación de mutaciones puntuales bajo presión antibiótica selectiva (Sandoz y Rockey, 2010). Además, la resistencia a tetraciclina puede transferirse horizontalmente, lo que sugiere que una administración sostenida del antibiótico podría impulsar la propagación de la resistencia (Suchland et al., 2009). Otro punto importante para tomar en cuenta es que existen investigaciones que comprueban que los antibióticos pueden generar estados de persistencia clamidial que contribuyen a mantener la infección dentro del rebaño (Hogan et al., 2004), por lo que las infecciones persistentes o crónicas requieren un tratamiento más largo e incluso podrían no responder a la terapia antibiótica y esto podría confundirse con una resistencia a antibióticos adquirida genéticamente (Sandoz y Rockey, 2010).

8.3 VACUNACIÓN

Tras una primoinfección con *C. abortus* los animales generan una respuesta inmune de memoria eficaz que hace que no vuelvan a sufrir problemas reproductivos en los siguientes contactos con el agente etiológico, es por eso, que la vacunación es una medida efectiva para el control y prevención de la enfermedad. Actualmente existen dos tipos de vacunas comerciales disponibles, las inactivadas y las vivas atenuadas, y aunque las dos contribuyen al control de la infección, ninguna confiere protección total, ni elimina completamente la diseminación del agente. Se ha observado que entre los beneficios que presentan los animales vacunados expuestos a la infección, es que experimentan un número significativamente menor de abortos y una reducción de la excreción de bacterias durante un periodo de entre dos y tres gestaciones posteriores a la vacunación (OIE, 2012).

Las vacunas inactivadas fueron las primeras en utilizarse hacia la década de los 50's, poco después del descubrimiento de la enfermedad, pero se han publicado estudios manifestando la ineficacia de estas tanto en el modelo murino (Caro et al., 2001), como en ovinos (García de la Fuente et al., 2004). En el hospedador natural se ha comprobado que no existen diferencias significativas entre animales vacunados y no vacunados en cuanto a la presentación de fallos reproductivos y excreción de bacterias en los días posteriores al parto/aborto, aunque si se observa un efecto positivo sobre el peso de los corderos nacidos vivos (García de la Fuente et al., 2004; García-Seco et al., 2016). El principal problema del uso de las vacunas inactivadas es que, al no impedir la excreción de bacterias, favorece la persistencia de la infección de forma enzoótica en el rebaño vacunado, lo que podría provocar una selección a favor de las cepas más virulentas (Rodolakis y Souriau, 1979; Wilsmore et al., 1990a; García de la Fuente et al., 2004).

En cuanto a la vacuna atenuada, está basada en una cepa mutante de la cepa 1B obtenida por inducción química y termosensible (Rodolakis y Souriau, 1983), por lo tanto, teóricamente tiene un crecimiento limitado. La naturaleza "viva" de una vacuna siempre implica riesgos y limitaciones en su uso, entre los que se comprende, que puede causar una grave zoonosis en mujeres embarazadas; además, esta vacuna no puede administrarse a animales gestantes o a animales tratados con antibióticos, lo que restringe aún más su uso. Existe también el riesgo de que las cepas atenuadas reviertan a virulentas y causen enfermedad y aborto en animales vacunados. Algunos estudios han demostrado la conexión entre esta vacuna y la aparición de casos de AEO (Laroucau et al., 2010; Wheelhouse et al., 2010; Sargison et al., 2015), tal es el caso de la investigación realizada por Sargison

et al., (2015) que describe una tormenta de abortos atípicos en ovejas y la identificación de la cepa vacunal 1B de *C. abortus* en productos del aborto (Sargison et al., 2015). Por estas razones es que el uso de esta vacuna resulte cada vez menos atractivo para veterinarios y ganaderos.

Existe un gran inconveniente al utilizar vacunas inactivadas o atenuadas, que es la imposibilidad de diferenciar con las pruebas serológicas disponibles, a animales vacunados de animales infectados (DIVA) (Borel et al., 2005). Para evitar estos inconvenientes se han desarrollado vacunas subcelulares que contienen moléculas clamidiales que intervienen específicamente en la inducción de una respuesta inmunitaria efectiva. Sin embargo, los ensayos con antígenos recombinantes y péptidos no han conseguido obtener resultados iguales o mejores que los que se han obtenido con la vacuna inactivada o atenuada, por lo que las investigaciones se han centrado en mejorar la presentación de dichos antígenos mediante la selección de adyuvantes y vías de inoculación (Longbottom y Livingstone, 2006).

9. DIAGNÓSTICO

Un diagnóstico presuntivo de infección por *C. abortus* a menudo se puede obtener mediante la historia clínica, la signología y la patología de presentación. Los signos clínicos que evidencia un rebaño afectado por *C. abortus* no son suficientes para llegar a un diagnóstico definitivo de la enfermedad. Algunos datos epidemiológicos como la persistencia de la infección en el rebaño y la afectación mayoritaria de primíparas con abortos tardíos, así como la observación macroscópica de placentas con lesiones necrótico-hemorrágicas, pueden hacer que el veterinario incluya el AEPR como primer diagnóstico diferencial. Sin embargo, existen otras enfermedades abortivas en los pequeños rumiantes que pueden cursar con cuadros similares, como la toxoplasmosis, la brucelosis o la fiebre Q, por lo que la única forma de emitir un diagnóstico certero implica la confirmación del laboratorio (Borel et al., 2014).

Las técnicas de laboratorio que se pueden emplear para el diagnóstico de *C. abortus* pueden clasificarse en directas e indirectas. Las primeras tienen como objetivo la identificación de *C. abortus* en las muestras de tejido o hisopos, mientras que las segundas detectan en muestras de suero, los anticuerpos anti-clamidia generados por los hospedadores tras la infección.

9.1 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DIRECTAS

El aislamiento bacteriológico se ha considerado como la técnica “estándar de oro”. Sin embargo, este procedimiento presenta varios inconvenientes: por un lado, la toma, almacenamiento y transporte de la muestra deben cumplir unos requisitos especiales para asegurar la viabilidad de los microorganismos y evitar la contaminación; y por otro, la técnica en sí es costosa y requiere mucho tiempo, además de que implica la pericia de un técnico experto. La adición de antibióticos ayuda a reducir los efectos de la contaminación; sin embargo, también se debe tener cuidado en la elección de los antibióticos utilizados. Los antibióticos adecuados incluyen estreptomina (200 mg/ml), gentamicina (50 mg/ml), vancomicina (75 mg/ml) y nistatina (25 unidades/ml), mientras que la penicilina, la tetraciclina y el cloranfenicol inhiben el crecimiento de *Chlamydia* y no deben utilizarse. Históricamente, el primer método para cultivar clamidias fuera del huésped natural se desarrolló en 1935, cuando Burnet y Rountree lograron cultivar el agente de la psitacosis en la membrana corioalantoidea de embriones de pollo en desarrollo. Aunque el cultivo en embriones de pollo todavía se usa hoy en día en los laboratorios, particularmente para el crecimiento masivo de antígenos o inóculos necesarios para los estudios de exposición experimental (Burnet y Rountree, 1935). Posteriormente se descubrió que podía multiplicarse en células del saco vitelino de embriones de pollo en desarrollo (Stamp et al., 1950; Tang et al., 1957). Los sacos vitelinos de embriones de 6 a 8 días de edad se inoculan con suspensiones de muestra al 10% y los embriones mueren entre 4 y 14 días después de la infección. Aunque el cultivo de huevos sigue siendo una técnica útil para aislar muestras de prueba difíciles, es costoso, carece de reproducibilidad y la sensibilidad a la infección puede variar entre las especies y subtipos de clamidias. Sin embargo, el cultivo de huevos todavía se usa hoy en día en los laboratorios, particularmente para el crecimiento masivo de antígenos o inóculos necesarios para los estudios de exposición experimental (OIE, 2000). El establecimiento del cultivo celular implicó un método de aislamiento alternativo y más sensible, además estuvo disponible y podría ser empleado por laboratorios con instalaciones adecuadas. *Chlamydia abortus* puede ser cultivada en gran variedad de líneas celulares, siendo McCoy, L929, células de riñón de hámster neonato (BHK), células de riñón de mono búfalo verde (BGMK) y células HeLa las más susceptibles a la infección (Croy et al., 1975; Wills et al., 1984; Barnes, 1989; Thewessen et al., 1989; Johnston and Siegel, 1992) y son utilizados porque además de permitir el seguimiento de la evolución de la infección, con identificación del efecto citopático, permiten la observación de inclusiones intracitoplasmáticas en células teñidas con

anticuerpos monoclonales fluorescentes o bien, la titulación del número de unidades formadoras de inclusiones (UFI) (Alonso et al., 2012; Arráiz et al., 2008).

El frotis se realiza a partir de membranas placentarias y cotiledones que muestren lesiones típicas asociadas al AEPR, también de hisopos vaginales tomados al momento del aborto, de fetos y animales abortados (Longbottom y Coulter, 2003). Los frotis preparados pueden teñirse para detectar cuerpos elementales o reticulares utilizando uno de varios procedimientos de tinción, por ejemplo, tinción modificada de Maquiavelo, Giménez, Giemsa o Ziehl-Neelsen modificada (MZN) (Stamp et al. 1950; Aitken y Longbottom, 2004; Andersen, 2004) y el método de estreptavidina-biotina (Szeredi y Bacsadi, 2002).

Debido a su morfología y propiedades tintoriales *C. abortus* se parece a la rickettsia *Coxiella burnetti* sin embargo, las diferencias antigénicas entre *C. abortus* y *Coxiella burnetti* se pueden detectar mediante pruebas serológicas (OIE, 2000; Alonso et al., 2012).

Para las técnicas histológicas se pueden utilizar una variedad de procedimientos de tinción. Un método muy utilizado es la tinción histoquímica con Giemsa (Stamp et al., 1950) y la tinción de azul de metileno (Dagnall y Wilsmore, 1990). Sin embargo, ninguna es específica y pueden reaccionar de forma cruzada con otras especies bacterianas. Los procedimientos de tinción inmunohistoquímica que utilizan anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos contra antígenos de superficie de clamidia, como LPS y OmpA, son más sensibles y producen resultados más confiables en comparación con la tinción de histoquímica. Un método de inmunoperoxidasa directa que se ha desarrollado para detectar *C. abortus* en tejidos fijados con formalina ha demostrado ser una prueba muy rápida y sensible (Finlayson et al., 1985; Kunz et al., 1991; Zahn et al., 1995).

Las técnicas inmunológicas directas se basan en la detección del LPS específico de familia. Una de las principales ventajas del uso de inmunoensayos sobre el cultivo celular para el diagnóstico de infecciones, además del menor tiempo que lleva completar la prueba, es que no dependen de la viabilidad, detectando CE tanto viables como no viables, así como antígenos como el LPS en las secreciones. Se ha demostrado que las pruebas varían considerablemente en términos de sensibilidad y especificidad según el tipo de muestras analizadas, y las sensibilidades más bajas generalmente se observan cuando hay una baja prevalencia de infección y, por lo tanto, un bajo número de organismos detectables (Wood y Timms, 1992).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) brinda una detección rápida, sensible y específica entre especies individuales. La mayoría de los métodos de PCR convencionales publicados se basan en la

detección del operón de ARN ribosomal (ARNr) (Messmer et al., 1997; Everett et al., 1999a) o el gen *ompA* (Kaltenboeck et al., 1997b; Yoshida et al., 1998). Se han desarrollado también ensayos de PCR anidada, que en la primera ronda de amplificación se genera un producto específico de *Chlamydiaceae*, que sirve como plantilla en la segunda ronda, donde se utilizan oligonucleótidos específicos de especie (Kaltenboeck et al., 1997a, b; Sachse y Hotzel, 2003). Se ha propuesto también un sistema de PCR dirigido al gen *ompB*, que inicialmente genera un producto específico de familia y después del análisis con enzimas de restricción, pueden identificar la mayoría de las especies de *Chlamydia* (Hartley et al., 2001).

Mientras que la PCR convencional solo puede confirmar la presencia o ausencia de un patógeno determinado, la PCR en tiempo real también permite cuantificar la cantidad de este agente presente en la muestra. La acumulación de producto amplificado se monitorea mediante la medición de la señal fluorescente generada por la digestión con exonucleasa de una sonda fluorogénica marcada específicamente (Livak et al., 1995; Heid et al., 1996). La mayoría de las pruebas de PCR en tiempo real están dirigidas al gen de la subunidad ARNr 23S (Everett et al., 1999b; DeGraves et al., 2003a; Ehricht et al., 2006). El número de protocolos de PCR en tiempo real desarrollados para especies de clamidias individuales está aumentando constantemente. Utilizando segmentos discriminatorios en el gen *ompA*, se han desarrollado ensayos separados para *C. psittaci* y *C. abortus*, que podrían ser útiles en el diagnóstico clínico de psitacosis y AEPR (Pantchev et al., 2008).

9.2 TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO INDIRECTAS

La técnica de fijación del complemento (FC) es el primer ensayo descrito basado en LPS y el más utilizado para el diagnóstico veterinario (Stamp et al., 1952). En el AEPR, los títulos séricos detectados por FC aumentan en el momento del aborto y permanecen altos durante al menos 6 semanas (Storz, 1971). Un título de FC superior a 1/32 se considera un indicio de la presencia de *Chlamydia*, mientras que valores inferiores pueden deberse a infecciones entéricas subclínicas por *C. abortus* o reactividad cruzada con *C. pecorum* u otros LPS bacterianos (Aitken y Longbottom, 2004). Entre las desventajas que existen de esta prueba es que no tiene buenos resultados si se utilizan sueros hemolizados (Cross y Clafin, 1963). Estudios recientes que utilizaron sueros de ovejas y cabras con ausencia o presencia documentada de AEPR informaron especificidades de entre 83% y 98.1% y sensibilidades entre 68,8% y 91,4% (Jones et al., 1997; Longbottom et al., 2001, 2002; Vretou et al., 2007).

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) fue desarrollado a partir de la necesidad de una detección específica de anticuerpos y la diferenciación serológica de animales vacunados e infectados. Sin embargo, la problemática actual de la enfermedad ha representado diversas complicaciones para lograr estos objetivos, por ejemplo, la comprensión del carácter enzoótico de la clamidiosis, es decir, la latencia, persistencia o infección crónica dentro del animal, está lejos de comprenderse. A lo largo del tiempo se han desarrollado diferentes ELISAs que se basan en el uso de diversos antígenos clamidiales. Los más usados son ELISA basado en LPS, a pesar de que tiene reactividad cruzada con todas las especies de *Chlamydia*, es adecuado para identificar animales infectados con cualquier especie, y es una prueba más sensible que la FC, especialmente en rebaños en donde se han producido abortos (Griffiths et al. 1996).

También se ha desarrollado un ELISA basado en la proteína completa OmpA o péptidos específicos, debido a la diversidad de los dominios variables que posee el gen *ompA*, en donde se reconocen los cuatro dominios variables (VD1-4), que tienen la capacidad de discriminar las cepas *C. abortus* y *C. pecorum* (Kaltenboeck et al., 1993). Se ha demostrado la serorreactividad de los dominios VD1 y VD2 al analizar sueros de infecciones experimentales (Livingstone et al., 2005). En cuanto a los ensayos basados en la proteína completa, se ha adaptado el ELISA competitivo que se basa en la unión de anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos contra el VD1 o VD2 de OmpA, que se inhiben por la presencia de anticuerpos séricos. La inhibición depende en gran medida de la cantidad y calidad de afinidad de los anticuerpos competidores (Vretou et al., 2001).

La Pmp son otras proteínas utilizadas para el diagnóstico serológico por ELISA y se ha logrado gracias al descubrimiento y caracterización de esta familia de proteínas. Se ha demostrado que son altamente inmunorreactivas y que comprenden epítomos presentes en las especies de *Chlamydia* (Souriau et al., 1994; Longbottom et al., 1996, 1998; Vretou et al., 2003).

10. USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El ácido desoxirribonucleico (ADN) contiene la información necesaria para la síntesis de proteínas. El descubrimiento del código genético abrió la posibilidad de obtener péptidos y/o proteínas a gran escala a partir de diversos organismos en los cuales no se producen de manera natural. A las proteínas

obtenidas de esta manera se les conoce como proteínas recombinantes (PR). Éstas se pueden producir en microorganismos como bacterias, hongos, virus y levaduras, así como en líneas celulares cultivables de insectos, plantas y de mamíferos. La tecnología del ADN recombinante permitió el descubrimiento de una serie de proteínas fabricadas en organismos microbianos. La primera fue la proteína humana somatostatina en 1977, seguida de la insulina humana producida en *Escherichia coli* en 1978 (Jonasson et al., 2002; Palomares et al., 2004).

La sobreexpresión de las proteínas recombinantes ofrece la ventaja de producir grandes cantidades de la proteína de interés con características similares a la proteína natural y de manera relativamente sencilla y rápida (Porro et al., 2005). *Escherichia coli* es uno de los sistemas de sobreexpresión más utilizados para la producción de PR. Algunas ventajas que ofrece son su rápida reproducción, utiliza medios de cultivo relativamente baratos, buen manejo en fermentaciones de alta densidad y fácil escalamiento. Además, ha sido uno de los organismos más utilizados como modelo de estudio, debido a esto se ha sido caracterizado ampliamente y se han desarrollado numerosas herramientas que han facilitado su clonación y expresión genética (Baneyx y Mujacic, 2004).

Otra ventaja del uso de las PR es que se puede hacer mutagénesis dirigida para modificar su secuencia de aminoácidos, algunos ejemplos de estas técnicas son: la PCR de extensión por sobreposición (OE-PCR por sus siglas en inglés), mutagénesis de casete, el método de Kunkel entre otras. Esto permite cambiar la secuencia de aminoácidos y conferir o suprimir características específicas que se deseen estudiar, como la estabilidad térmica, la inmunogenicidad, propiedades estructurales o alguna otra de interés industrial, médico o farmacológico (Palomares et al., 2004).

Con los avances en el conocimiento de biología molecular y biotecnología, es relativamente sencillo producir PR. Muchas proteínas pueden ser obtenidas con algún método que utilice la tecnología de la PR. Sin embargo, antes de iniciar un proceso de producción, se debe establecer un protocolo adecuado en base a las características de la PR que se desea expresar y esto definirá, por ejemplo: el sistema de sobreexpresión, el vector de sobreexpresión, si se expresará la proteína completa o algún dominio, las posibles dificultades que se puedan presentar en el proceso, las estrategias de purificación y almacenamiento de la PR (Guevara et al., 2013)

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente la clamidiosis en caprinos es considerada una enfermedad endémica en México y no existen en el mercado pruebas diagnósticas de origen nacional a un precio accesible, por lo que se hace necesario el desarrollo de técnicas diagnósticas sensibles y específicas que permitan la identificación y el control de la clamidiosis en los rebaños nacionales.

2. HIPÓTESIS

La proteína recombinante OmpA, producida en *E. coli* BL21, conservará sus propiedades antigénicas y será reconocida por sueros de cabras positivos al cultivo celular de *Chlamydia*.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Establecer y evaluar un ELISA indirecto para el diagnóstico de la clamidiasis, basado en el uso de la proteína recombinante OmpA.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A. Inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante OmpA en *E. coli* BL21.
- B. Purificar la proteína recombinante OmpA, mediante cromatografía líquida de afinidad.
- C. Identificar la proteína recombinante pura mediante la detección de la etiqueta de Histidinas, por Western blot.
- D. Estandarizar una técnica de ELISA indirecto utilizando la proteína OmpA recombinante y sueros de caprinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE OmpA (rOmpA)

1.1 INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE rOmpA EN *E. coli* BL21

Se sembraron 100 μ l de colonias de la cepa *E. coli* BL21- pLATE/*ompA* en 10 ml de medio LB + ampicilina (100 μ g/ml). Se incubó a 37°C durante 18 h, en agitación a 200 rpm.

Posteriormente se realizó un precultivo. Para esto, se tomaron 20 μ l del cultivo anterior y se sembraron en 10 ml de medio LB + ampicilina (100 μ g/ml) y se dejó incubando a 37°C durante 18 h, en agitación a 200 rpm. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia en una dilución 1:10, a una longitud de onda de 600 nm. La absorbancia total de la muestra se obtuvo

multiplicando la absorbancia obtenida en la lectura por el factor de dilución, en este caso 10. El resultado se expresó en Unidades de Absorbancia (UA).

Una vez obtenida la absorbancia total del precultivo se realizaron los cálculos necesarios utilizando la fórmula $C_1V_1=C_2V_2$, para inocular 100 ml de medio LB + ampicilina (100 μ g/ml), con una concentración de 0.1 UA. El cultivo se incubó a 37°C, en agitación a 200 rpm y se continuó midiendo absorbancias hasta que alcanzara valores entre 0.5. Una vez alcanzado este punto el cultivo fue inducido con 1.5 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó a 37°C durante 18 h, en agitación a 200 rpm.

1.2 LISIS DEL CULTIVO *E. coli* BL21- pLATE/*ompA*, INDUCIDO

El cultivo inducido se dividió en cuatro alícuotas de 25 ml y se centrifugaron a 10 000 xg, durante 40 min. Se descartó el sobrenadante y los paquetes celulares se resuspendieron en 400 ml de Tris-HCl 50 mM.

La lisis del cultivo se realizó con homogeneizador de alta presión (AVP Gaulin 15MR-8TBA) a 525 kg/cm² durante 15 min. El lisado se recuperó y se formaron alícuotas de 25 ml que se centrifugaron a 10 000 xg durante 40 min. Se descartaron los sobrenadantes y la fracción insoluble (cuerpos de inclusión) se conservó a -20°C hasta su uso.

1.3 SOLUBILIZACIÓN DE CUERPOS DE INCLUSIÓN

En un vaso de precipitados los cuerpos de inclusión se agregaron junto con un buffer de solubilización, que contenía un gramo de dodecil sulfato de sodio (SDS), 2.5 ml de β -mercaptoetanol, 250 μ l de Tris – HCl 1 M pH 8 y 47.5 ml de agua destilada estéril. El vaso se recubrió con parafilm y se dejó en agitación a 200 rpm durante 18 h a temperatura ambiente.

