



## Diagnóstico, prevención y control de enfermedades causadas por *Chlamydia* en pequeños rumiantes. Revisión



Fernando de Jesús Aldama <sup>a</sup>

Roberto Montes de Oca Jiménez <sup>a\*</sup>

Jorge Antonio Varela Guerrero <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Universidad Autónoma del Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Toluca, Estado de México, México.

\* Autor de correspondencia