1.4 DIÁLISIS DE PROTEÍNAS SOLUBILIZADAS

Se cortó un trozo de 25 cm de longitud de una membrana de celulosa (Spectrapor membrane tubing, 114158449) y se hirvió en agua destilada durante 5 min con el objetivo de abrir los poros de la membrana. Posteriormente se colocó el broche inferior a la membrana y se vertió dentro de la membrana la mezcla del buffer de solubilización con los cuerpos de inclusión. Una vez que se agregó toda la mezcla se selló la membrana con el broche superior. Este procedimiento, se debe realizar de manera rápida y sin dejar que la membrana se seque.

En un recipiente, se agregaron 2 litros de solución Tris – HCl 5 mM y la membrana dejando en agitación magnética a 250 rpm, durante 3 h a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se realizó un primer cambio de la solución Tris – HCl 5 mM y se dejó en agitación magnética a 250 rpm, durante 18 h a 4°C. Por último, se realizó nuevamente el cambio de solución Tris – HCl 5 mM y se dejó en agitación magnética a 250 rpm durante 3 h a temperatura ambiente.

1.5 DESNATURALIZACIÓN DE PROTEÍNAS

Para realizar la desnaturalización de proteínas el contenido de la membrana se vertió en una probeta para cuantificar el volumen final de la mezcla dializada.

Conociendo el volumen de la mezcla dializada se agregó Sarcosyl, para que la solución quedara en una concentración del 8%. De igual manera, se ajustó la molaridad de la solución Tris – HCl para que la mezcla tuviera una concentración final de 50 mM. La mezcla se pasó a un matraz Erlenmeyer, se tapó con parafilm y se dejó en agitación a 250 rpm a temperatura ambiente, durante 18 h. La muestra se guardó a -20°C hasta su uso.

1.6 PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

Para la purificación de la proteína recombinante, inicialmente, se realizó el equilibrio y activación de una columna de afinidad de Níquel – Sefarosa His Trap™ FF 5 ml (GE, Healthcare, GE17-5255-01).

La columna se colocó en un soporte universal y con jeringas estériles se pasó en orden estricto por la columna: 15 ml de agua destilada estéril, 2.5 ml de 0.2 M EDTA, 10 ml de 0.5 M NaOH, 15 ml de agua destilada estéril, 2.5 ml de 0.2 M NiSO₄ y 30 ml agua destilada estéril. En este punto la columna se puede guardar a 4°C para su uso posterior. El pH de la muestra se ajustó a 8 antes de ser pasada por la columna. Nuevamente en la columna se pasaron 15 ml de agua destilada estéril, 30 ml de Buffer de equilibrio (Tris-HCl 50mM), muestra (pasar 3 ml de muestra y dejar reposar 10 min, hasta que se hayan pasado 25 ml de muestra a purificar), 60 ml de buffer de lavado (Tris-HCl 50mM, 30 mM imidazol) y 15 ml de buffer de elución (Tris-HCl 50mM, 250 mM imidazol), en este paso se recolectaron las 15 eluciones de 1 ml cada uno en tubos estériles, y finalmente 30 ml de agua destilada estéril. Las eluciones se conservaron a -20°C, hasta su uso.

1.7 IDENTIFICACIÓN DE rOmpA MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS-PAGE Y WESTERN BLOT ANTI-HISTIDINAS

Las eluciones de la proteína recombinante fueron resueltas en un gel SDS-PAGE al 12%, utilizando 15 µl de proteína purificada y 5 µl de buffer de Laemmli 4x. Se cargaron dos geles en paralelo, uno para tinción con azul de Coomassie y otro para inmunotransferencia. La electroforesis se corrió a 110 voltios durante 90 min.

La inmunotransferencia se realizó en cámara húmeda. Para la detección de la proteína recombinante se realizó una transferencia de proteínas del gel SDS – PAGE, hacia una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), de la siguiente manera; se cortó un trozo de membrana de 8.5 x 5.5 cm y se sumergió durante 3 min en metanol absoluto, para que la membrana se hidratara y activara; por otra parte en un recipiente amplio que contenía Buffer de Towbin (0.037% SDS, 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 20% metanol) se sumergieron los papeles filtro, esponjas y el gel SDS – PAGE durante 5 min. Los componentes se colocaron en el siguiente orden: esponja, fibra, papel filtro, gel SDS- PAGE,

membrana PVDF, papel filtro, fibra y esponja, con el cuidado de no formar alguna burbuja entre cada capa para evitar una transferencia errónea. La transferencia se realizó a 110 voltios durante 85 min.

Una vez terminada la transferencia la membrana se bloqueó con leche descremada al 0.1% en PBS - Tween, se dejó en agitación suave durante una hora a temperatura ambiente, posteriormente se descartó la solución de bloqueo y se lavó la membrana con TBS-T 1X, tres veces, durante 5, 10 y 15 min y dos lavados con PBS 1X durante 5 min cada uno.

Se colocó el anticuerpo primario Anti – 6xHis Tag (Roche, Mannheim, Alemania) en dilución 1:5000 en 20 ml de solución de leche descremada 0.1% en PBS - Tween y se dejó en agitación durante 18 h a 4°C. Se descartó el anticuerpo primario y se lavó la membrana con TBS-T 1X, tres veces, durante 5, 10 y 15 min y dos lavados con PBS 1X durante 5 min cada uno. Se agregó el anticuerpo secundario Anti - IgG Ratón (BioRad, Hercules, EUA), en dilución 1:5000 en 20 ml de solución de leche descremada 0.1% en PBS – Tween, para el reconocimiento del anticuerpo primario que fue generado en ratón. Se dejó en agitación durante 2 h a temperatura ambiente, se descartó el anticuerpo secundario y se volvió a lavar la membrana con el protocolo antes descrito, solamente que en esta ocasión se repitió el mismo protocolo tres veces.

Para revelar la membrana se disolvieron 0.0125 gr de diaminobencidina al 97% en 20 ml de PBS 1X y se agregaron 50 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. La mezcla se colocó en un recipiente y se sumergió la membrana. Se mantuvo en agitación suave hasta que se comenzó a observar la presencia de bandas color marrón. Una vez que las bandas estuvieron bien definidas, la membrana se enjuagó con agua destilada y se dejó secar.

1.8 CUANTIFICACIÓN DE rOmpA PURIFICADA

Para conocer la concentración de la proteína pura se realizó una curva patrón de albúmina de suero bovino (BSA) a partir concentraciones estándares de 100, 50, 20, 10 y 5 µg/ml.

El ensayo se realizó utilizando el reactivo de Bradford en concentración 1:1 con la muestra y se midió a una longitud de onda de 595 nm.

2. RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO DE LA PROTEÍNA

Mediante Western blot se evaluaron 5 sueros positivos y 4 sueros negativos al diagnóstico por cultivo celular, para la identificación de *C. abortus*. Para esto se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE y una transferencia en membrana PVDF con la metodología antes descrita en la sección 1.7, solamente que en esta ocasión se utilizó como anticuerpo primario los 5 sueros positivos y 4 sueros negativos en concentración de 1:500 y como anticuerpo secundario se utilizó Anti - IgG de Cabra+HRP (Invitrogen, EEUU) en una concentración de 1:5000.

3. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO (ELISA) INDIRECTO

La proteína recombinante pura OmpA se fijó en placas de 96 pozos Maxisorp® (Thermo Scientific NUNC, EEUU) en dos concentraciones diferentes, utilizando 50 ng para la mitad de la placa y 100 ng para la segunda mitad de la placa, y utilizando como amortiguador el buffer de carbonato – bicarbonato (SIGMA, EEUU) quedando en un volumen final de 100 µl por cada pozo. La placa se tapó y se incubó a 4°C durante 18 h y se realizaron tres lavados a la placa, utilizando 200 µl de PBS-Tween 1X por cada pozo. Posteriormente la placa se bloqueó con leche descremada en polvo al 5% utilizando 100 µl por pozo. La placa se incubó a 37°C durante 2 h en agitación lenta.

Se prepararon los anticuerpos primarios. Para esto se utilizó el suero positivo en donde cualitativamente se observó una banda de mayor intensidad, lo que representaría una mayor concentración de anticuerpos dirigidos contra la proteína OmpA recombinante. Igualmente el suero negativo se seleccionó con respecto al que presentara menor o nula señal en la intensidad de la banda, representando la falta de anticuerpos dirigidos contra la proteína OmpA recombinante.

Ambos anticuerpos se prepararon en cuatro concentraciones diferentes: 1:100, 1:150, 1:250 y 1:350, en un volumen final de 100 µl y se agregaron a sus pozos correspondientes. Cada dilución de suero se realizó en cinco repeticiones. Una vez que se agregó el suero de campo positivo y negativo, la placa se incubó a 4°C durante 18 h y después fue lavada utilizando 200 µl de PBS-Tween 1X por cada pozo hasta que se observara limpia y sin residuos de leche descremada. Se agregó el anticuerpo Anti

- IgG de Cabra+HRP (Invitrogen, EEUU) en una concentración de 1:5000 y se dejó incubando a 37°C durante 2 h en agitación lenta. La placa se volvió a lavar cuatro veces con 200 µl de PBS-Tween 1X por cada pozo.

Para el revelado de la placa se prepararon 10 ml de solución de revelado en proporción 1:1, para lo que se utilizaron 5 ml de solución KPL TMB Peroxidase Substrate (A) y 5 ml de KPL Peroxidase Substrate Solution (B). Se agregaron 100 µl de solución de revelado a cada pozo, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min que fue el momento en el que se empezó a apreciar una coloración en tono azul, en este momento se agregaron 100 µl de solución de frenado (H₂SO₄ 2N). Se realizó la lectura de la placa con espectrofotómetro a 450 nm de longitud de onda.

RESULTADOS

1. SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE OMPA

1.1 DETECCIÓN DE rOmpA MEDIANTE ELECTROFORESIS DE SDS-PAGE

Para comprobar la sobreexpresión y conocer la localización de la proteína OmpA en *E. coli* BL21 se realizó el crecimiento de la cepa *E. coli* BL21- pLATE/ompA que es la que contiene el plásmido con el gen de interés. La inducción de la proteína se realizó durante la fase exponencial de crecimiento con 1.5 mM de IPTG. Posteriormente se realizó la lisis del cultivo inducido mediante alta presión y se obtuvieron la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (cuerpos de inclusión), se cargaron en un gel SDS – PAGE al 12% y se corrió la electroforesis. El gel se tiñó con Azul de Coomassie para la visualización de las proteínas.

En la figura 9 se observa la proteína en los carriles 5 y 6 que son los que corresponden a la fracción de los cuerpos de inclusión en diluciones 1:4 y 1:8 respectivamente.

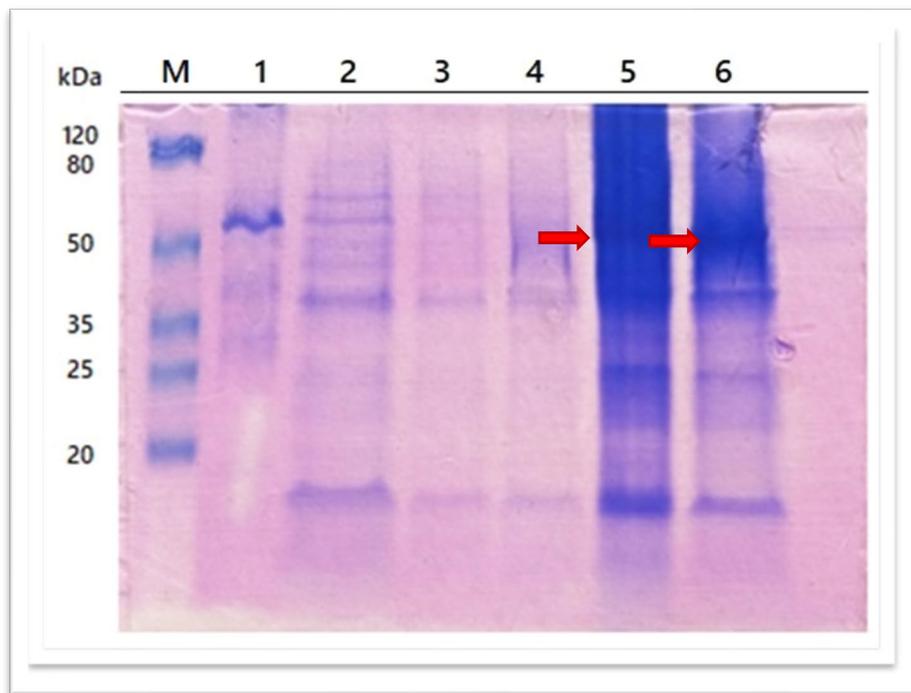


Figura 9. Determinación de la localización de la proteína recombinante OmpA. Electroforesis en SDS – PAGE al 12%. **M.** Marcador de peso molecular. **Carril 1.** C+ Proteína HN de Rubulavirus porcino. **Carril 2.** *E. coli* BL21- pLATE/ompA inducida. **Carril 3.** *E. coli* BL21- pLATE/ompA lisado completo **Carril 4.** Sobrenadante del lisado de *E. coli* BL21- pLATE31 inducida. **Carril 5.** Cuerpos de inclusión del lisado *E. coli* BL21- pLATE31 inducida, dilución 1:4. **Carril 6.** Cuerpos de inclusión del lisado *E. coli* BL21- pLATE31 inducida, dilución 1:8.

Una vez observada la proteína recombinante se comparó contra la cepa *E.coli* BL21 pLATE 31 que corresponde al control negativo. En la figura 10 se muestra la presencia de la proteína rOmpA únicamente en los cuerpos de inclusión de la cepa inducida *E.coli* BL21- pLATE/ompACa en el carril 1 mientras que la cepa inducida cepa *E.coli* BL21 pLATE 31 no presenta producción de la proteína OmpA (Carril 3)

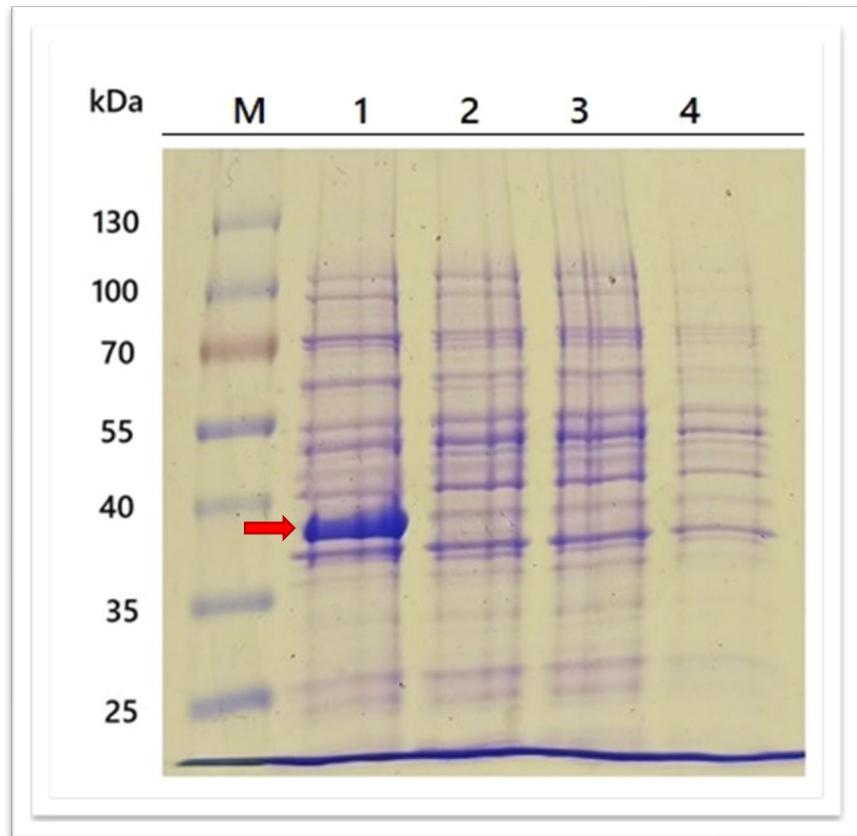


Figura 10. Inducción de *E. coli* BL21-pLATE/ompACa. Electroforesis en SDS – PAGE al 12%. **M.** Marcador de peso molecular. **Carril 1.** *E. coli* BL21- pLATE/ompA inducida. **Carril 2.** *E. coli* BL21- pLATE/ompA no inducida. **Carril 3.** *E. coli* BL21- pLATE31 inducida. **Carril 4.** *E. coli* BL21- pLATE31 no inducida. La flecha roja señala la banda de mayor intensidad que corresponde a la proteína rOmpA.

1.2 DETECCIÓN DE rOmpA MEDIANTE WESTERN BLOT

Posteriormente se realizó una transferencia en membrana PVDF de los geles anteriores, para corroborar la presencia de la proteína OmpA recombinante mediante el anticuerpo monoclonal Anti-6His-Tag. La membrana se reveló con diaminobencidina mostrando una banda aproximada de 38 kDa que corresponde al peso molecular de la proteína recombinante, con la ausencia del péptido señal, el cual fue omitido en la construcción del plásmido pLATE/*ompA*Ca. Por lo anterior, se verifica que al inducir la cepa *E. coli* BL21- pLATE/*ompA*Ca con IPTG, hubo una sobreexpresión de la proteína recombinante y quedó localizada en cuerpos de inclusión (Figura 11 y 12).

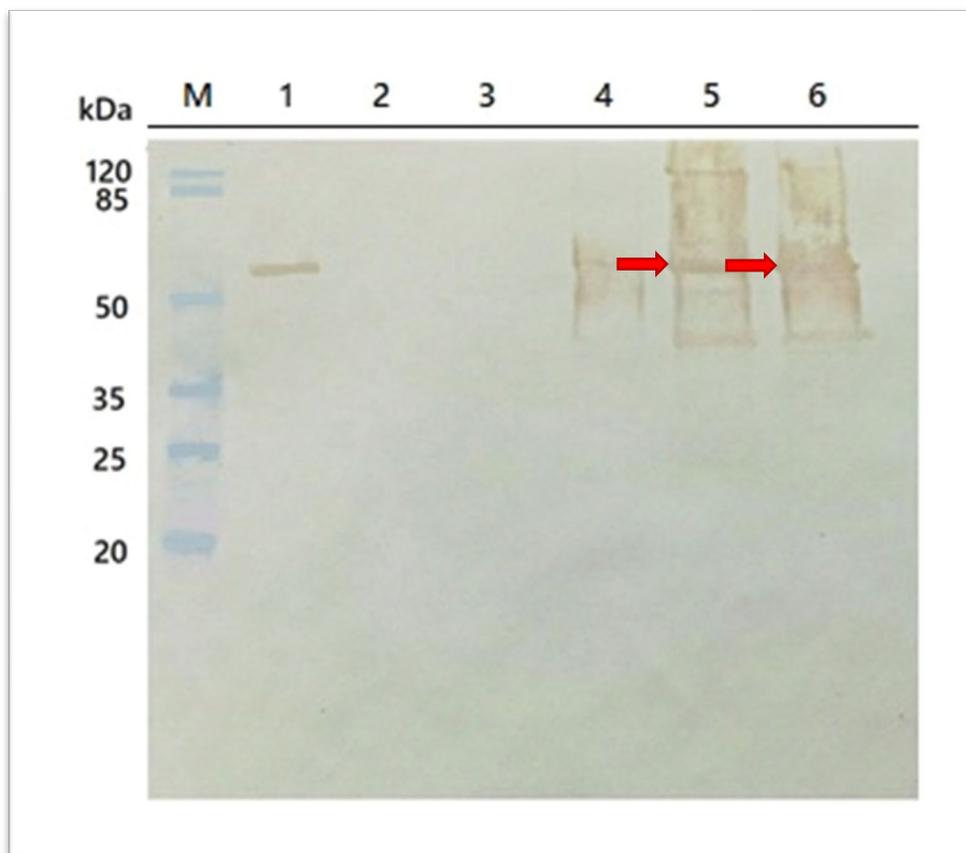


Figura 11. Western blot para la identificación de etiqueta de Histidinas de la proteína recombinante OmpA en cuerpos de inclusión. **M.** Marcador de peso molecular. **Carril 1.** Control (+) Proteína HN de *Rubulavirus* porcino purificada de 66 kDa. **Carril 2.** BL21- pLATE/*ompA* inducida. **Carril 3.** BL21- pLATE/*ompA* inducida con tratamiento de lisis celular. **Carril 4.** Sobrenadante de BL21- pLATE/*ompA* inducida. **Carril 5.** Cuerpos de Inclusión de BL21- pLATE/*ompA* inducida en dilución 1:4. **Carril 6.** Cuerpos de Inclusión de BL21- pLATE/*ompA* inducida en dilución 1:8.

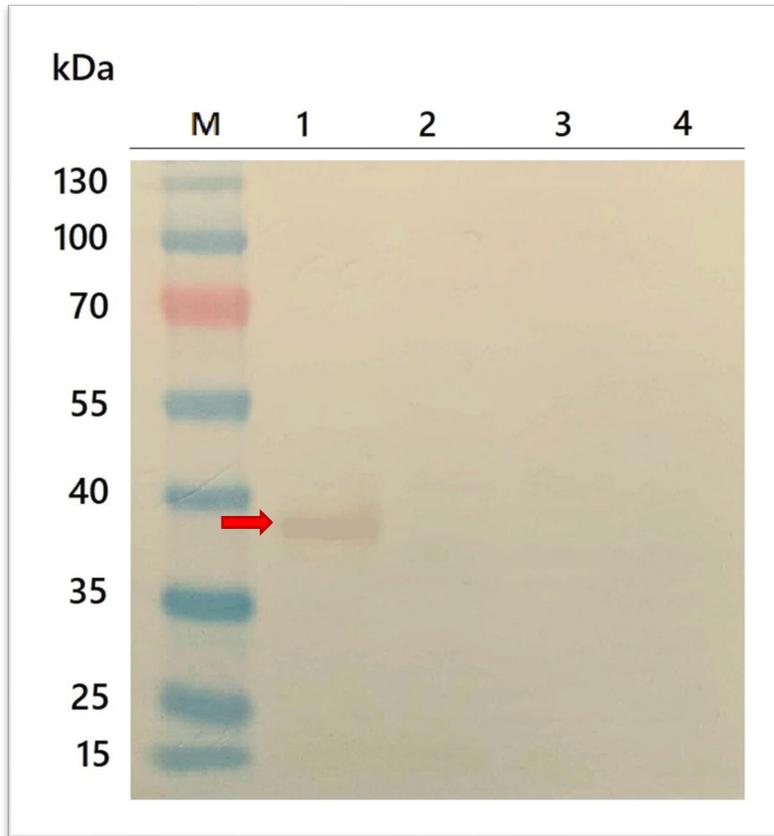


Figura 12. Western blot para la identificación de etiqueta de histidinas de la proteína recombinante OmpA producida durante la inducción de *E. coli* BL21-pLATE/ompACa. **M.** Marcador de peso molecular. **Carril 1.** BL21- pLATE/ompA inducida. **Carril 3.** BL21- pLATE/ompA no inducida. **Carril 3** BL21- pLATE31 inducida. **Carril 4.** BL21- pLATE31 no inducida. La flecha roja señala la identificación de rOmpA mediante anticuerpo anti-6 His-Tag.

2. PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE OMPA

2.1 IDENTIFICACIÓN DE rOmpA PURIFICADA MEDIANTE ELECTROFORESIS SDS – PAGE

Una vez que a un cultivo inducido de 100 ml se le dio el tratamiento de lisis, solubilización y desnaturalización, se purificó mediante cromatografía por afinidad con una columna de Níquel – Sefarosa His Trap™ FF 5 ml (GE, Healthcare, GE17-5255-01) y las eluciones se resolvieron en un gel SDS – PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie (Figura 13 A y B), y se cuantificaron mediante la técnica de Bradford obteniendo una concentración de 9 µg/mL cuantificada.

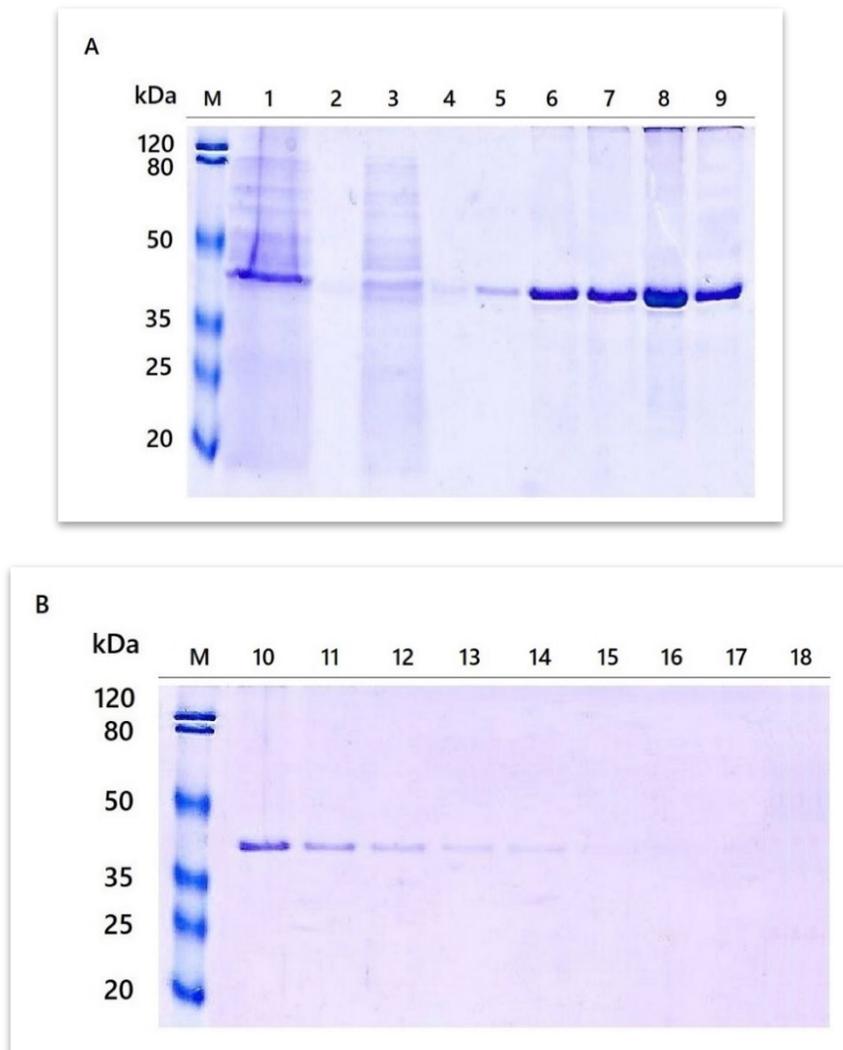


Figura 13. rOmpA purificada por cromatografía de afinidad. Electroforesis en SDS – PAGE al 12%. **M.** Marcador de peso molecular. **Carril 1.** Muestra en solubilizada y desnaturalizada. **Carril 2.** Elución del lavado. **Carril 3.** Elución de la proteína no pegada. **Carril 4 – 9, 10 - 18.** Eluciones de la proteína purificada.

2.2 IDENTIFICACIÓN DE rOmpA PURIFICADA MEDIANTE WESTERN BLOT

De igual manera se confirmó la presencia de la proteína purificada mediante la identificación con el anticuerpo anti 6 His-Tag. En la figura 14 se observa la identificación de la proteína recombinante purificada.

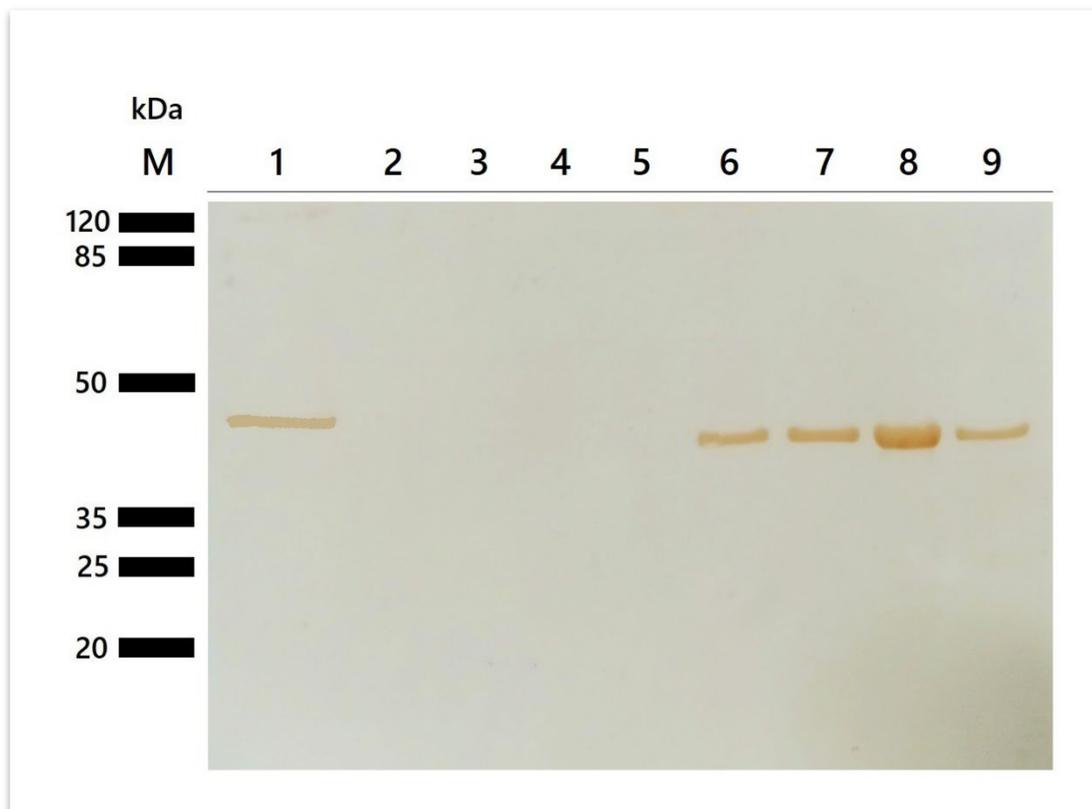


Figura 14. Western blot para el reconocimiento de la proteína recombinante purificada. **M.** Marcador de peso molecular. **Carril 1.** Muestra solubilizada y desnaturalizada. **Carril 2.** Elución del lavado. **Carril 3.** Elución de la proteína no pegada **Carril 6 – 10.** Eluciones de la proteína purificada.

3. RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE OMPA

En un ensayo de Western blot la cepa *E. coli* BL21- pLATE/ompA inducida, fue enfrentada a un pool de 5 sueros positivos al aislamiento mediante cultivo celular. En la figura 15 se observa la detección

de la proteína rOmpA por los anticuerpos presentes en sueros de campo y el reconocimiento de otras proteínas propias de *E. coli* BL21.

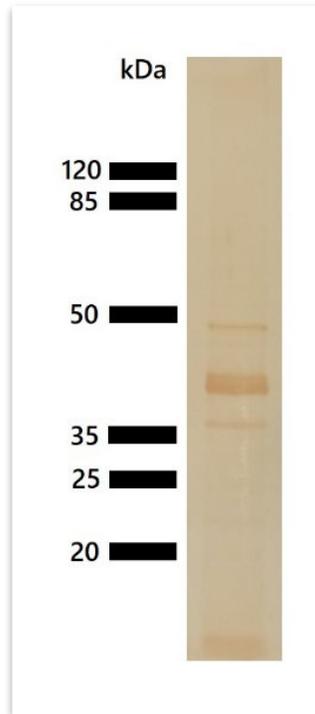


Figura 15. Western blot de la cepa BL21- pLATE/ompA inducida, enfrentada a pool de sueros positivos a cultivo celular y revelado por diaminobencidina.

Posteriormente se evaluó de manera individual la reacción a la proteína recombinante purificada de cinco sueros positivos y cuatro sueros negativos a cultivo celular, y se pudo observar una mayor reacción en los sueros de animales positivos a cultivo celular (Figuras 16 y 17). Se eligió el suero F93 como positivo y el 3393 como negativo para desarrollar el ELISA indirecto.

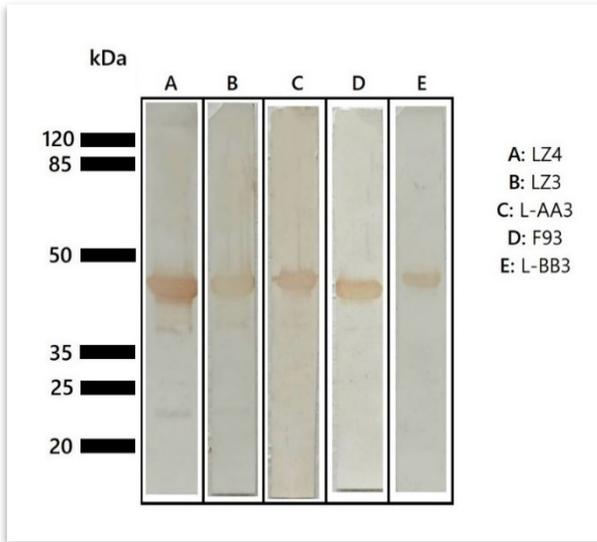


Figura 16. Western blot de rOmpA enfrentado a sueros de cabras positivas a *C. abortus* por aislamiento en cultivo celular.

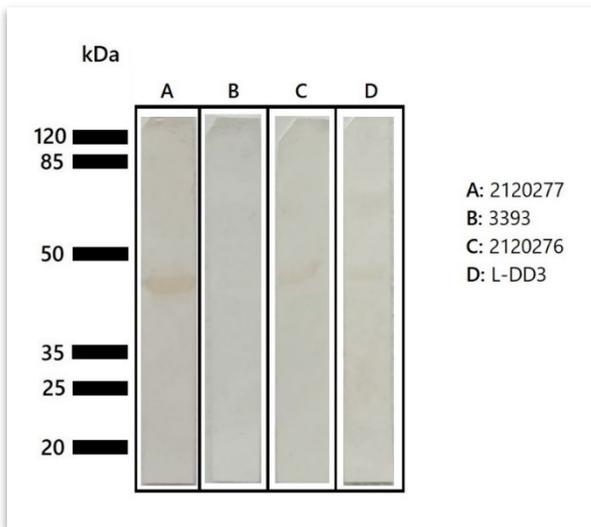


Figura 17. Western blot de rOmpA enfrentado a sueros de cabras negativas a *C. abortus* por cultivo celular. Se observan bandas en A, C y D

4. ESTANDARIZACIÓN DEL ELISA INDIRECTO

Se probaron dos diferentes concentraciones del antígeno, 50 y 100 ng y cuatro diluciones diferentes de los sueros de campo 1:100, 1:150, 1:250, 1:350 y los resultados de las lecturas obtenidas se muestran en el cuadro 2.

De acuerdo con las densidades ópticas obtenidas en los blancos, muestran lecturas muy bajas lo que sugiere que no existe ruido de fondo, que pueda afectar las lecturas de los sueros de campo.

Cuadro 2. Densidades ópticas obtenidas en la estandarización de la técnica de ELISA indirecto. En las columnas 1 y 7 se muestran las D.O. de los blancos de la prueba. **Fila A y E.** Dilución 1:100. **Fila B y F.** Dilución 1:150. **Fila C y G.** Dilución 1:250. **Fila D y H.** Dilución 1:350. Para cada suero se realizaron cinco repeticiones.

		50 nanogramos						100 nanogramos					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Suero negativo	A	0.036	0.321	0.418	0.399	0.464	0.437	0.089	0.455	0.492	0.457	0.589	0.545
	B	0.040	0.286	0.349	0.328	0.346	0.315	0.061	0.396	0.365	0.395	0.443	0.392
	C	0.048	0.194	0.209	0.217	0.221	0.183	0.058	0.266	0.228	0.238	0.278	0.292
	D	0.038	0.198	0.221	0.215	0.272	0.256	0.064	0.235	0.230	0.230	0.244	0.230
Suero positivo	E	0.046	0.531	0.561	0.517	0.513	0.507	0.056	0.789	0.804	0.819	0.846	0.834
	F	0.044	0.387	0.410	0.396	0.388	0.386	0.059	0.543	0.570	0.578	0.671	0.651
	G	0.045	0.307	0.333	0.300	0.306	0.344	0.059	0.479	0.494	0.459	0.481	0.444
	H	0.049	0.177	0.185	0.199	0.338	0.188	0.062	0.288	0.309	0.270	0.301	0.333

Con las densidades ópticas que se obtuvieron, se realizaron cuadros para resumir los promedios y las desviaciones estándar de cada dilución de suero, en las dos diferentes concentraciones de proteína utilizada. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics para Windows, versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedios y desviaciones estándar para el suero negativo en sus diferentes diluciones, utilizando 50 ng de proteína purificada.

50 ng de antígeno en placa				
	OD 1:100	OD 1:150	OD 1:250	OD 1:350
Sneg1	0.321	0.286	0.194	0.198
Sneg2	0.418	0.349	0.209	0.221
Sneg3	0.399	0.328	0.217	0.215
Sneg4	0.464	0.346	0.221	0.272
Sneg5	0.437	0.315	0.183	0.256
Prom	0.408	0.325	0.205	0.232
DS	0.054	0.026	0.016	0.031

(Sneg: suero negativo; Prom: Promedio; DS: desviación estándar).

Cuadro 4. Promedios y desviaciones estándar para el suero positivo en sus diferentes diluciones, utilizando 50 ng de proteína purificada.

50 ng de antígeno en placa				
	OD 1:100	OD 1:150	OD 1:250	OD 1:350
Spos1	0.531	0.387	0.307	0.177
Spos2	0.561	0.410	0.333	0.185
Spos3	0.517	0.396	0.300	0.199
Spos4	0.513	0.388	0.306	0.338
Spos5	0.507	0.386	0.344	0.188
Prom	0.526	0.393	0.318	0.217
DS	0.022	0.010	0.019	0.068

(Spos: suero positivo; Prom: Promedio; DS: desviación estándar).

Cuadro 5. Promedios y desviaciones estándar para el suero negativo en sus diferentes diluciones, utilizando 100 ng de proteína purificada.

100 ng de antígeno en placa				
	OD 1:100	OD 1:150	OD 1:250	OD 1:350
Sneg1	0.455	0.396	0.266	0.235
Sneg2	0.492	0.365	0.228	0.230
Sneg3	0.457	0.395	0.238	0.230
Sneg4	0.589	0.443	0.278	0.244
Sneg5	0.545	0.392	0.292	0.230
Prom	0.508	0.398	0.260	0.234
DS	0.058	0.028	0.027	0.006

(Sneg: suero negativo; Prom: Promedio; DS: desviación estándar).

Cuadro 6. Promedios y desviaciones estándar para el suero positivo en sus diferentes diluciones, utilizando 100 ng de proteína purificada.

100 ng de antígeno en placa				
	OD 1:100	OD 1:150	OD 1:250	OD 1:350
Spos1	0.789	0.543	0.479	0.288
Spos2	0.804	0.570	0.494	0.309
Spos3	0.819	0.578	0.459	0.270
Spos4	0.846	0.671	0.481	0.301
Spos5	0.834	0.651	0.444	0.333
Prom	0.818	0.603	0.471	0.300
DS	0.023	0.055	0.020	0.024

(Spos: suero positivo; Prom: Promedio; DS: desviación estándar).

A partir de los datos anteriores, se realizaron cuadros para calcular la diferencia entre los promedios del suero positivo y el negativo en cada una de las diluciones utilizadas, para poder observar en cual dilución existe una mayor diferencia y obtener un margen que permita diferenciar entre un suero que sea positivo y uno negativo. También se realizó una prueba T de Student para saber si esta diferencia que existía entre cada dilución era significativa ($P < 0.05$). El análisis estadístico se realizó utilizando el programa IBM SPSS Statistics para Windows, versión 21.0 (IBM Corp., Armonk, NY) (Cuadro 7 y 8).

Cuadro 7. Diferencias entre promedios de suero positivo y negativo, en placa con 50 ng de antígeno.

50 ng de antígeno en placa				
	Prom Spos	Prom Sneg	Diferencia	Prueba T
OD 1:100	0.526	0.408	0.118	0.002
OD 1:150	0.393	0.325	0.069	0.001
OD 1:250	0.318	0.205	0.113	0.000
OD 1:350	0.217	0.232	-0.015	0.664

(Prom Spos: Promedio de suero positivo; Prom Sneg: promedio de suero negativo).

Cuadro 8. Diferencias entre promedios de suero positivo y negativo, en placa con 100 ng de antígeno.

100 ng de antígeno en placa				
	Prom Spos	Prom Sneg	Diferencia	Prueba T
OD 1:100	0.818	0.508	0.311	0.000
OD 1:150	0.603	0.398	0.204	0.000
OD 1:250	0.471	0.260	0.211	0.000
OD 1:350	0.300	0.234	0.066	0.000

(Prom Spos: Promedio de suero positivo; Prom Sneg: promedio de suero negativo).

La prueba fue significativa para todas las diluciones utilizadas en las dos diferentes concentraciones de proteína, a excepción de la dilución 1:350 con 50 ng de antígeno. También se puede observar que las diferencias entre los promedios de los sueros positivos y negativos son mayores para la placa que se fijó con 100 ng de proteína recombinante. A comparación de la placa en la que se usaron 50 ng de proteína recombinante en donde se observan diferencias menores. Por lo que se eligió la concentración de 100 ng de proteína recombinante con la dilución de suero de 1:100, como concentraciones óptimas de la prueba.

DISCUSIÓN

El presente trabajo utilizó la proteína recombinante OmpA producida en el sistema de expresión *E. coli* BL21. Esta cepa se desarrolló en un trabajo previo realizado por Santiago (2019), en donde la proteína de interés se clonó en el vector de expresión pLATE31 que le confiere una etiqueta de seis histidinas para facilitar su identificación y su purificación.

La necesidad de desarrollar tecnologías en el campo del diagnóstico serológico se da a partir de la poca disponibilidad y los altos costos de las pruebas serológicas comerciales. En función de estas problemáticas se decidió comenzar con el desarrollo de pruebas nacionales que tengan mayor disponibilidad y accesibilidad. Con anterioridad se realizó un ELISA indirecto, utilizando como antígeno, cuerpos elementales, obteniendo una especificidad de 66.6% y sensibilidad de 75% (Martínez, 2013). Este trabajo ha sido desde entonces un antecedente para enfocar esfuerzos hacia la elaboración de pruebas que puedan mejorar estos parámetros, por lo que el uso de proteínas recombinantes era necesario utilizarlas como la base para el desarrollo de un ELISA indirecto de origen nacional.

Las proteínas se consideran como los inmunógenos más potentes por lo que pueden desencadenar una buena respuesta inmune y por lo tanto ser reconocidas por los anticuerpos. Sin embargo, deben cumplir con ciertas características como pesar más de 10 kDa y tener una estructura compleja (Pavón et al., 2016), que permitirán la elección de antígenos para el diagnóstico serológico, por lo que es necesario tener conocimiento previo de las propiedades que posean las proteínas de interés. La gran mayoría de las investigaciones se han centrado en la superficie de *Chlamydia* ya que es el sitio crucial de interacción entre el microorganismo y el hospedero. Por lo tanto, se han realizado esfuerzos para analizar el papel de las proteínas expuestas en la superficie para el proceso de infección (Jones et al., 2000). Una de las proteínas más estudiadas es la proteína principal de la membrana externa (OmpA) de entre 37 a 40 kDa, que comprende aproximadamente el 60 % del complejo total de proteínas de la membrana externa del cuerpo elemental infeccioso (CE) de la bacteria. OmpA de clamidia contiene cuatro dominios expuestos en la superficie de secuencias altamente variables (VS1 a VS4) que se encuentran dispersos entre cinco segmentos altamente conservados (CS1 a CS5) (Stephens et al., 1987). Se expresa en todas las etapas del ciclo de desarrollo de *Chlamydia* y, por lo tanto, se considera que tiene actividad en varios procesos biológicos importantes. Es altamente inmunoaccesible e inmunogénica y alberga epítomos específicos de género, especie y serotipo que provocan respuestas de células T y anticuerpos neutralizantes (Su y Caldwell, 1991). Funcionalmente, OmpA es una adhesina que actúa en la unión a la superficie de la célula del hospedero (Su et al., 1988) y se comporta

como otras porinas bacterianas, formando canales hidrofílicos de iones y nutrientes en la membrana externa de la bacteria (Wyllie et al., 1998, 1999). En *C. abortus*, se ha demostrado una forma oligomérica de 110 kDa, probablemente por la formación de trímeros que confiere inmunidad protectora (De Sa et al., 1995; McCafferty et al., 1995; Wyllie et al., 1998). Por esta razón OmpA ha sido seleccionada como un “antígeno diana” para pruebas serológicas (Salti-Montesanto et al., 1997; Vretou et al., 2007; McCauley et al., 2007; Forsbach-Birk et al., 2010), pruebas moleculares (Kaltenboeck et al., 1997; Yoshida et al., 1998; Pantchev et al., 2010) y desarrollo de vacunas (Dong-Ji et al., 2000; Pal et al., 2001). Sin embargo, los estudios sobre la naturaleza y la función biológica de OmpA se han visto gravemente limitados por problemas como las dificultades de cultivar a la bacteria en grandes cantidades, y otra de mayor importancia, que OmpA nativa es particularmente difícil de purificar y reconstituir (Stephens et al., 1985).

Por esta razón, el desarrollo de proteínas recombinantes ha significado un apoyo al mejoramiento de las limitantes antes mencionadas. La expresión de OmpA recombinante en *Escherichia coli* ha sido descrita por varios grupos (Pickett et al., 1988; Kaul et al., 1990; Koehler et al., 1992; Dascher et al., 1993; Manning y Stewart, 1993; Su et al., 1996; Wyllie et al., 1999; Jones et al., 2000). Sin embargo, la mayoría de los estudios se refieren a especies de *Chlamydia* de importancia humana y existen pocos protocolos publicados para la expresión constante de OmpA de longitud completa son escasos y no son referentes para clamidias significativas en medicina veterinaria.

Hoelzle et al en el 2003 desarrolló las clones y expresión de genes que codifican OmpA de las tres especies de *Chlamydia* de importancia en veterinaria, *C. abortus*, *C. pecorum* y *C. suis*, mediante el uso del plásmido inducible por arabinosa pBADMyHis. Las clonaciones se realizaron de dos maneras, con el péptido señal íntegro y sin el péptido señal. En el presente trabajo para la producción de la proteína recombinante se utilizó la cepa cuya construcción carece de péptido señal, obteniendo los mismos resultados que Hoelzle et al (2003), es decir, que la proteína rOmpA se expresó dando la formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma de la cepa transformante *E. coli* BL21. Los cuerpos de inclusión (CI) se forman durante la expresión de alto nivel de proteínas heterólogas en *E. coli* (Fahnert et al., 2004; Villaverde y Carrio. 2003). La formación de agregados de cuerpos de inclusión impone un desafío importante en la purificación de la proteína recombinante a partir de *E. coli*, por lo que la información sobre las propiedades físicas y estructurales de los CI durante las condiciones de expresión es necesaria para desarrollar procedimientos de solubilización que puedan dar como resultado una mejor recuperación de la proteína bioactiva (Palmer y Wingfield. 2012). Se

debe considerar también que la naturaleza de la proteína OmpA la vuelva particularmente difícil de purificar y reconstituir debido a la presencia de enlaces disulfuro, por lo que, en este trabajo se utilizó β -mercaptoetanol como agente reductor que actúa sobre dichos enlaces, logrando obtener una buena purificación de la proteína recombinante (Figura 13 A y B) a pesar de que se localizó en mayor proporción en cuerpos de inclusión (Figura 9).

Se ha detectado que la expresión basal de OmpA producida en *E. coli* puede ejercer efectos tóxicos en el hospedero procarionte, deteniendo la expresión de proteínas (Pickett et al., 1988) y en la figura 10 se puede observar que es necesaria la inducción con IPTG para el inicio de la expresión del vector y su traducción a estructura proteica, y no se observa ninguna producción de proteína recombinante en la cepa que no ha sido inducida. Por lo tanto, los transformantes de *E. coli* BL21 podrían entrar en la fase de crecimiento logarítmico sin verse afectados por niveles de rOmpA con un posible efecto citotóxico, y la inducción posterior de cultivos con IPTG dio como resultado la expresión de rOmpA de *C. abortus*.

Después de la solubilización de los cuerpos de inclusión, se realizó una diálisis en membrana de celulosa para permitir el replegamiento de la proteína recombinante. En este proceso se eliminó el exceso de agentes desnaturalizantes y reductores, permitiendo que la proteína vuelva a su estructura normal (Clark, 1998). Posteriormente la proteína rOmpA se purificó utilizando una columna de Niquel-Sefarosa. A partir de un cultivo en lotes el rendimiento obtenido aproximado fue de 9 $\mu\text{g/ml}$. Mientras que Hoelzle et al., 2003 obtuvieron un rendimiento de 10 $\mu\text{g/ml}$ para la proteína OmpA de *C. abortus* y *C. pecorum* que carecían de péptido señal y rendimiento de 1 $\mu\text{g/ml}$ para OmpA de *C. suis*, que poseía péptido señal. Este rendimiento parecido en ambos trabajos podría deberse a que, al no poseer péptido señal, se evita algún procesamiento posterior a la traducción y la translocación de rOmpA y naturalmente la proteína se mantendrá acumulada en el citoplasma dando pie a la formación de los cuerpos de inclusión, siendo de mayor beneficio para la evaluación de las características inmunogénicas o antigénicas de la proteína recombinante.

En este panorama, otra de las ventajas que presenta la formación de cuerpos de inclusión es la poca acción que tienen las proteasas sobre estas estructuras, manteniendo a la PR protegida de la degradación. Cabe mencionar que la cepa *E. coli* BL21 no contiene la proteasa lon y es deficiente en la proteasa de la membrana externa OmpT, la falta de estas dos proteasas reduce la degradación de proteínas recombinantes expresadas en esta cepa bacteriana (Yin et al., 2007).

Una vez que se obtuvo la proteína recombinante purificada, se identificó por Western blot a través de la etiqueta de seis histidinas que posee, mediante el anticuerpo anti 6x-His Tag y también se evaluó con sueros de campo de animales detectados como positivos y negativos al cultivo celular.

Para evaluar los sueros de campo, se utilizaron cinco sueros de animales que resultaron positivos al aislamiento por cultivo celular en donde se puede observar una banda intensa que se ubica a los 38 kDa aproximadamente (Figura 16), sugiriendo un nivel alto de anticuerpos contra la proteína OmpA. Para evaluar a los animales que tuvieron resultados negativos al aislamiento por cultivo celular, se utilizaron cuatro sueros, de los cuales en tres de ellos se observa la presencia de la banda de reconocimiento a la proteína rOmpA, y únicamente en un suero no se observa ninguna presencia de reacción hacia la proteína recombinante (Figura 17). Una vez analizados los sueros se eligieron únicamente dos de ellos, para utilizarlos en el diseño del ELISA indirecto. Para el suero negativo se eligió el único que no presentó reacción en el Western blot, identificado como 3393, mientras que para el suero positivo se eligió el suero F93, ya que fue el que su reacción identificó una banda mejor definida y sin presencia de otras bandas de menor peso molecular, lo cual limitó la posibilidad de establecer un punto de corte para la prueba.

Una clave para comprender el desempeño variable de los anticuerpos es determinar los sitios de unión, o epítomos, que reconocen. Los epítomos generalmente se dividen en dos categorías, epítomos lineales donde un tramo de aminoácidos continuos es suficiente para la unión y epítomos conformacionales donde los residuos de aminoácidos clave se unen mediante el plegamiento de proteínas (Sela et al., 1967). Por lo tanto, los anticuerpos dirigidos a epítomos lineales serán visibles en técnicas en donde las proteínas tengan un proceso de desnaturalización total o parcial durante la preparación de la muestra antes del inmunoensayo, como sucede en el Western blot, inmunohistoquímica (IHC) o microscopía confocal basada en inmunofluorescencia; mientras que los anticuerpos contra epítomos conformacionales se refieren a aquellos en donde involucran proteínas en su estado nativo, por ejemplo, en la citometría de flujo o técnicas de ELISA (Forsström et al., 2015).

En nuestro estudio se observó una reacción de los sueros de campo hacia la proteína recombinante tanto para la técnica por Western blot y por técnica de ELISA, lo que sugiere que los animales infectados naturalmente tienen la capacidad de desarrollar anticuerpos contra epítomos lineales y conformacionales. Lo que nos indica como conclusión inicial que la proteína recombinante que se

produjo en *E. coli* BL21 conserva su capacidad antigénica, y se confirma con la reacción visible, al enfrentarse a los sueros de campo.

Para desarrollar el ELISA indirecto, la proteína recombinante se pegó a una placa de Maxisorp® (Thermo Scientific NUNC. EEUU) en dos diferentes concentraciones por pozo, de 50 y 100 ng. Dentro del desarrollo de pruebas de ELISA para la detección de infecciones provocadas por el género *Chlamydia*, se han empleado diferentes concentraciones de antígeno en las placas, por ejemplo, se diseñó un ELISA para la detección de *C. suis* en cerdos, utilizando, como antígeno un péptido específico de esta especie de 8 aminoácidos de la proteína PmpC y para cada pozo se agregaron 100 µg del péptido purificado. Aunque existe una gran diferencia entre las concentraciones, se debe tomar en cuenta los tamaños de los antígenos empleados, ya que en el presente trabajo se realizó la clonación de la proteína OmpA completa, únicamente eliminando el péptido señal, teniendo una proteína de aproximadamente 380 aminoácidos. Otro estudio en el que se realizó la clonación de OmpA de *C. trachomatis* en donde incluyeron a los cuatro segmentos variables, debido a que en esta especie se ha observado que las regiones VS1, VS2 y VS4 estimulan la respuesta humoral y la región VS3 estimula la respuesta celular, utilizando una concentración de 1 µg en sus ensayos (de Haro et al., 2019).

Para estandarizar la dilución óptima de suero se utilizaron cuatro diferentes diluciones, siendo estas, 1:100, 1:150, 1:250, 1:350 y una vez que la placa se leyó a una longitud de onda de 450 nm, se observó que las absorbancias del suero negativo eran altas y no tenían una gran diferencia en comparación con las absorbancias que se obtuvieron del suero positivo. Para poder entender acerca de estos resultados obtenidos se debe conocer el comportamiento inmunológico que mantiene en un animal infectado una vez que ha abortado. Durante la infección a sus hospedadores, *Chlamydia* se enfrenta al estrés impuesto por la respuesta inmunitaria o por la administración de agentes antimicrobianos y derivado de hallazgos experimentales acerca de los mecanismos de inducción de un estado de persistencia *in vitro*, tales como el efecto de citocinas, hormonas entre otros, es razonable especular que la bacteria puede entrar en un estado de persistencia *in vivo*. Esta evidencia del estado de persistencia *in vivo*, proviene de la observación directa de cuerpos aberrantes en los tejidos infectados. Por ejemplo, por medio de inmunomicroscopía electrónica con oro, se han observado cuerpos aberrantes de *C. pneumoniae* en tejido aterosclerótico de pacientes humanos (Borel et al., 2008). De manera similar, se detectaron CA de *C. suis* mediante inmunohistoquímica e inmunomicroscopía electrónica con oro en el intestino de cerdos infectados naturalmente (Pospischil

et al., 2009). Además, los CA de *C. muridarum* estaban presentes en células endocervicales utilizando un modelo de infección del tracto genital femenino en ratones (Rank et al., 2011; Phillips Campbell et al., 2012). También se identificó la presencia de CA en células endocervicales obtenidas de una mujer con cervicitis por *C. trachomatis* (Lewis et al., 2014). Si bien la observación de CA en tejidos infectados no indica necesariamente una infección persistente, la capacidad ampliamente demostrada de *Chlamydia* para causar infecciones persistentes, asintomáticas, crónicas y reactivaciones aparentes es muy sugestiva. Con respecto a la reactivación en una infección natural, la evidencia que existe es indirecta. Un estudio basado en modelos de infección en ratones se observó que *C. pneumoniae* puede reactivarse en los pulmones semanas después de la inoculación inicial con el tratamiento con cortisona, pero no en animales inmunocompetentes, lo que sugiere fuertemente que las respuestas inmunitarias contra *Chlamydia* provocan que estas bacterias entren en un estado persistente en los tejidos infectados (Malinverni et al., 1995; Laitinen et al., 1996). Además, la detección molecular de antígenos de *Chlamydia*, en muestras clínicas y con la ausencia de un cultivo celular positivo, puede sugerir un estado persistente que ocurre *in vivo* (Hogan et al., 2004). Sin embargo, cabe señalar que la detección de moléculas relativamente estables, como el ADN o los antígenos proteicos, no indica necesariamente la presencia de organismos viables y, por lo tanto, no es una prueba concluyente de un fenotipo persistente *in vivo* (Suchland et al., 2017).

En infecciones por *C. abortus* la persistencia puede ocurrir cuando las ovejas se infectan mientras no están gestantes o durante la última etapa de la gestación. Estas ovejas abortarán durante la gestación posterior (Rodolakis et al., 1998), mientras que las ovejas que abortan una vez por *Chlamydia abortus*, no vuelven a abortar durante al menos 3 a 4 años. Si bien la inmunidad materna previene los abortos repetidos, las ovejas que han abortado debido a una infección por *C. abortus* eliminan posteriormente al microorganismo en las secreciones vaginales durante el estro, presentan títulos persistentemente bajos (Papp et al., 1993) y mantienen una respuesta persistente de anticuerpos hasta por dos años (Papp et al., 1994). Experimentalmente se ha demostrado que dos años después de la inoculación intranasal en ovejas muestran gestaciones y partos normales, las placentas presentan características macroscópicas normales y al igual que en hisopos vaginales, no se pudo detectar al microorganismo *C. abortus* mediante la tinción de Ziehl-Neelsen modificada y qPCR. A pesar de estas características los niveles de anticuerpos específicos de *Chlamydia* de las ovejas abortadas disminuyen constantemente durante el período del primer año después de la infección, sin embargo, permanecen en un nivel elevado hasta el segundo año después de la infección (Longbottom et al., 2013). Con esta

información se puede sugerir que los sueros de los cuatro animales cuyo resultado al cultivo celular fue negativo, podrían encontrarse en un estado de persistencia, por lo que técnicas como la observación directa del microorganismo por cultivo celular o tinciones y la detección molecular darían resultados negativos, mientras que serológicamente los animales tienen presencia de títulos altos contra *C. abortus*, que son dirigidos tanto a epítomos lineales como conformacionales, ya que la reacción visible de la unión de anticuerpos específicos al antígeno, es visible en Western blot y ELISA indirecto.

En nuestro ensayo se obtuvieron absorbancias elevadas al realizar la prueba en las condiciones establecidas con el suero negativo; sería necesario obtener un mayor número de muestras para poder establecer un punto de corte empleando este antígeno. El objetivo de establecer un valor límite es maximizar la probabilidad de identificar un verdadero positivo y minimizar los resultados falsos negativos en una población que a menudo se encuentra superpuesta (Wild, 2013). La importancia de los resultados falsos negativos o falsos positivos depende de los niveles requeridos de sensibilidad diagnóstica frente a la especificidad. Establecer un punto de corte de dos o tres veces la desviación estándar del grupo de control negativo es la práctica aceptada y más común. Esto supone que existe una estadística de distribución normal en ambos tipos de población y que se está midiendo un procedimiento de muestreo representativo para toda la población. La razón aquí es que se espera que aproximadamente el 95% de las observaciones distribuidas normalmente se encuentren dentro de un rango de la media más dos veces la desviación estándar (Crowther. 2000). Lo que hace necesario realizar evaluaciones previas de más de un suero para los controles negativos, es por esto que, para continuar con la validación de la técnica de ELISA aquí establecida, se recomienda utilizar sueros de animales de rebaños libres de enfermedades abortivas, que puedan ayudar a obtener un comportamiento de datos en distribución normal y de esta manera, poder disminuir la línea de corte de la prueba, mejorando así su especificidad y evitando obtener gran cantidad de resultados falsos negativos.

En la actualidad la búsqueda de proteínas con potencial inmunogénico y la observación del comportamiento de los datos en pruebas de ELISA, ha servido no sólo para diagnosticar a los animales, sino también para la predicción de futuros abortos. De manera experimental, se encontró que los niveles de anticuerpos contra *Chlamydia abortus* eran más altos después del desafío en ovejas que abortaron en comparación con las ovejas que tenían corderos vivos (O'Neil et al., 2018). También se ha asociado el aumento en los niveles de anticuerpos con falla reproductiva en *C. abortus* (Papp et

al., 1994; Wilsmore et al., 1990). Esta alerta temprana de abortos podría tener beneficios significativos en términos de dirigir un tratamiento de antimicrobianos de acción prolongada, o bien un mejor manejo de estos animales en las etapas previas, durante y después del parto para conseguir una desinfección adecuada de áreas y residuos biológicos contaminados.

Considerando los beneficios que proporciona una buena técnica de diagnóstico serológico el presente trabajo continuará con la evaluación de un mayor número de sueros positivos y sueros negativos que tengan historial de “no abortos”, lo que permitirá mejorar el punto de corte establecido y posteriormente la validación de la prueba mediante varias repeticiones para asegurar la repetibilidad y reproducibilidad de esta.

CONCLUSIONES

- La proteína recombinante OmpA de *C. abortus* producida en el sistema de expresión procarionte *E. coli* BL21, conserva sus características antigénicas y al ser acoplada a ensayos de Western blot y ELISA indirecto es reconocida por sueros de campo de animales con cultivo celular positivo.
- La proteína recombinante se logró purificar mediante cromatografía de afinidad y se identificó la etiqueta de histidinas que posee en su porción C-terminal, mediante un anticuerpo monoclonal Anti 6x-HisTag.
- A pesar de que no se obtuvo un punto de corte para la técnica de ELISA indirecta, se obtuvo la propuesta de una concentración de 100 ng de antígeno recombinante y dilución de sueros positivo y negativo de 1:100, en donde se observa una mayor diferencia entre los promedios de las D.O. del suero positivo y negativo, y con una significancia de $P < 0.05$

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK., Lichtman AH., Pober JS. (2004). *Celular and Molecular Immunology*. Fifth Edition. Ed W.B. Saunders Co. U.S.A.

Abdelrahman YM., Belland RJ. (2005). The chlamydial developmental cycle. *FEMS Microbiology Reviews*. 949-959. DOI: 10.1016/j.femsre.2005.03.002.

Aitken ID., Longbottom D. (2007). Chlamydial abortion. In: Aitken ID, editor. *Diseases of sheep*. Fourth edition Oxford, UK: Blackwell Publishing. 105-112.

Aitken, ID. (2000). Chlamydial abortion, In: *Diseases of Sheep*. Martin, W.D., Aitken, I.D. Ed. Blackwell Science, Oxford, 81-86.

Aitken, ID., Longbottom, D. (2004). Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). In: *OIE Biological Standards Commission (Eds.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds, and Bees)*. Office International des Epizooties, Paris. 635–641.

Álvarez D. (2018). Influencia de la penicilina y de las hormonas sexuales 17 beta-estradiol y progesterona sobre la infección por *Chlamydia abortus* en líneas celulares de endometrio y trofoblasto de origen ovino. [Tesis de doctorado]. Universidad de Murcia. España.

Albrecht M, Sharma CM, Dittrich MT, Müller T, Reinhardt R, Vogel J, Rudel T. (2011). The transcriptional landscape of *Chlamydia pneumoniae*. *Genome Biology*. DOI: 10.1186/gb-2011-12-10-r98.

Alonso R., Galán JC., Gutiérrez FJ., Rodríguez DM., Salinas J., Sanbonmatsu GS. (2012) *Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Chlamydia spp. y especies relacionadas*. Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón. 2ª Edición

Andersen AA. (1991). Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *Journal of Clinical Microbiology*. 707-711. DOI: 10.1128/jcm.29.4.707-711.1991.

Andersen, AA. (2004). Avian chlamydiosis. In: *OIE Biological Standards Commission (Eds.), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Mammals, Birds and Bees)*. Office International des Epizooties, Paris, pp. 856–867.

Antunes I., Kassiotis G. (2010). Suppression of innate immune pathology by regulatory T cells during Influenza A virus infection of immunodeficient mice. *Journal of Virology*. 12564–12575. DOI: 10.1128/JVI.01559-10

Arráiz N., Marcucci R., Urdaneta B., Colina S., Romero Z. (2008). Diagnóstico molecular en la evaluación de infecciones urogenitales por *Chlamydia trachomatis*. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*. 195-201

Atanu FO., Oviedo-Orta E., Watson KA. (2013). A novel transport mechanism for MOMP in *Chlamydomonas reinhardtii* and its putative role in immune-therapy. *PLoS One*. DOI: 10.1371/journal.pone.0061139.

Azenabor, AA., Cintron-Cuevas, J., Schmitt, H., Bumah, V. (2011). *Chlamydia trachomatis* induces anti-inflammatory effect in human macrophages by attenuation of immune mediators in Jurkat T-cells. *Immunobiology*. 1248–1255. DOI: 10.1016/j.imbio.2011.07.002

- Azenabor, AA., York, J. (2010). *Chlamydia trachomatis* evokes a relative anti-inflammatory response in a free Ca²⁺ dependent manner in human macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*. 513–528. DOI: 10.1016/j.cimid.2009.09.002
- Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 7077, 682-687. DOI: 10.1038/nature04444.
- Barnes RC. (1989). Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 119–136.
- Barteneva, N., Theodor, I., Peterson, EM., de la Maza, LM. (1996). Role of neutrophils in controlling early stages of a *Chlamydia trachomatis* infection. *Infection and Immunity Journal*. 4830–4833. DOI: 10.1128/iai.64.11.4830-4833.1996
- Bavoil, P., Ohlin, A., Schachter, J. (1984). Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity*. 479-485. DOI: 10.1128/iai.44.2.479-485.1984
- Bavoil, P.M. (2014). What's in a word: the use, misuse, and abuse of the word “persistence” in Chlamydia biology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4-27. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00027
- Beatty, WL., Byrne, GI., Morrison, RP. (1993). Morphologic and antigenic characterization of interferon gamma-mediated persistent *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. U. S. A. 3998–4002. DOI: 10.1073/pnas.90.9.3998.
- Beatty, WL., Morrison, RP., Byrne, GI. (1994). Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiological Reviews*. 686–699. DOI: 10.1128/mr.58.4.686-699.1994
- Becker, E., Hegemann, JH. (2014). All subtypes of the Pmp adhesin family are implicated in chlamydial virulence and show species-specific function. *Microbiologyopen*. 544–556. DOI: 10.1002/mbo3.186
- Beeckman DS, De Puyssseleir L, De Puyssseleir K, Vanrompay D. (2014) Chlamydial biology and its associated virulence blockers. *Critical Reviews in Microbiology*. 313-328. DOI: 10.3109/1040841X.2012.726210
- Bermudez A., Stark AK., El-Kadri R., Penichet M.L., Holzle K., Wittenbrink MM., Holzle, L., Oviedo E. (2011). The effect of *Chlamydomphila pneumoniae* Major Outer Membrane Protein (MOMP) on macrophage and T cell-mediated immune responses. *Immunobiology*. 152–163. DOI: 10.1016/j.imbio.2010.06.004
- Biron CA., Nguyen KB., Pien GC., Cousens LP., Salazar TP. (1999). Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*. 189–220. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.189
- Blumer S., Greub G., Waldvogel A., Hassig M., Thoma R., Tschuor A., Pospischil A., Borel N. (2011). *Waddlia*, *Parachlamydia* and *Chlamydiaceae* in bovine abortion. *Veterinary Microbiology*. 385–393. DOI: 10.1016/j.vetmic.2011.05.024
- Boncompain G, Schneider B, Delevoye C, Kellermann O, Dautry-Varsat A, Subtil A. (2010). Production of reactive oxygen species is turned on and rapidly shut down in epithelial cells infected with *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity Journal*. 78(1):80-7. DOI: 10.1128/IAI.00725-09.

- Borel N, Leonard C, Slade J, Schoborg RV. (2016) Chlamydial antibiotic resistance and treatment failure in veterinary and human medicine. *Current Clinical Microbiology Reports*.10.1–8. DOI: 10. 1007/ s40588- 016-0028-4.
- Borel N., Frey CF., Gottstein B., Hilbe M., Pospischil A., Franzoso FD., Waldvogel A. (2014). Laboratory diagnosis of ruminant abortion in Europe. *Veterinary Journal* 200, 218-229. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.03.015
- Borel N., Leonard C., Slade J., Schoborg RV. (2016). Chlamydial Antibiotic Resistance and Treatment Failure in Veterinary and Human Medicine. *Current Clinical Microbiology Reports*. 3, 10–18. DOI: 10.1007/s40588-016-0028-4
- Borel N., Sachse K., Rassbach A., Bruckner L., Vretou E., Psarrou E., Pospischil A. (2005). Ovine enzootic abortion (OEA): antibody response in vaccinated sheep compared to naturally infected sheep. *Veterinary Research Communications*. 29 Suppl 1, 151–156. DOI: 10.1007/s11259-005-0844-0.
- Borel N., Summersgill JT., Mukhopadhyay S., Miller RD., Ramirez JA., Pospischil A. (2008). Evidence for persistent *Chlamydia pneumoniae* infection of human coronary atheromas. *Atherosclerosis* 199, 154–161. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.09.026
- Bouakane A., Benchaieb, I., Rodolakis, A. (2003). Abortive potency of *Chlamydophila abortus* in pregnant mice is not directly correlated with placental and fetal colonization levels. *Infection and Immunity*. 71, 7219–7222. DOI: 10.1128/IAI.71.12.7219-7222.2003
- Bregenholt S., Berche P., Brombacher F., Di Santo JP. (2001). Conventional alpha beta T cells are sufficient for innate and adaptive immunity against enteric *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology*. 166, 1871–1876. DOI: 10.4049/jimmunol.166.3.1871.
- Brickman TJ., Barry CE., Hackstadt T. (1993). Molecular cloning and expression of hctB encoding a strain-variant chlamydial histone-like protein with DNA-binding activity. *Journal of Bacteriology* 175, 4274-4281. DOI: 10.1128/jb.175.14.4274-4281.1993
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 1532-1535. DOI: 10.1126/science.1092385.
- Brown J., Entrican, G. (1996). Interferon-gamma mediates long-term persistent *Chlamydia psittaci* infection in vitro. *The Journal of Comparative Pathology*. 115, 373-383. DOI: 10.1016/s0021-9975(96)80072-7
- Brown J., Howie SE., Entrican G. (2001). A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 82, 107–119. DOI: 10.1016/s0165-2427(01)00351-8.
- Buendia A.J., Del Rio L., Ortega N., Sanchez J., Gallego M.C., Caro M.R., Navarro J.A., Cuello F., Salinas J. (2002). B-cell-deficient mice show an exacerbated inflammatory response in a model of *Chlamydophila abortus* infection. *Infection and Immunity Journal*. 70, 6911–6918. DOI: 10.1128/IAI.70.12.6911-6918.2002.
- Buendia A.J., Martinez C.M., Ortega N., Del Rio L., Caro M.R., Gallego M.C., Sanchez J., Navarro J.A., Cuello F., Salinas J. (2004). Natural killer (NK) cells play a critical role in the early innate immune response to *Chlamydophila abortus* infection in mice. *The Journal of Comparative Pathology*. 130, 48–57. DOI: 10.1016/s0021-9975(03)00069-0.

Buendia AJ., de Oca R.M., Navarro J.A., Sanchez J., Cuello F., Salinas, J. (1999). Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infection and Immunity*. 67, 2110-2116. DOI: 10.1128/iai.67.5.2110-2116.1999

Buendia AJ., Ortega N., Caro MR., Del Rio L., Gallego MC., Sanchez J., Navarro JA., Cuello F., Salinas J. (2009). B cells are essential for moderating the inflammatory response and controlling bacterial multiplication in a mouse model of vaccination against *Chlamydothila abortus* infection. *Infection and Immunity Journal*. 77, 4868-4876. DOI: 10.1128/IAI.00503-09

Buendia AJ., Sanchez J., Del Rio L., Garces B., Gallego MC., Caro MR., Bernabe A., Salinas J. (1999b). Differences in the immune response against ruminant chlamydial strains in a murine model. *Veterinary Research*. 30, 495-507.

Buendia AJ., Sanchez J., Martinez MC., Camara P., Navarro JA., Rodolakis A., Salinas J. (1998). Kinetics of infection and effects on placental cell populations in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infection and Immunity Journal*. 66, 2128-2134. DOI: 10.1128/iai.66.5.2128-2134.1998

Burnet FM., Rountree PM. (1935). Psittacosis in the developing egg. *The Journal of Pathology*. 40, 471-481. DOI: 10.1002/PATH.1700400306

Buxton D., Anderson IE., Longbottom D., Livingstone M., Wattegedera S., Entrican G. (2002). Ovine chlamydial abortion: characterization of the inflammatory immune response in placental tissues. *Journal of Comparative Pathology*. 127, 133-141. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0573.

Buxton D., Barlow RM., Finlayson J., Anderson IE., Mackellar A. (1990). Observations on the pathogenesis of *Chlamydia psittaci* infection of pregnant sheep. *Journal of Comparative Pathology*. 102, 221-237.

Buzoni D., Bernard F., Andersen A., Rodolakis A. (1990). Protective effect of polyclonal and monoclonal antibodies against abortion in mice infected by *Chlamydia psittaci*. *Vaccine*. 8, 342-346. DOI: 10.1016/0264-410x(90)90092-z

Buzoni D., Guilloteau L., Bernard F., Bernard S., Charles T., Rocca A. (1992). Protection against *Chlamydia psittaci* in mice conferred by Lyt-2+ T cells. *Immunology* 77, 284-288.

Byrne GI., Krueger DA. (1983). Lymphokine-mediated inhibition of *Chlamydia* replication in mouse fibroblasts is neutralized by anti-gamma interferon immunoglobulin. *Infection and Immunity Journal*. 42, 1152-1158. DOI: 10.1128/iai.42.3.1152-1158.1983

Byrne GI., Lehmann LK., Landry GJ. (1986). Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infection and Immunity* 53, 347-351. DOI: 10.1128/iai.53.2.347-351.1986.

Caldwell HD., Kromhout J., Schachter J. (1981). Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity Journal*. 31, 1161-1176. DOI: 10.1128/iai.31.3.1161-1176.1981

Caldwell HD., Perry LJ. (1982). Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein. *Infection and Immunity Journal*. 38, 745-754. DOI: 10.1128/iai.38.2.745-754.1982

Campbell LA., Lee A., Kuo C. (2006). Cleavage of the N-linked oligosaccharide from the surfaces of *Chlamydia* species affects infectivity in the mouse model of lung infection. *Infection and Immunity Journal*. 74, 3027–3029. DOI: 10.1128/IAI.74.5.3027-3029.2006

Campos E, Vázquez JC, Salem AZ, Saltijeral JA, Escalante C, López SM, de Oca RM. (2014). Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*. 6, 919-924. DOI: 10.1007/s11250-014-0585-6

Carabeo RA., Grieshaber SS., Fischer E., Hackstadt T. (2002). *Chlamydia trachomatis* induces remodeling of the actin cytoskeleton during attachment and entry into HeLa cells. *Infection and Immunity Journal*. 70, 3793–3803. DOI: 10.1128/IAI.70.7.3793-3803.2002

Carabeo RA., Mead DJ., Hackstadt T. (2003). Golgi-dependent transport of cholesterol to the *Chlamydia trachomatis* inclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6771-6776. DOI: 10.1073/pnas.1131289100

Carlin JM., Weller JB. (1995). Potentiation of interferon-mediated inhibition of chlamydia infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infection and Immunity* 63, 1870-1875. DOI: 10.1128/iai.63.5.1870-1875.1995

Caro MR., Buendia AJ., Del Rio L., Ortega N., Gallego MC., Cuello F., Navarro JA., Sanchez J., Salinas J. (2009). *Chlamydophila abortus* infection in the mouse: a useful model of the ovine disease. *Veterinary Microbiology*. 135, 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.029>. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.029

Caro MR., Ortega N., Buendia AJ., Gallego MC., Del Rio L., Cuello F., Salinas J. (2001). Protection conferred by commercially available vaccines against *Chlamydophila abortus* in a mouse model. *Veterinary Record* 149, 492-493. DOI: 10.1136/vr.149.16.492

Caven L, Carabeo RA. (2019). Pathogenic Puppetry: Manipulation of the Host Actin Cytoskeleton by *Chlamydia trachomatis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 1, 90. DOI: 10.3390/ijms21010090.

Chen LF, Kaye D. (2011). Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. *Medical Clinics of North America*. 4, 819–42. DOI: 10.1016/j.mcna.2011.03.007.

Clark ED. (1998). Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology*. 2, 157–163. DOI: 10.1016/S0958-1669(98)80109-2

Classen DC, Morningstar JM, Shanley JD. (1987). Detection of antibody to murine cytomegalovirus by enzyme-linked immunosorbent and indirect immunofluorescence assays. *Journal of Clinical Microbiology*. 4, 600-604. DOI: 10.1128/jcm.25.4.600-604.1987.

Clifton DR., Fields KA., Grieshaber SS., Dooley CA., Fischer ER., Mead DJ., Carabeo RA., Hackstadt T. (2004). A chlamydial type III translocated protein is tyrosinephosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101, 10166-10171. DOI: 10.1073/pnas.0402829101

Coffman RL., Leberman DA., Rothman P. (1993). Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching. *Advances in Immunology*. 54, 229–270. DOI: 10.1016/s0065-2776(08)60536-2

Couper KN., Blount DG., Riley EM. (2008a). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology*. 180, 5771–5777. DOI: 10.4049/jimmunol.180.9.5771

- Couper KN., Blount DG., Wilson MS., Hafalla JC., Belkaid Y., Kamanaka M., Flavell RA., de Souza JB., Riley EM. (2008b). IL-10 from CD4CD25F_{oxp}3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLOS Pathogens*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000004
- Crane DD, Carlson JH, Fischer ER, Bavoil P, Hsia RC, Tan C, Kuo CC, Caldwell HD. (2006). *Chlamydia trachomatis* polymorphic membrane protein D is a species-common pan-neutralizing antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103:1894–1899. DOI: 10.1073/pnas.0508983103.
- Croker BA., Krebs DL., Zhang G., Wormald S., Willson TA., Stanley EG., Robb L., Greenhalgh CJ., Forster I., Clausen BE., Nicola NA., Metcalf D., Hilton DJ., Roberts AW., Alexander WS. (2003). SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nature Immunology*. 4, 540–545. DOI: 10.1038/ni931
- Cross RF., Clafin RM. (1963). The incidence and removal of procomplementary activity in swine serum. *American Journal of Veterinary Research*. 24, 334–336.
- Crowther JR. (2000). The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol.*;149:III-IV, 1-413. DOI: 10.1385/1592590497.
- Croy TR., Kuo CC., Wang S.P. (1975). Comparative susceptibility of eleven mammalian cell lines to infection with trachoma organisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 1, 434–439. DOI: 10.1128/jcm.1.5.434-439.1975
- Cunningham K, Stansfield SH, Patel P, Menon S, Kienzle V, Allan JA, Huston WM. (2013). The IL-6 response to *Chlamydia* from primary reproductive epithelial cells is highly variable and may be involved in differential susceptibility to the immunopathological consequences of chlamydial infection. *BMC Immunology*. 14-50. DOI: 10.1186/1471-2172-14-50.
- Dagnall GJ., Wilsmore AJ. (1990). A simple staining method for the identification of chlamydial elementary bodies in the fetal membranes of sheep affected by ovine enzootic abortion. *Veterinary Microbiology*. 21, 233–239. DOI: 10.1016/0378-1135(90)90034-s
- Dautin N., Bernstein HD. (2007). Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annual Review of Microbiology*. 6189-112. DOI: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093233
- de Barbeyrac B. (2013). Current aspects of *Chlamydia trachomatis* infection. *La Presse Médicale*. 4, 440-445. French. DOI: 10.1016/j.lpm.2012.09.025.
- De Graves FJ., Gao D., Hehnen HR., Schlapp T., Kaltenboeck B. (2003a). Quantitative detection of *Chlamydia psittaci* and *C. pecorum* by high sensitivity real-time PCR reveals high prevalence of vaginal infection in cattle. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 1726–1729. DOI: 10.1128/JCM.41.4.1726-1729.2003
- de Haro MJ, Guadarrama SI, López M, Escobedo MR, Guerra FM. (2019). Obtaining an ELISA test based on a recombinant protein of *Chlamydia trachomatis*. *International Microbiology*. 4, 471-478. DOI: 10.1007/s10123-019-00074-4.
- de la Maza LM., Peterson EM. (2002). Vaccines for *Chlamydia trachomatis* infections. *Current opinion in investigational drugs*. 3: 980–986.
- de Sa C., Souriau A., Bernard F., Salinas J., Rodolakis A. (1995). An oligomer of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* is recognized by monoclonal antibodies which protect mice from abortion. *Infection and Immunity*. 63, 4912–4916. DOI: 10.1128/iai.63.12.4912-4916.1995.

Decken K., Kohler G., Palmer K., Wunderlin A., Mattner F., Magram J., Gately MK., Alber, G. (1998). Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infection and Immunity*. 66, 4994–5000. DOI: 10.1128/IAI.66.10.4994-5000.1998.

Del Rio L., Barbera M., Navarro JA., Buendia AJ., Cuello F., Ortega N., Gallego MC., Salinas J., Caro MR. (2013). IFN-gamma expression in placenta is associated to resistance to *Chlamydia abortus* after intragastric infection. *Microbial Pathogenesis*. 56, 1–7. DOI: 10.1016/j.micpath.2012.12.003

Del Rio L., Buendia AJ., Sanchez J., Gallego MC., Caro MR., Ortega N., Seva J., Pallares FJ., Cuello F., Salinas J. (2001). Endogenous interleukin-12 is not required for resolution of *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. *Infection and Immunity*. 69, 4808–4815. DOI: 10.1128/IAI.69.8.4808-4815.2001

Del Rio L., Buendia AJ., Sanchez J., Garces B., Caro MR., Gallego MC., Bernabe A., Cuello F., Salinas J. (2000). *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) clearance is associated with the early recruitment of neutrophils and CD8(+) T cells in a mouse model. *Journal of Comparative Pathology*. 123, 171–181. DOI: 10.1053/jcpa.2000.0411

Del Rio L., Murcia A., Buendia AJ., Alvarez D., Ortega N., Navarro J.A., Salinas, J., Caro, M.R. (2018). Development of an in vivo model of *Chlamydia abortus* chronic infection in mice overexpressing IL-10. *Veterinary Microbiology*. 213, 28–34. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.11.009

Diario Oficial de la Federación 29 de noviembre de 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. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Diario Oficial de la Federación 5 de marzo de 1999 Acuerdo mediante el cual se enlistan las plagas y enfermedades exóticas y enzoóticas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación

Dong F, Pirbhai M, Xiao Y, Zhong Y, Wu Y, Zhong G. (2005). Degradation of the proapoptotic proteins Bik, Puma, and Bim with Bcl-2 domain 3 homology in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *Infection and Immunity Journal*. 73(3):1861-4. DOI: 10.1128/IAI.73.3.1861-1864.2005.

Dugan J., Rockey DD., Jones L., Andersen AA. (2004). Tetracycline resistance in *Chlamydia suis* mediated by genomic islands inserted into the chlamydial inv-like gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48, 3989–3995. DOI: 10.1128/AAC.48.10.3989-3995.2004

Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR amplifiable target copies. *Molecular and Cellular Probes*. 20, 60–63. DOI: 10.1016/j.mcp.2005.09.003

Elahi S., Pang G., Clancy R., Ashman R.B. (2000). Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infection and Immunity Journal*. 68, 5771–5777. DOI: 10.1128/iai.68.10.5771-5777.2000

Elwell CA., Ceesay A., Kim JH., Kalman D., Engel JN. (2008). RNA interference screen identifies Abl kinase and PDGFR signaling in *Chlamydia trachomatis* entry. *PLoS Pathogens*. 4. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000021

Elwell CA., Engel JN. (2012). Lipid acquisition by intracellular *Chlamydiae*. *Cellular Microbiology* 14, 1010-1018.

Entrican G. (2002). Immune regulation during pregnancy and host-pathogen interactions in infectious abortion. *Journal of Comparative Pathology*. 126, 79–94. DOI: 10.1053/jcpa.2001.0539

Entrican G., Brown J., Graham S. (1998). Cytokines and the protective host immune response to *Chlamydia psittaci*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 21, 15–26. DOI: 10.1016/S0147-9571(97)00020-9

Entrican G., Wattegedera S., Rocchi M., Fleming DC., Kelly, RW., Wathne G., Magdalenic V., Howie SEM. (2004). Induction of inflammatory host immune responses by organisms belonging to the genera *Chlamydia/Chlamydophila*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 100, 179–186. DOI: 10.1016/j.vetimm.2004.04.006

Entrican G., Wheelhouse N., Wattegedera SR., Longbottom D. (2012). New challenges for vaccination to prevent chlamydial abortion in sheep. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* 35, 271-276. DOI: 10.1016/j.cimid.2011.12.001

Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. (2014). Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity*. 41:21– 35. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.06.013

Ericson JA, Duffau P, Yasuda K, Ortiz-Lopez A, Rothamel K, Rifkin IR, Monach PA. (2014). Gene expression during the generation and activation of mouse neutrophils: implication of novel functional and regulatory pathways. *PLoS One*. 2014 Oct 3;9(10):e108553. DOI: 10.1371/journal.pone.0108553.

Escalante OC, Díaz AE, Segundo ZC, Suárez GF. (1997). Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: first report. *Revista Latinoamericana de Microbiología*; 39(3-4):117-121.

Escalante OC, Lazcano C, Soberón A. *Chlamydophila* spp como agente zoonótico en México. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 2001.

Escalante OC, Rivera FA, Trigo TF, Romero MJ. (1996). Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep, through cell culture isolation. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 38(1):17-23.

Essig A., Longbottom D. (2015). *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2, 22–34. DOI: 10.1007/s40588-015-0014-2

Everett KD., Hornung LH., Andersen AA. (1999b). Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. *Journal of Clinical Microbiology*. 37, 575–580. DOI: 10.1128/jcm.37.3.575-580.1999

Everett KDE, Bush RM, Andersen AA. (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam.nov. and *Simkaniaceae* fam.nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 415-40. DOI: 10.1099/00207713-49-2-415.

Everett KDE, Hatch TP. (1995). Architecture of the Cell Envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *Journal of Bacteriology* 877-882. DOI: 10.1128/jb.177.4.877-882.1995

Fahnert B, Lilie H, Neubauer P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilization. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 89:93-142. DOI: 10.1007/b93995.

- Fan P, Dong F, Huang Y, Zhong G. *Chlamydia pneumoniae* secretion of a protease-like activity factor for degrading host cell transcription factors required for [correction of factors is required for] major histocompatibility complex antigen expression. *Infection and Immunity*. 70(1):345-9. DOI: 10.1128/IAI.70.1.345-349.2002.
- Feher VA., Randall A., Baldi P., Bush RM., de la Maza LM., Amaro RE. (2013). A 3-Dimensional trimeric β -barrel model for *Chlamydia* MOMP contains conserved and novel elements of Gram-negative bacterial porins. *PLoS ONE*. 7: e68934. DOI: 10.1371/journal.pone.0068934.
- Findlay, HE., McClafferty H., Ashley RH. (2005). Surface expression, single channel analysis and membrane topology of recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *BMC Microbiology*. 5. 5. DOI: 10.1186/1471-2180-5-5
- Finlayson J., Buxton D., Anderson IE., Donald KM. (1985). Direct immunoperoxidase method for demonstrating *Chlamydia psittaci* in tissue sections. *Journal of Clinical Pathology*. 38, 712–714. DOI: 10.1136/jcp.38.6.712
- Fischer SF, Vier J, Kirschnek S, Klos A, Hess S, Ying S, Häcker G. (2004). *Chlamydia* inhibit host cell apoptosis by degradation of proapoptotic BH3-only proteins. *Journal of Experimental Medicine*. 4;200(7):905-16. DOI: 10.1084/jem.20040402.
- Fohner AE, Sparreboom A, Altman RB, Klein TE. (2017). PharmGKB summary: macrolide antibiotic pathway, pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Pharmacogenetics Genomics*. 27(4):164–7. DOI: 10.1097/FPC.0000000000000270.
- Forsbach-Birk, V., Foddis 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: 10.1371/journal.pone.0080310
- Forsström B., Axnäs BB., Rockberg J., Danielsson H., Bohlin A., Uhlen M. (2015). Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*. 27;10(3):e0121673. DOI: 10.1371/journal.pone.0121673.
- Friis, R. (1972). Interaction of L-cells and *Chlamydia psittaci*: entry of the parasite and host responses to its development. *Journal of Bacteriology*. 110:706-721. DOI: 10.1128/jb.110.2.706-721.1972.
- García de la Fuente JN, Gutiérrez-Martín CB, Ortega N, Rodríguez-Ferri EF, del Río ML, González OR, Salinas J. (2004). Efficacy of different commercial and new inactivated vaccines against ovine enzootic abortion. *Veterinary Microbiology*. 20;100(1-2):65-76. doi: 10.1016/j.vetmic.2004.01.015.
- 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*. 25;3:67. DOI: 10.3389/fvets.2016.00067.
- Gazzinelli RT., Wysocka M., Hayashi S., Denkers EY., Hieny S., Caspar P., Trinchieri G., Sher A. (1994). Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *Journal of Immunology*. 153, 2533–2543.
- Georgopoulos C., Welch W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cell Biology*. 9, 601–634. DOI: 10.1146/annurev.cb.09.110193.003125

Gobin SJ, Peijnenburg A, van Eggermond M, van Zutphen M, van den Berg R, van den Elsen PJ. (1998). The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity*. 9(4):531-41. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80636-6. PMID: 9806639.

Graham SP., Jones GE., MacLean M., Livingstone M., Entrican G. (1995). Recombinant ovine interferon gamma inhibits the multiplication of *Chlamydia psittaci* in ovine cells. *Journal of Comparative Pathology*. 112, 185–195. DOI: 10.1016/s0021-9975(05)80060-x.

Greenlee-Wacker MC. (2016). Clearance of apoptotic neutrophils and resolution of inflammation. *Immunological Reviews*. 273, 357–370. DOI: 10.1111/imr.12453

Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. (2010). Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 299(3):C539-48. DOI: 10.1152/ajpcell.00047.2010.

Guevara E., López A., Jiménez L., Sotelo R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Biocencia*. 8-17. DOI: 10.18633/bt.v15i3.152

Gutiérrez-Martín CB, Ojcius DM, Hsia R, Hellio R, Bavoil PM, Dautry-Varsat A. (1994). Heparin-mediated inhibition of *Chlamydia psittaci* adherence to HeLa cells. *Microbial Pathogenesis*. 22(1):47-57. DOI: 10.1006/mpat.1996.0090

Hackstadt T. (1999). Cell biology, En: *Chlamydia: intracellular biology, pathogenesis and immunity*. Stephens, R.S. Ed. ASM Press, Washington DC. 101-138.

Hackstadt T., Baehr W., Ying Y. (1991). *Chlamydia trachomatis* developmentally regulated protein is homologous to eukaryotic histone H1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 3937-3941. DOI: 10.1073/pnas.88.9.3937

Hackstadt T., Rockey DD., Heinzen RA., Scidmore MA. (1996). *Chlamydia trachomatis* interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane. *The EMBO Journal* 15, 964-977.

Hafner LM, McNeilly C. (2008). Vaccines for *Chlamydia* infections of the female genital tract. *Future Microbiology* 3: 67–77. DOI: 10.2217/17460913.3.1.67

Han X., Wang S., Fan Y., Yang J., Jiao L., Qiu H., Yang X. (2006). *Chlamydia* infection induces ICOS ligand-expressing and IL-10-producing dendritic cells that can inhibit airway inflammation and mucus overproduction elicited by allergen challenge in BALB/c mice. *Journal of Immunology*. 176, 5232–5239. DOI: 10.4049/jimmunol.176.9.5232.

Harkinezhad T., Schautteet K., Vanrompay D. (2009). Protection of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) against *Chlamydophila psittaci* challenge by DNA vaccination. *Veterinary Research*. 40, 61. DOI: 10.1051/vetres/2009044

Harper A., Pogson CI., Jones ML., Pearce JH. (2000). Chlamydial development is adversely affected by minor changes in amino acid supply, blood plasma amino acid levels, and glucose deprivation. *Infection and Immunity Journal*. 68, 1457–1464. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1457-1464.2000

- Hartley JC., Kaye S., Stevenson S., Bennett J., Ridgway G. (2001). PCR detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 3072–3079. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3072-3079.2001
- Hatch TP. (1996). Disulfide cross-linked envelope proteins: The functional equivalent of peptidoglycan in *chlamydiae*? *Journal of Bacteriology* 178, 1-5. DOI: 10.1128/jb.178.1.1-5.1996
- Hechard C., Grepinet O., Rodolakis A. (2004). Molecular cloning of the *Chlamydomphila abortus* groEL gene and evaluation of its protective efficacy in a murine model by genetic vaccination. *Journal of Medical Microbiology*. 53, 861–868. DOI: 10.1099/jmm.0.05442-0
- Hegemann JH., Moelleken K. (2012). Chlamydial adhesion and adhesins, En: *Intracellular pathogens I: Chlamydiales*. Tan M., Bavoil PM. (Eds.). American Society for Microbiology, Washington DC, 97-125.
- Heid CA., Stevens J., Livak KJ., Williams PM. (1996). Real-time quantitative PCR. *Genome Research*. 6, 968–994. DOI: 10.1101/gr.6.10.986
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 68(4):692-744. DOI: 10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004.
- Hepler, Robert W., Nahas, Debbie D., Lucas, Bob., Kaufhold, Robin., Flynn, Jessica A., Galli, Jennifer D., Swoyer, Ryan., Wagner, James M., Espeseth Amy S., Joyce, Joseph G., Cook, James C., and Durr, Eberhard. (2018). Spectroscopic analysis of chlamydial major outer membrane protein in support of structure elucidation. *Protein Science*. 27:1923–1941. DOI: 10.1002/pro.3501
- Herrmann B., Rahman R., Bergstrom S., Bonnedahl J., Olsen B. (2000). *Chlamydomphila abortus* in a Brown skua (*Catharacta antarctica lonnbergi*) from a subantarctic island. *Applied and Environmental Microbiology Journal*. 66, 3654–3656. DOI: 10.1128/aem.66.8.3654-3656.2000
- Hoelzle LE, Hoelzle K, Wittenbrink MM. (2003). Expression of the major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum*, and *Chlamydia suis* in *Escherichia coli* using an arabinose-inducible plasmid vector. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*. 50(8):383-9. DOI: 10.1046/j.1439-0450.2003.00685.x.
- Hogan RJ., Mathews SA., Mukhopadhyay S., Summersgill JT., Timms P. (2004). Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infection and Immunity*. 72, 1843–1855. DOI: 10.1128/IAI.72.4.1843-1855.2004
- Hou X., Song J., Su J., Huang D., Gao W., Yan J., Shen J. (2015). CD4(+) Foxp3(+) Tregs protect against innate immune cell-mediated fulminant hepatitis in mice. *Molecular Immunology*. 63, 420–427. DOI: 10.1016/j.molimm.2014.09.015
- Hsia RC., Ohayon H., Gounon P., Dautry-Varsat A., Bavoil P.M. (2000). Phage infection of the obligate intracellular bacterium, *Chlamydia psittaci* strain guinea pig inclusion conjunctivitis. *Microbes and Infection* 2, 761-772. DOI: 10.1016/s1286-4579(00)90356-3
- Huang J., DeGraves FJ., Lenz SD., Gao D., Feng P., Li D., Schlapp T., Kaltenboeck B. (2002). The quantity of nitric oxide released by macrophages regulates *Chlamydia*-induced disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99, 3914–3919. DOI: 10.1073/pnas.062578399

- Huang J., Wang MD., Lenz S., Gao D., Kaltenboeck B. (1999). IL-12 administered during *Chlamydia psittaci* lung infection in mice confers immediate and long-term protection and reduces macrophage inflammatory protein-2 level and neutrophil infiltration in lung tissue. *Journal of Immunology*. 162, 2217–2226.
- Hybiske K., Stephens RS. (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, 11430-11435. DOI: 10.1073/pnas.0703218104.
- Igietseme JU. (1996). Molecular mechanism of T-cell control of *Chlamydia* in mice: role of nitric oxide in vivo. *Immunology* 88, 1–5.
- Igietseme JU., Eko FO., Black CM. (2003). Contemporary approaches to designing and evaluating vaccines against *Chlamydia*. *Expert Review of Vaccines*. 2, 129–146. DOI: 10.1586/14760584.2.1.129
- Jablonska E., Jablonski J., Holownia A. (1999). Role of neutrophils in release of some cytokines and their soluble receptors. *Immunology Letters*. 70, 191–197. DOI: 10.1016/s0165-2478(99)00148-0
- Janeway Jr CA., Travers P., Walport M., Shlomchik MJ. (2001). *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease* (5.^a ed., p. Chapter 8). New York: Garland Science. New York: Garland Science.
- Jiang J, Marienau KJ, May LA, Beecham HJ 3rd, Wilkinson R, Ching WM, Richards AL. (2003). Laboratory diagnosis of two scrub typhus outbreaks at Camp Fuji, Japan in 2000 and 2001 by enzyme-linked immunosorbent assay, rapid flow assay, and Western blot assay using outer membrane 56-kD recombinant proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 69(1):60-6
- Jiménez JM, Escobedo MR, Arteaga G, López M, Haro MJ, Montes de Oca R, Guerra FM. (2008). Detection of *Chlamydophila abortus* in sheep (*Ovis aries*) in Mexico. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 3(4):91–95.
- Johnston SL., Siegel C. (1992). Comparison of Buffalo green monkey kidney cells and McCoy cells for the isolation of *Chlamydia trachomatis* in shell vial centrifugation culture. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 15, 355–357. DOI: 10.1016/0732-8893(92)90023-m.
- Jones HM, Kubo A, Stephens RS. (2000). Design, expression, and functional characterization of a synthetic gene encoding the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *Gene*. 258(1-2):173-81. DOI: 10.1016/s0378-1119(00)00367-x.
- Kaltenboeck B., Heard D., DeGraves FJ., Schmeer N. (1997a). Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortigenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 2293–2298. DOI: 10.1128/jcm.35.9.2293-2298.1997
- Kaltenboeck B., Hennen HR., Vaglenov A. (2005). Bovine *Chlamydophila* spp. infection: do we underestimate the impact on fertility? *Veterinary Research Communications*. 29 (Suppl. 1), 1–15. DOI: 10.1007/s11259-005-0832-4
- Kaltenboeck B., Schmeer N., Schneider R. (1997b). Evidence of numerous omp1 alleles of porcine *Chlamydia trachomatis* and novel chlamydial species obtained by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 1835–1841. DOI: 10.1128/jcm.35.7.1835-1841.1997

- Kamanaka M., Kim ST., Wan YY., Sutterwala FS., Lara-Tejero M., Galan JE., Harhaj E., Flavell RA. (2006). Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25, 941–952. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.09.013
- Kaushic C., Zhou F., Murdin AD., Wira CR. (2000). Effects of estradiol and progesterone on susceptibility and early immune responses to *Chlamydia trachomatis* infection in the female reproductive tract. *Infection and Immunity* 68, 4207–4216. DOI: 10.1128/iai.68.7.4207-4216.2000
- Kelver ME., Kaul A., Nowicki B., Findley WE., Hutchens TW., Nagamani M. (1996). Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *American Journal of Reproductive Immunology*. 36, 243–247. DOI: 10.1111/j.1600-0897.1996.tb00171.x
- Kerr K., Entrican G., McKeever D., Longbottom D. (2005). Immunopathology of *Chlamydia abortus* infection in sheep and mice. *Research in Veterinary Science*. 78, 1–7. DOI: 10.1016/j.rvsc.2004.08.004
- Kerr K., Wheelhouse N., Livingstone M., Anderson IE., Entrican G., McKeever D., Longbottom D. (2010). Inflammatory cytokine responses in a pregnant mouse model of *Chlamydia abortus* infection. *Veterinary Microbiology*. 144, 392–398. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.01.025
- Kincy-Cain T., Clements JD., Bost KL. (1996). Endogenous and exogenous interleukin-12 augment the protective immune response in mice orally challenged with *Salmonella dublin*. *Infection and Immunity Journal*. 64, 1437–1440. DOI: 10.1128/iai.64.4.1437-1440.1996.
- Koehler L., Nettelbreker E., Hudson AP., Ott N., Gerard HC., Branigan PJ., Schumacher HR., Drommer W., Zeidler H. (1997). Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microbial Pathogenesis* 22, 133–142. DOI: 10.1006/mpat.1996.0103
- Kol A., Bourcier T., Lichtman AH., Libby P. (1999). Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *Journal of Clinical Investigation*. 103, 571–577. DOI: 10.1172/JCI5310
- Kopf M., Baumann H., Freer G., Freudenberg M., Lamers M., Kishimoto T., Zinkernagel R., Bluethmann H., Kohler G. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* 368, 339–342. DOI: 10.1038/368339a0
- Kosma P. (1999). Chlamydial Lipopolysaccharide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 387–402. DOI: 10.1016/s0925-4439(99)00061-7.
- Kunz US., Pospischil A., Paccaud MF. (1991). Immunohistochemical detection of chlamydiae in formalin-fixed tissue sections: comparison of a monoclonal antibody with yolk derived antibodies (IgY). *Zentralbl. Veterinarmed.* 38, 292–298. DOI: 10.1111/j.1439-0450.1991.tb00873.x.
- Kuo CC., Stephens RS., Bavoil PM., Kaltenboeck B. (2011). Genus I. Chlamydia, In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R., Staley, J.T., Brown, D.R., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Ward, N.L., Ludwig, W., Whitman, W.B. (Eds.). Springer, New York, 846–865.
- Kutlin A., Flegg C., Stenze, D., Reznik T., Roblin PM., Mathews S., Timms P., Hammerschlag MR. (2001). Ultrastructural study of *Chlamydia pneumoniae* in a continuous-infection model. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3721–3723. DOI: 10.1128/JCM.39.10.3721-3723.2001

Laitinen K., Laurila AL., Leinonen M., Saikku P. (1996). Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* infection in mice by cortisone treatment. *Infection and Immunity Journal*. 64, 1488–1490. DOI: 10.1128/iai.64.4.1488-1490.1996

Lammert JK. (1982). Cytotoxic cells induced after *Chlamydia psittaci* infection in mice. *Infection and Immunity Journal*. 35, 1011–1017. DOI: 10.1128/iai.35.3.1011-1017.1982

Laroucau K., Souriau A., Rodolakis A. (2000). Isolation of new pmp sequence in serotype-1 *Chlamydia psittaci* strains, In: *Chlamydia Research*, vol. 4. Saikku, P. (Ed.) Universitas Helsingienis, Finland, 38.

Laroucau K., Vorimore F., Bertin C., Mohamad KY., Thierry S., Hermann W., Maingourd C., Pourcel C. Longbottom D., Magnino S., Sachse K., Vretou E., Rodolakis A. (2009). Genotyping of *Chlamydomphila abortus* strains by multilocus VNTR analysis. *Veterinary Microbiology*. 137, 335–344. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.01.029

Laroucau K., Vorimore F., Sachse K., Vretou E., Siarkou VI., Willems H., Magnino S., Rodolakis A., Bavoil PM. (2010). Differential identification of *Chlamydomphila abortus* live vaccine strain 1B and *C. abortus* field isolates by PCR-RFLP. *Vaccine* 28, 5653–5656. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.06.064

Leaver HA., Howie A., Appleyard W., Aitken IAND., Hay, LA. (1987). Altered steroid hormone and prostaglandin metabolism during chlamydial infection in sheep. *Biochemical Society Transactions*. 15, 479 LP – 479. DOI: 10.1042/bst0150479

Lenart J., Andersen AA., Rockey DD. (2001). Growth and development of tetracyclineresistant *Chlamydia suis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45, 2198–2203. DOI: 10.1128/AAC.45.8.2198-2203.2001

Lewis ME, Belland RJ, AbdelRahman YM, Beatty WL, Aiyar AA, Zea AH, Greene SJ, Marrero L, Buckner LR, Tate DJ, McGowin CL, Kozlowski PA, O'Brien M, Lillis RA, Martin DH, Quayle AJ. (2014). Morphologic and molecular evaluation of *Chlamydia trachomatis* growth in human endocervix reveals distinct growth patterns. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 10;4:71. DOI: 10.1002/jobm.202100312

Livak KJ., Flood SJ., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *CR Methods and Applications*. 4, 357–362. DOI: 10.1101/gr.4.6.357

Livingstone M, Entrican G, Wattegedera S, Buxton D, McKendrick IJ, Longbottom D. (2005). Antibody responses to recombinant protein fragments of the major outer membrane protein and polymorphic outer membrane protein POMP90 in *Chlamydomphila abortus*-infected pregnant sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12:770–777. DOI: 10.1128/CDLI.12.6.770-777.2005

Livingstone M., Entrican G., Wattegedera S., Buxton D., McKendrick IJ., Longbottom D. (2005). Antibody responses to recombinant protein fragments of the major outer membrane protein and polymorphic outer membrane protein POMP90 in *Chlamydomphila abortus*-infected pregnant sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 12, 770–777. DOI: 10.1128/CDLI.12.6.770-777.2005.

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:e57950. DOI: 10.1371/journal.pone.0057950

Longbottom D., Coulter LJ. (2003). Animal chlamydioses and zoonotic implications. *Journal of Comparative Pathology*. 128, 217-244. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>

Longbottom D., Livingstone M. (2006). Vaccination against chlamydial infections of man and animals. *Veterinary Journal*. 171, 263–275. DOI:10.1016/j.tvjl.2004.09.006

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, e57950. DOI: 10.1371/journal.pone.0057950

Longbottom D., Russell M., Jones GE., Lainson FA., Herring AJ. (1996). Identification of a multigene family coding for the 90 kDa proteins of the ovine abortion subtype of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiology Letters*. 142, 277–281. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1996.tb08443.x.

Lucero ME., Kuo CC. (1985). Neutralization of *Chlamydia trachomatis* cell culture infection by serovar-specific monoclonal antibodies. *Infection and Immunity Journal*. 50, 595–597. DOI: 10.1128/iai.50.2.595-597.1985

Lutter EI., Bonner C., Holland MJ., Suchland RJ., Stamm WE., Jewett TJ., McClarty G., Hackstadt T. (2010). Phylogenetic analysis of *Chlamydia trachomatis* Tarp and correlation with clinical phenotype. *Infection and Immunity Journal*. 78, 3678–3688. DOI: 10.1128/IAI.00515-10

Macatonia SE., Hosken NA., Litton M., Vieira P., Hsieh CS., Culpepper JA., Wysocka M., Trinchieri G., Murphy, KM., O'Garra A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology*. 154, 5071– 5079.

MacMicking J., Xie QW., Nathan C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology*. 15, 323–350. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323

Malinverni R., Kuo CC., Campbell LA., Grayston JT. (1995). Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *Journal of Infectious Diseases*. 172, 593–594. DOI: 10.1093/infdis/172.2.593

Marques PX, Souda P, O'Donovan J, Gutierrez J, Gutierrez EJ, Worrall S, McElroy M, Proctor A, Brady C, Sammin D, Basset HF, Whitelegge PJ, Markey EB, Ily EJ. (2010). Identification of Immunologically Relevant Proteins of *Chlamydophila abortus* Using Sera from Experimentally Infected Pregnant Ewes. *Clinical and Vaccine Immunology*. Vol. 17, No. 8. 1274-1281. DOI: 10.1128/CVI.00163-10

Martínez C. (2006). Papel de las células NK y de los Linfocitos T en la respuesta inmune frente a *Chlamydophila abortus* en modelo murino. Tesis Doctoral. España: Facultad de Veterinaria

Martínez SG. (2013). Desarrollo de una prueba de inmunoensayo enzimático para el diagnóstico de Clamidiosis en caprinos. Tesis de Maestría. Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez-Serrano, M. G., Díaz-Aparicio, E., Palomares-Reséndiz, G., Tórtora-Pérez, J. L., Ramírez-Álvarez, H., Ortega-Hernández, N., Salinas-Lorente, J., Morales-Alvarez, J. F., & Cervantes-Morali, J. J. C. (2021). Presence of *Chlamydia abortus* in colostrum, milk and vaginal discharge samples of sheep. *Revista Colombiana De Ciencias Pecuarias*. DOI: 10.17533/udea.rccp.v35n2a04

Matsumoto A. (1982). Electron microscopic observations of surface projections on *Chlamydia psittaci* reticulate bodies. *Journal of Bacteriology* 150, 358-364. DOI: 10.1128/jb.150.1.358-364.1982.

Matsumoto A. (1988). Structural characteristics of chlamydial bodies, En: *Microbiology of Chlamydia*. Barron, A. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, 21-45.

- Mayadas TN., Cullere X., Lowell CA. (2014). The multifaceted functions of neutrophils. *Annual Review of Pathology*. 9, 181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023
- Maynard CL, Harrington LE, Janowski KM, Oliver JR, Zindl CL, Rudensky AY, Weaver CT. (2007). Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3+ and Foxp3- precursor cells in the absence of interleukin 10. *Nature Immunology*. 8(9):931-41. DOI: 10.1038/ni1504.
- McKuen MJ., Dahl G., Fields KA. (2013). Assessing a potential role of host Pannexin 1 during *Chlamydia trachomatis* infection. *PLoS One* 8, e63732. DOI: 10.1371/journal.pone.0063732
- Mehta AK, Gracias DT, Croft M. (2018). TNF activity and T cells. *Cytokine*. 101:14-18. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.08.003.
- Messmer TO., Skelton SK., Moroney JF., Daugharty H., Fields BS. (1997). Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*. 35, 2043–2046. DOI: 10.1128/jcm.35.8.2043-2046.1997
- Mestrovic T, Ljubin-Sternak S. (2018). Molecular mechanisms of *Chlamydia trachomatis* resistance to antimicrobial drugs. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018;1(23):656–70. DOI: 10.2741/4611.
- Miller MA., Turk JR., Nelson SL., van der Lek AP., Solorzano R., Fales WH., Morehouse LG., Gosser HS. (1990). Chlamydial infection in aborted and stillborn lambs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2, 55–58. DOI: 10.1177/104063879000200110
- Moelleken K., Hegemann JH. (2008). The *Chlamydia* outer membrane protein OmcB is required for adhesion and exhibits biovar-specific differences in glycosaminoglycan binding. *Molecular Microbiology*. 67, 403–419. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2007.06050.x
- Molestina RE, Miller RD, Ramirez JA, Summersgill JT. (1999). Infection of human endothelial cells with *Chlamydia pneumoniae* stimulates transendothelial migration of neutrophils and monocytes. *Infection and Immunity Journal*. 67(3):1323-30. DOI: 10.1128/IAI.67.3.1323-1330.1999.
- Montes de Oca R., Buendía AJ., Sánchez J., Del Rio L., Seva J., Navarro JA., Salinas J. (2000). Limited role of polymorphonuclear neutrophils in a pregnant mouse model of secondary infection by *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1). *Microbial Pathogenesis*. 29, 319–327. DOI: 10.1006/mpat.2000.0396
- Montes de Oca RM., Buendia AJ., Del Rio L., Sanchez J., Salinas J., Navarro JA. (2000a). Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8(+) T cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Infection and Immunity Journal*. 68, 1746–1751. DOI: 10.1128/IAI.68.3.1746-1751.2000.
- Moore T., Ananaba GA., Bolier J., Bowers S., Belay T., Eko FO., Igietseme JU. (2002). Fc receptor regulation of protective immunity against *Chlamydia trachomatis*. *Immunology* 105, 213–221. DOI: 10.1046/j.0019-2805.2001.01354.x
- Moore T., Ekworomadu CO., Eko FO., MacMillan L., Ramey K., Ananaba GA., Patrickson JW., Nagappan PR., Lyn D., Black CM., Igietseme JU. (2003). Fc receptor-mediated antibody regulation of T cell immunity against intracellular pathogens. *Journal of Infectious Diseases*. 188, 617–624. DOI: 10.1086/377134

Mora JC. (2011). Determinación de *Chlamydophila abortus* en rebaños caprinos lecheros de Guanajuato, México, con casos de aborto sugerentes de clamidiosis. [Tesis de Licenciatura] Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2011.

Moulder JW. (1991). Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiological Review* 1991; 55:143-190. DOI: 10.1128/mr.55.1.143-190.1991

Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. (2016). The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity. *Molecules*. 21(4):268. DOI: 10.3390/molecules21040268.

Navarro JA., García de la Fuente JN., Sánchez J., Martínez CM., Buendía AJ., Gutiérrez-Martin CB., Rodríguez-Ferri, E.F., Ortega, N., Salinas, J., 2004. Kinetics of infection and effects on the placenta of *Chlamydophila abortus* in experimentally infected pregnant ewes. *Veterinary Pathology*. 41, 498–505. DOI: 10.1354/vp.41-5-498

Netea MG, Joosten LA, Latz E, Mills KH, Natoli G, Stunnenberg HG, O'Neill LA, Xavier RJ. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science*. 22, 352(6284):aaf1098. DOI: 10.1126/science.aaf1098.

Newhall WJ, Jones RB. (1983). Disulfide-linked oligomers of the major outer membrane protein of *Chlamydiae*. *Journal of Bacteriology* 154, 998–1001. DOI: 10.1128/jb.154.2.998-1001.1983.

Nicola NA (1994). *Guidebook to Cytokines and their receptors*. Oxford: Oxford University Press.

Nietfeld JC. (2001). Chlamydial infections in small ruminants. *Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 17, 301-314. DOI: 10.1016/S0749-0720(15)30030-X

OIE (Organización Internacional de Sanidad Animal). Clamidiosis ovina. En: *Manual de pruebas de diagnóstico estandarizadas y vacunas*. 4ed. París: OIE, 2000. Aprobado en 2004. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.4.07_Aborto_enzootico_de_las_ovejas.pdf

OIE, 2012. Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydiosis). *World Organisation for Animal Health: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. Chapter 2.7.7.

Omsland A., Sager J., Nair V., Sturdevant DE., Hackstadt T. (2012). Developmental stage-specific metabolic and transcriptional activity of *Chlamydia trachomatis* in an axenic medium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 19781-19785. DOI: 10.1073/pnas.1212831109

O'Neill LM, O'Driscoll Á, Markey B. (2018). Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish Veterinary Journal*. 29, 71-13. DOI: 10.1186/s13620-018-0124-2.

Osaka I., Hefty PS. (2014). Lipopolysaccharide-binding alkylpolyamine DS-96 inhibits *Chlamydia trachomatis* infection by blocking attachment and entry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58, 3245–3254. DOI: 10.1128/AAC.02391-14

Palmer I., Wingfield PT. (2012). Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current protocols in protein science*, Chapter 6, Unit6.3. DOI: 10.1002/0471140864.ps0603s70

Pantchev A., Sting R., Bauerfeind R., Tyczka J., Sachse K. (2008). New realtime PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Veterinary Journal*. DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.02.025

Papp JR, Shewen PE (1996). Pregnancy failure following vaginal infection of sheep with *Chlamydia psittaci* prior to breeding. *Infection and Immunity*. 64,1116–1125. DOI: 10.1128/iai.64.4.1116-1125.1996

Papp JR, Shewen PE, Gartley CJ. (1993). *Chlamydia psittaci* infection and associated infertility in sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 57, 185–189.

Papp JR, Shewen PE, Gartley CJ. (1994). Abortion and subsequent excretion of chlamydiae from the reproductive tract of sheep during estrus. *Infection and Immunity*. 62, 3786–3792. DOI: 10.1128/iai.62.9.3786-3792.1994

Pavón L., Jiménez MC., Garcés ME. (2016). *Inmunología molecular, celular y traslacional*. Ed. Wolters Kluwer, Barcelona, España. pp 150-155.

Peltier MR., Liu WJ., Hansen PJ. (2000). Regulation of lymphocyte proliferation by uterine serpin: interleukin-2 mRNA production, CD25 expression and responsiveness to interleukin-2. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 223, 75–81. DOI: 10.1046/j.1525-1373.2000.22310.x.

Perry LL., Feilzer K., Caldwell HD. (1997). Immunity to *Chlamydia trachomatis* is mediated by T helper 1 cells through IFN-gamma-dependent and -independent pathways. *Journal of Immunology*. 158, 3344–3352.

Peterson EM., Cheng X., Pal S., de la Maza LM. (1993). Effects of antibody isotype and host cell type on in vitro neutralization of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity Journal*. 61, 498–503. DOI: 10.1128/iai.61.2.498-503.1993.

Phillips-Campbell R, Kintner J, Schoborg RV. (2014) Induction of the *Chlamydia muridarum* stress/persistence response increases azithromycin treatment failure in a murine model of infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(3):1782-4. DOI: 10.1128/AAC.02097-13.

Phillips-Campbell R., Kintner J., Whittimore J., Schoborg RV. (2012). *Chlamydia muridarum* enters a viable but non-infectious state in amoxicillin-treated BALB/c mice. *Microbes Infect*. 14, 1177–1185. DOI: 10.1016/j.micinf.2012.07.017

Pickett MA, Ward ME, Clarke IN. (1988). High-level expression and epitope localization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. *Molecular Microbiology*. 2(5):681-5. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1988.tb00077.x.

Pirbhai M, Dong F, Zhong Y, Pan KZ, Zhong G. (2006). The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in *Chlamydia trachomatis*-infected cells. *The Journal of Biological Chemistry*.281(42):31495-31501. DOI: 10.1074/jbc.m602796200.

Porcella SF, Carlson JH, Sturdevant DE, Sturdevant GL, Kanakabandi K, Virtaneva K, Wilder H, Whitmire WM, Song L, Caldwell HD. (2015). Transcriptional profiling of human epithelial cells infected with plasmid-bearing and plasmid-deficient *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity Journal*. 83(2):534-43. DOI: 10.1128/IAI.02764-14.

Porter E, Yang H, Yavagal S, Preza GC, Murillo O, Lima H, Greene S, Mahoozi L, Klein-Patel M, Diamond G, Gulati S, Ganz T, Rice PA, Quayle AJ. (2005). Distinct defensin profiles in *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* urethritis reveal novel epithelial cell-neutrophil interactions. *Infection and Immunity Journal*. 73(8):4823-33. DOI: 10.1128/IAI.73.8.4823-4833.2005

- Pospischil A., Borel N., Chowdhury EH., Guscetti F. (2009). Aberrant chlamydial developmental forms in the gastrointestinal tract of pigs spontaneously and experimentally infected with *Chlamydia suis*. *Veterinary Microbiology*. 135, 147–156. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.09.035
- Pospischil A., Thoma R., Hilbe M., Grest P., Gebbers JO. (2002). Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Medical Weekly*. 132, 64–66. DOI: 10.1024/0036-7281.144.9.463.
- Powrie F., Menon S., Coffman RL. (1993). Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *European Journal of Immunology*. 23, 3043–3049. DOI: 10.1002/eji.1830231147
- Rajeeve K, Das S, Prusty BK, Rudel T. (2018). *Chlamydia trachomatis* paralyzes neutrophils to evade the host innate immune response. *Nature Microbiology*. 3(7):824-835. DOI: 10.1038/s41564-018-0182-y.
- Rank RG., Whittimore J., Bowlin AK., Wyrick PB. (2011). In vivo ultrastructural analysis of the intimate relationship between polymorphonuclear leukocytes and the chlamydial developmental cycle. *Infection and Immunity Journal*. 79, 3291–3301. DOI: 10.1128/IAI.00200-11
- Raulston JE. (1997). Response of *Chlamydia trachomatis* serovar E to iron restriction in vitro and evidence for iron-regulated chlamydial proteins. *Infection and Immunity Journal*. 65, 4539–4547. DOI: 10.1128/iai.65.11.4539-4547.1997.
- Register KB., Morgan PA., Wyrick PB. (1986). Interaction between *Chlamydia* spp. and human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Infection and Immunity Journal*. 52, 664–670. DOI: 10.1128/iai.52.3.664-670.1986.
- Rizzo A., Paolillo R., Lanza AG., Guida L., Annunziata M., Carratelli CR. (2008). *Chlamydia pneumoniae* induces interleukin-6 and interleukin-10 in human gingival fibroblasts. *Microbiology and Immunology*. 52, 447–454. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00059.x.
- Rodolakis A, Salinas J, Papp J. (1998). Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Veterinary Research*. 29:275–288.
- Rodolakis A., Laroucau K. (2015). *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology*. 181, 107–118. DOI: 10.1016/j.vetmic.2015.07.010
- Rodolakis A., Mohamad KY. (2010). Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Veterinary Microbiology* 140, 382-391. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.03.014
- Rodolakis A., Salinas J., Papp J. (1998). Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 29, 275–288.
- Rodolakis A., Souriau A. (1979). Clinical evaluation of a commercial vaccine against chlamydial abortion of ewes. *Annales De Recherches Veterinaires* 10, 41-48.
- Rodolakis A., Souriau A. (1980). Clinical evaluation of immunity following experimental or natural infection of ewes with *Chlamydia psittaci* (var. *ovis*). *Annales de recherches veterinaires*. 11, 215– 223.
- Rodolakis A., Souriau A. (1983). Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* (var *ovis*) obtained by NTG mutagenesis. *Annales de recherches veterinaires*. 14, 155–161.

Rottenberg ME., Gigliotti-Rothfuchs A., Wigzell H. (2002). The role of IFN-gamma in the outcome of chlamydial infection. *Current Opinion in Immunology*. 14, 444–451. DOI: 10.1016/s0952-7915(02)00361-8

Rottenberg ME., Gigliotti-Rothfuchs, A., Gigliotti D., Ceausu M., Une C., Levitsky V., Wigzell H. (2000). Regulation and role of IFN-gamma in the innate resistance to infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Journal of Immunology* 164, 4812–4818. DOI: 10.4049/jimmunol.164.9.4812.

Rubio I, Montes-de-Oca R, Acosta-Dibarrat J, Monroy HG, Morales V, Fernández- P, Elghandour MMY, Odongo EN. (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. DOI 10.1016/j.jevs.2017.05.004

Rubtsov YP, Rasmussen JP, Chi EY, Fontenot J, Castelli L, Ye X, Treuting P, Siewe L, Roers A, Henderson WR Jr, Muller W, Rudensky AY. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity*. 28(4):546-58. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.02.017

Rupp J, Pfeleiderer L, Jugert C, Moeller S, Klinger M, Dalhoff K, Solbach W, Stenger S, Laskay T, van Zandbergen G. (2009). *Chlamydia pneumoniae* hides inside apoptotic neutrophils to silently infect and propagate in macrophages. *PLoS One*. 23;4(6):e6020. DOI: 10.1371/journal.pone.0006020.

Sabat R., Grutz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., Geginat J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 21, 331–344. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002

Sachse K, Laroucau K, Riege K, Wehner S, Dilcher M, Creasy HH, Weidmann M, Myers G, Vorimore F, Vicari N, Magnino S, Liebler-Tenorio E, Ruettger A, Bavoil PM, Hufert FT, 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, 79–88. DOI: 10.1016/j.syapm.2013.12.004

Sachse K., Bavoil PM., Kaltenboeck B., Stephens RS., Kuo CC., Rossello-Mora 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, 99–103. DOI: 10.1016/j.syapm.2014.12.004

Sachse K., Hotzel H. (2003). Detection and differentiation of *chlamydiae* by nested PCR. *Methods in Molecular Biology*. 216, 123–136. DOI: 10.1016/j.syapm.2013.12.004

Saka HA., Thompson JW., Chen YS., Kumar Y., Dubois L.G., Moseley MA., Valdivia RH. (2011). Quantitative proteomics reveals metabolic and pathogenic properties of *Chlamydia trachomatis* developmental forms. *Molecular Microbiology*. 82, 1185-1203. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07877.x

Salinas J., Ortega N., Borge C., Rangel MJ., Carbonero A., Perea A., Caro MR. (2012). Abortion associated with *Chlamydia abortus* in extensively reared Iberian sows. *Veterinary Journal*. 194, 133–134. DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.03.002

Salinas J., Sanchez J., Buendia AJ., Souriau A., Rodolakis A., Bernabe A., Cuello F. (1994). The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. *Research in Microbiology*. 145, 611–620. DOI: 10.1016/0923-2508(94)90078-7.

Salinas J., Souriau A., Cuello F., Rodolakis A. (1995). Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*. 43, 219–226. DOI: 10.1016/0378-1135(94)00100-b.

- Sammin D., Markey B., Bassett H., Buxton D. (2009). The ovine placenta and placentitis-A review. *Veterinary Microbiology*. 135, 90–97. DOI: 10.1016/j.vetmic.2008.09.054
- Sandbulte J., TerWee J., Wigington K., Sabara M. (1996). Evaluation of *Chlamydia psittaci* subfraction and subunit preparations for their protective capacities. *Veterinary Microbiology*. 48, 69–282. DOI: 10.1016/0378-1135(95)00166-2.
- Sandoz KM., Rockey DD. (2010). Antibiotic resistance in *Chlamydiae*. *Future Microbiology*. 5, 1427–1442. DOI: 10.2217/fmb.10.96
- Santiago B. Expresión de OmpA recombinante de *Chlamydia abortus* en *Escherichia coli*. [Tesis de Maestría] Ciudad de México (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2019
- Sargison ND., Truysers IGR., Howie FE., Thomson JR., Cox AL., Livingstone M., Longbottom D. (2015). Identification of the 1B vaccine strain of *Chlamydia abortus* in aborted placentas during the investigation of toxæmic and systemic disease in sheep. *New Zealand Veterinary Journal*. 63, 284–287. DOI: 10.1080/00480169.2015.1018365
- Sarkar A., Möller S., Bhattacharyya A., Behnen M., Rupp J., van Zandbergen G., Solbach W., Laskay T. (2015). Mechanisms of apoptosis inhibition in *Chlamydia pneumoniae*-infected neutrophils. *International Journal of Medical Microbiology*. 493-500. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.04.006.
- Scapini P., Lamagna C., Hu Y., Lee K., Tang Q., DeFranco AL., Lowell CA. (2011). B cell-derived IL-10 suppresses inflammatory disease in Lyn-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108, E823-32. DOI: 10.1073/pnas.1107913108
- Schmeer N., Krauss H., Apel J., Adami M., Muller HP., Schneider W., Perez-Martinez JA., Rieser H. (1987). Analysis of caprine IgG1 and IgG2 subclass responses to *Chlamydia psittaci* infection and vaccination. *Veterinary Microbiology*. 14, 125–135. DOI: 10.1016/0378-1135(87)90004-6.
- Schoborg RV. (2011). *Chlamydia* persistence -- a tool to dissect *Chlamydia*--host interactions. *Microbes Infection*. 13, 649–662. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.03.004
- Schramm N., Bagnell CR., Wyrick PB. (1996). Vesicles containing *Chlamydia trachomatis* serovar L2 remain above pH 6 within HEC-1B cells. *Infection and Immunity Journal*. 64, 1208–1214. DOI: 10.1128/iai.64.4.1208-1214.1996.
- Scurlock AM., Frazer LC., Andrews CW Jr., O'Connell CM., Foote IP., Bailey SL., Chandra-Kuntal K., Kolls JK., Darville T. (2011) Interleukin-17 contributes to generation of Th1 immunity and neutrophil recruitment during *Chlamydia muridarum* genital tract infection but is not required for macrophage influx or normal resolution of infection. *Infection and Immunity Journal*. 1349-1362. DOI: 10.1128/IAI.00984-10.
- Sela M, Schechter I, Borek F. (1967). Antibodies to Sequential and Conformational Determinants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 32, 537–45. DOI: 10.1101/SQB.1967.032.01.065
- Shemer Y., Sarov I. (1985). Inhibition of growth of *Chlamydia trachomatis* by human gamma interferon. *Infection and Immunity Journal*. 48, 592–596. DOI: 10.1128/iai.48.2.592-596.1985.

- Siarkou V., Lambropoulos AF., Chrisafi S., Kotsis A., Papadopoulos O. (2002). Subspecies variation in Greek strains of *Chlamydophila abortus*. *Veterinary Microbiology*. 85, 145–157. DOI: 10.1016/s0378-1135(01)00506-5.
- Skipp PJS., Hughes C., McKenna T., Edwards R., Langridge J., Thomson NR., Clarke IN. (2016). Quantitative Proteomics of the Infectious and Replicative Forms of *Chlamydia trachomatis*. *PLoS One* 11, e0149011. DOI: 10.1371/journal.pone.0149011
- Souriau A., Salinas J., De Sa C., Layachi K., Rodolakis A. (1994). Identification of subspecies- and serotype 1-specific epitopes on the 80- to 90- kilodalton protein region of *Chlamydia psittaci* that may be useful for diagnosis of chlamydial induced abortion. *American Journal of Veterinary Research*. 55, 510–514.
- Srivastava PK., Menoret A., Basu S., Binder RJ., McQuade KL. (1998). Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world. *Immunity* 8, 657–665. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80570-1
- Stamp JT., McEwen AD., Watt JA., Nisbet DI. (1950). Enzootic abortion in ewes: transmission of the disease. *Veterinary Research*. 62, 251–254. DOI: 10.1136/vr.62.17.251
- Stamp JT., Watt JA., Cockburn RB. (1952). Enzootic abortion in ewes; complement fixation test. *Journal of Comparative Pathology*. 62, 93–101. DOI: doi.org/10.1016/S0368-1742(52)80009-8
- Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, Mitchell W, Olinger L, Tatusov RL, Zhao Q., Koonin EV, Davis RW. (1998). Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science* 282:754–759. DOI: 10.1126 /science.282.5389.754.
- Stephens RS, Kuo CC, Newport G, Agabian N. (1985). Molecular cloning and expression of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein antigens in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity Journal*. 47(3):713-8. DOI: 10.1128/iai.47.3.713-718.1985.
- Stephens RS, Sanchez-Pescador R, Wagar EA, Inouye C, Urdea MS. (1987). Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *Journal of Bacteriology*. 169(9):3879-85. DOI: 10.1128/jb.169.9.3879-3885.1987.
- Storz J, Page L A. (1971). Taxonomy of the *chlamydiae*: reasons for classifying organisms of the genus *Chlamydia* family *Chlamydiaceae*, in a separate order, *Chlamydiales* ord.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 21: 332-4.
- Storz J. (1971). Intestinal chlamydial infections of ruminants. In: *Chlamydia and Chlamydia-Induced Diseases*, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A., pp.146–154.
- Stothard DR, Boguslawski G, Jones RB. (1998). Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infection and Immunity Journal*. 66: 3618–3625. DOI: 10.1128/IAI.66.8.3618-3625.1998.
- Su H, Raymond L, Rockey DD, Fischer E, Hackstadt T, Caldwell HD. (1996). A recombinant *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein binds to heparan sulfate receptors on epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1;93(20):11143-8. DOI: 10.1073/pnas.93.20.11143.

- Su H, Zhang YX, Barrera O, Watkins NG, Caldwell HD. (1988). Differential effect of trypsin on infectivity of *Chlamydia trachomatis*: loss of infectivity requires cleavage of major outer membrane protein variable domains II and IV. *Infection and Immunity Journal*. 56(8):2094-100. DOI: 10.1128/iai.56.8.2094-2100.1988.
- Su H., Caldwell HD. (1991). In vitro neutralization of *Chlamydia trachomatis* by monovalent Fab antibody specific to the major outer membrane protein. *Infection and Immunity Journal*. 59, 2843–2845. DOI: 10.1128/iai.59.8.2843-2845.1991.
- Suchland RJ., Dimond ZE., Putman TE., Rockey DD. (2017). Demonstration of persistent infections and genome stability by wholegenome sequencing of repeat-positive, same-serovar *Chlamydia trachomatis* collected from the female genital tract. *Journal of Infectious Diseases*. 215, 1657–1665. DOI: 10.1093/infdis/jix155
- Suchland RJ., Sandoz KM., Jeffrey BM., Stamm WE., Rockey DD. (2009). Horizontal transfer of tetracycline resistance among *Chlamydia* spp. in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53, 4604–4611. DOI: 10.1128/AAC.00477-09
- Summersgill JT., Sahney NN., Gaydos CA., Quinn TC., Ramirez JA. (1995). Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infection and Immunity Journal*. 63, 2801–2803. DOI: 10.1128/iai.63.7.2801-2803.1995.
- Sun G, Pal S, Sarcon AK, Kim S, Sugawara E, Nikaido H, Cocco MJ, Peterson EM, de la Maza LM. (2007). Structural and functional analyses of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*. 189(17):6222-35. DOI: 10.1128/JB.00552-07.
- Sun G, Pal S, Weiland J, Peterson EM., de la Maza LM. (2009). Protection against an intranasal challenge by vaccines formulated with native and recombinant preparations of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein. *Vaccine*. 27: 5020–5025. DOI: 10.1016/j.vaccine.2009.05.008
- Sun X, Tian Q, Wang L, Xue M, Zhong G. (2017). IL-6-Mediated Signaling Pathways Limit *Chlamydia muridarum* Infection and Exacerbate Its Pathogenicity in the Mouse Genital Tract. *Microbes and Infection*. 19(11):536–45. DOI: 10.1016/j.micinf.2017.08.007
- Szaszák M, Steven P, Shima K, Orzekowsky-Schröder R, Hüttmann G, König IR, Solbach W, Rupp J. (2011). Fluorescence lifetime imaging unravels *C. trachomatis* metabolism and its crosstalk with the host cell. *PLoS Pathogens*. 7(7):e1002108. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002108.
- Szeredi L., Bacsadi A. (2002). Detection of *Chlamydophila (Chlamydia) abortus* and *Toxoplasma gondii* in smears from cases of ovine and caprine abortion by the streptavidin-biotin method. *Journal of Comparative Pathology*. 127, 257–263. DOI: 10.1053/jcpa.2002.0591.
- Takeda K., Kishimoto T., Akira S. (1997). STAT6: its role in interleukin 4-mediated biological functions. *Journal of Molecular Medicine*. 75, 317–326. DOI: 10.1007/s001090050117.
- Tan C, Hsia RC, Shou H, Carrasco JA, Rank RG, Bavoi PM. (2010). Variable expression of surface-exposed polymorphic membrane proteins in in vitro-grown *Chlamydia trachomatis*. *Cellular Microbiology*. 12(2):174–187. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01389.x
- Tang FF., Chang HL., Huang YT., Wang KC. (1957). Studies on the etiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. *Chinese Medical Journal*. 75, 429–447.

- Tanzer RJ, Hatch TP. (2001). Characterization of outer membrane proteins in *Chlamydia trachomatis* LGV serovar L2. *Journal of Bacteriology*. 183(8):2686–2690. DOI: 10.1128/JB.183.8.2686-2690.2001
- Tauber AI., Pavlotsky N., Lin JS., Rice PA. (1989). Inhibition of human neutrophil NADPH oxidase by *Chlamydia* serovars E, K, and L2. *Infection and Immunity Journal*. 1108-1112. DOI: 10.1128/iai.57.4.1108-1112.1989.
- Tecchio C., Cassatella MA. (2016). Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Seminars in Immunology*. 28, 119–128. DOI: 10.1016/j.smim.2016.04.003
- Thewessen EA., Freundt I., van Rijsoort-Vos JH., Stolz E., Michel MF., Wagenvoort JH. (1989). Comparison of HeLa 229 and McCoy cell cultures for detection of *Chlamydia trachomatis* in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 27, 1399–1400. DOI: 10.1128/jcm.27.6.1399-1400.1989
- Thomson NR., Yeats C., Bell K., Holden MTG., Bentley SD., Livingstone M., Cerdeno-Tarraga, AM., Harris B., Doggett J., Ormond D., Mungall K., Clarke K., Feltwell T., Hance Z., Sanders M., Quail MA., Price C., Barrell BG., Parkhill J., Longbottom D. (2005). The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Research*. 15, 629–640. DOI: 10.1101/gr.3684805
- Ting LM., Hsia RC., Haidaris CG., Bavoil PM. (1995). Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. *Infection and Immunity Journal*. 63, 3600–3608. DOI: 10.1128/iai.63.9.3600-3608.1995
- Todd WJ., Storz J. (1975). Ultrastructural cytochemical evidence for the activation of lysosomes in the cytotoxic effect of *Chlamydia psittaci* in macrophages. *Infection and Immunity Journal*. 12, 638-646. DOI: 10.1128/iai.12.3.638-646.1975
- Trinchieri G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annual review of immunology*. 13, 251–276. DOI: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001343
- Uhlir HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, Tannapfel A, Fontenot JD, Ramsdell F, Powrie F. (2006). Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *Journal of Immunology*. 1;177(9):5852-60. DOI: 10.4049/jimmunol.177.9.5852.
- van Den Broek M., Bachmann MF., Kohler G., Barner M., Escher R., Zinkernagel R., Kopf M. (2000). IL-4 and IL-10 antagonize IL-12-mediated protection against acute vaccinia virus infection with a limited role of IFN-gamma and nitric oxide synthetase 2. *Journal of Immunology*. 164, 371–378. DOI: 10.4049/jimmunol.164.1.371.
- van der Veen RC. (2001). Nitric oxide and T helper cell immunity. *International Immunopharmacology*. 1, 1491–1500. DOI: 10.1016/s1567-5769(01)00093-5.
- van Snick J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology* 8, 253–278. DOI: 10.1146/annurev.iy.08.040190.001345
- van Zandbergen G, Gieffers J, Kothe H, Rupp J, Bollinger A, Aga E, Klinger M, Brade H, Dalhoff K, Maass M, Solbach W, Laskay T. (2004). *Chlamydia pneumoniae* multiply in neutrophil granulocytes and delay their spontaneous apoptosis. *Journal of Immunology*. 1;172(3):1768-76. DOI: 10.4049/jimmunol.172.3.1768.

Vats V., Agrawal T., Salhan S., Mittal A. (2007). Primary and secondary immune responses of mucosal and peripheral lymphocytes during *Chlamydia trachomatis* infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 49, 280–287. DOI: 10.1111/j.1574- 695X.2006.00196.x

Villaverde A, Carrio MM. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters*. 25: 85–95. DOI: 10.1023/a:1025024104862

Villegas E, Solórzano A, Camacho A, Gutiérrez José. (2008). *Chlamydomonas reinhardtii*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 26 (10): 629-37. 10.1016/s0213-005x(08)75279-0

Vora GJ., Stuart ES. (2003). A Role for the glycolipid exoantigen (GLXA) in chlamydial infectivity. *Current Microbiology*. 46, 217–223. DOI: 10.1007/s00284-002-3843-1

Vorimore F, Hsia RC, 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0074823

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 *Chlamydomonas reinhardtii*. *Infection and Immunity Journal*. 71, 3240–3250. DOI: 10.1128/IAI.71.6.3240-3250.2003.

Vretou E., Loutrari H., Mariani L., Costelidou K., Eliades P., Conidou G., Karamanou S., Mangana O., Siarkou V., Papadopoulos O. (1996). Diversity among abortion strains of *Chlamydomonas psittaci* demonstrated by inclusion morphology, polypeptide profiles and monoclonal antibodies. *Veterinary Microbiology*. 51, 275–289. DOI: 10.1016/0378-1135(96)00048-x.

Vretou E., Psarrou E., Kaiser 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 *Chlamydomonas psittaci* serotype 1 (*Chlamydomonas abortus*). *Infection and Immunity Journal*. 69, 607–612. DOI: 10.1128/IAI.69.1.607-612.2001

Walder G., Hotzel H., Brezinka C., Gritsch W., Tauber R., Wurzner R., Ploner F. (2005). An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydomonas abortus*. *Obstetrics & Gynecology*. 106, 1215–1217. DOI: 10.1097/01.AOG.0000161060.69470.9c

Webley WC., Vora GJ., Stuart ES. (2004). Cell surface display of the chlamydial glycolipid exoantigen (GLXA) demonstrated by antibody-dependent complement-mediated cytotoxicity. *Current Microbiology*. 49, 13–21. DOI: 10.1007/s00284-003-4181-7

Wehrl W, Brinkmann V, Jungblut PR, Meyer TF, Szczeppek AJ. (2004). From the inside out processing of the chlamydial autotransporter PmpD and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Molecular Microbiology*. 51, :319–334. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03838.x

Wheelhouse N, Longbottom D. (2012). Endemic and emerging chlamydial infections of animals and their zoonotic implications. *Transboundary and Emerging Diseases*. 59,283–291. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2011.01274.x.

Wheelhouse N., Aitchison K., Laroucau K., Thomson J., Longbottom D. (2010). Evidence of *Chlamydomonas abortus* vaccine strain 1B as a possible cause of ovine enzootic abortion. *Vaccine* 28, 5657–5663. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.04.114

- Wheelouse NM, Sait M, Aitchison K, Livingstone M, Wright F, McLean K, Inglis NF, Smith GED, Longbottom D. (2012). Processing of *Chlamydia abortus* Polymorphic Membrane Protein 18D during the Chlamydial Developmental Cycle. PLOS ONE. 7;11, e49190. DOI: 10.1371/journal.pone.0049190.
- Wherry EJ, Ahmed R. (2004) Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. Journal of Virology. 78(11):5535-45. DOI: 10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004.
- Wild, D. (2013). The Immunoassay Handbook: Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques (4.^a ed., p. 144). Newnes.
- Williams DM., Grubbs BG., Pack E., Kelly K., Rank RG. (1997). Humoral and cellular immunity in secondary infection due to murine *Chlamydia trachomatis*. Infection and Immunity Journal. 65, 2876–2882. DOI: 10.1128/iai.65.7.2876-2882.1997.
- Wills PJ., Johnson L., Thompson RG. (1984). Isolation of *Chlamydia* using McCoy cells and buffalo green monkey cells. Journal of Clinical Pathology. 37, 120–121. DOI: 10.1136/jcp.37.2.120.
- Wilsmore A, Wilsmore B, Dagnall G, Izzard K, Woodland R, Dawson M, Venables C. (1990). Clinical and immunological responses of ewes following vaccination with an experimental formalin-inactivated *Chlamydia psittaci* (*ovis*) vaccine and subsequent challenge with the live organism during pregnancy. British Veterinary Journal. 146, 341–8. DOI: 10.1016/s0007-1935(11)80027-8.
- Wilsmore AJ., Izzard KA., Dagnall GJ., Wilsmore BC., Woodland RM. (1990a). Protection of ewes vaccinated with A22 strain *Chlamydia psittaci* (*ovis*) against challenge in pregnancy with homologous and heterologous strains of the organism. British Veterinary Journal. 146, 349–353. DOI: 10.1016/s0007-1935(11)80028-x.
- Wong WF, Chambers JP, Gupta R, Arulanandam BP. (2019). *Chlamydia* and Its Many Ways of Escaping the Host Immune System. Journal of Pathogens. 6;2019:8604958. DOI: 10.1155/2019/8604958.
- Wood, MM., Timms P. (1992). Comparison of nine antigen detection kits for diagnosis of urogenital infections due to *Chlamydia psittaci* in koalas. Journal of Clinical Microbiology. 30, 3200–3205. DOI: 10.1128/jcm.30.12.3200-3205.1992.
- Woods ML. 2nd, Mayer J., Evans TG., Hibbs JBJ. (1994). Antiparasitic effects of nitric oxide in an in vitro murine model of *Chlamydia trachomatis* infection and an in vivo murine model of *Leishmania major* infection. Immunology. 60, 179–195.
- Wyrick PB. (2010). *Chlamydia trachomatis* persistence in vitro: an overview. Journal of Infectious Diseases. 201 Suppl, S88-95. DOI: 10.1086/652394
- Wyrick PB., Brownridge EA. (1978). Growth of *Chlamydia psittaci* in macrophages. Infection and Immunity Journal. 19: 1054-1060. DOI: 10.1128/iai.19.3.1054-1060.1978.
- Xiang W, Yu N, Lei A, Li X, Tan S, Huang L, Zhou Z. (2021). Insights Into Host Cell Cytokines in *Chlamydia* Infection. Frontiers of Immunology. 21;12:639834. DOI: 10.3389/fimmu.2021.639834.
- Yang CF., Starr T., Song LH., Carlson JH., Sturdevant GL., Beare PA., Whitmire WM., Caldwell HD. (2015). Chlamydial lytic exit from host cells is plasmid regulated. MBio 6, e01648-15. DOI: 10.1128/mBio.01648-15.

Yen TY, Pal S, de la Maza LM. (2005). Characterization of the disulfide bonds and free cysteine residues of the *Chlamydia trachomatis* mouse pneumonitis major outer membrane protein. *Biochemistry*. 44(16):6250–6256. DOI: 10.1021/bi047775v.

Yilma AN., Singh SR., Fairley SJ., Taha MA., Dennis VA. (2012). The anti-inflammatory cytokine, interleukin-10, inhibits inflammatory mediators in human epithelial cells and mouse macrophages exposed to live and UV-inactivated *Chlamydia trachomatis*. *Mediators of Inflammation*. 520174. DOI: 10.1155/2012/520174

Yin J, Li G, Ren X, Herrler G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*. 127(3):335–347. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.07.012

Yoshida H., Kishi Y., Shiga S., Hagiwara T. (1998). Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Microbiology and Immunology*. 42, 411– 414. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1998.tb02303.x.

Yui J., Garcia-Lloret M., Wegmann TG., Guilbert LJ. (1994). Cytotoxicity of tumour necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary human placental trophoblasts. *Placenta*. 15, 819–835. DOI: 10.1016/s0143-4004(05)80184-5.

Zahn I., Szeredi L., Schiller I., Straumann Kunz U., Burgi E., Guscelli F., Heinen E., Corboz L., Sydler T., Pospischil A. (1995). Immunohistochemical determination of *Chlamydia psittaci/pecorum* and *C. trachomatis* in the piglet gut. *Zentralblatt für Veterinärmedizin*. B 42, 266–276.

Zhang T., Zhang Q., Chu J., Liu S., O Eko F., He C. (2015). Development and Evaluation of an ELISA Assay for Quantitation of *Chlamydia abortus* Pmp18 Antibodies in Pigs. *Pakistan Veterinary Journal*. 499-503

Zhang XY, Li JL, Dong MG, Gao LF, Zhong GM. (2010). Early Production of Interleukin-17 in Airway Upon Chlamydia Trachomatis Infection Increases the Local Secretion of IL-6 and MIP-2. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 42(5):509–13.

Zhang Y, Huang B. (2017). The development and diversity of ILCs, NK cells and their relevance in health and diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1024:225–44. DOI:10.1007/978-981-10-5987-2_11

Zhong G, Fan T, Liu L. (1999). *Chlamydia* inhibits interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class II expression by degradation of upstream stimulatory factor 1. *Journal of Experimental Medicine*. 21;189(12):1931-8. DOI: 10.1084/jem.189.12.1931.

Zhong G., Berry J., Brunham R.C. (1994). Antibody recognition of a neutralization epitope on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infection and Immunity Journal*., 62: 1576-1583. DOI: 10.1128/iai.62.5.1576-1583.1994.

Zuck M., Sherrid A., Suchland R., Ellis T., Hybiske K. (2016). Conservation of extrusion as an exit mechanism for *Chlamydia*. *Pathogens and Disease* 74, pii: ftw093. DOI: 10.1093/femspd/ftw093.

Zugel U., Kaufmann SH. (1999). Immune response against heat shock proteins in infectious diseases. *Immunobiology*. 201, 22–35. DOI: 10.1016/s0171-2985(99)80044-8.

Zundler S, Neurath MF. (2015). Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Review*. 26(5):559-68. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.003.

ANEXOS

ANEXO I. Soluciones para geles desnaturalizantes de Poliacrilamida – Duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y Western blot

1. Tris HCl pH 8.8, 1.5 M

Tris base	18.17 g
Agua destilada	50 ml

Se ajusta pH a 8.8 con HCl, se afora a 100 ml con agua destilada y se esteriliza a 121°C, 15 lb/in² durante 15 min. Se almacena a 4°C.

2. Tris HCl pH 6.8, 0.5 M

Tris base	6.0 g
Agua destilada	50 ml

Se ajusta pH a 6.8 con HCl, se afora a 100 ml con agua destilada y se esteriliza a 121°C, 15 lb/in² durante 15 min. Se almacena a 4°C.

3. Mix Acrilamida – Bisacrilamida

Acrilamida	30.0 g
Bisacrilamida	0.8 g

Filtrar con papel Whatman N°1. Se afora a 100 ml con agua destilada y se almacena en frasco ámbar a 4 °C.

4. Persulfato de amonio al 10%

Persulfato de amonio	100 mg
Agua destilada	1 ml

Se utiliza al momento o se hacen alícuotas de 100 µl y se congelan a -20 °C.

5. SDS al 10 %

Duodecil sulfato de sodio	10 g
Agua destilada	100 ml

6. Amortiguador de muestra (Buffer de Laemmli 4x)

0.5 M Tris-HCl pH 6.8	1.0 ml
Glicerol	0.8 ml
SDS al 10%	1.6 ml
2-mercaptoetanol	0.4 ml
Agua destilada	0.4 ml
Azul de bromofenol	0.020 mg

Se almacena en recipiente ámbar a temperatura ambiente.

7. Amortiguador de corrida pH 8.3 (tris glicina) 10x

Tris base	30 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Se ajusta el pH a 8.3 con HCl. Se afora a 1000 ml y se almacena a temperatura ambiente.

8. Amortiguador de corrida pH 8.3 (tris glicina) 1x

Amortiguador de corrida pH 8.3 (tris glicina) 10x 100 ml

Aforar a 1000 ml con agua destilada. Almacenar a temperatura ambiente.

9. Tinción de Coomassie

Etanol	40 %
Ácido acético	10 %
Azul brillante de Coomassie	0.05%
Agua destilada	60%

10. Solución desteñidora para tinción de Coomassie

Etanol	40 %
Ácido acético	10 %
Agua destilada	60%

11. Solución de transferencia (buffer de Towbin)

SDS	0.36 g
Tris base	3.03 g
Glicina	14.4 g
Metanol	200 ml

Se afora a 1000 ml con agua destilada. Se almacena en frasco ámbar a 4°C

ANEXO II. Soluciones para equilibrio y activación de columna Niquel-Sefarosa

1. EDTA 0.2 M

EDTA 14.89 g
Aforar a 200 ml de agua destilada

2. NaCl 0.5 M

NaCl 5.84 g
Aforar a 200 ml de agua destilada

3. NaOH 0.5 M

NaOH 4 g
Aforar a 200 ml de agua destilada

4. NiSO₄ 0.2 M

NiSO₄ 6.19 g

Aforar a 200 ml de agua destilada

5. Buffer de equilibrio

Tris HCl 50 mM pH 8

Tris base 1.21 g

Se ajusta pH a 8 con HCl, se afora a 200 ml con agua destilada.

6. Buffer de lavado

Tris HCl 50 mM pH 8, Imidazol 30 mM

Tris HCl 50 mM pH 8

Tris base 1.21 g

Se ajusta pH a 8 con HCl

Imidazol 0.396 g

Se afora a 200 ml

7. Buffer de elución

Tris HCl 50 mM pH 8, Imidazol 250 Mm

Tris HCl 50 mM pH 8

Tris base 1.21 g

Se ajusta pH a 8 con HCl

Imidazol 3.3 g

Se afora a 200 ml

Todas las soluciones se deben filtrar con filtro de 0.45 o 0.2 μ m. Se almacenan a 4°C.

ANEXO III. Soluciones para el desarrollo de la técnica de ELISA indirecto.

1. Solución de carbonato – bicarbonato

Na_2CO_3	1.59 g
NaCO_3H	3.93 g
NaN_3	200 mg

Ajustar pH a 9.6. Aforar a 1000 ml y esterilizar a 121°C, 15 lb/in² durante 15 min.

2. Ácido sulfúrico 2 N

H_2SO_4	2.6 ml
Agua destilada estéril	47.4 ml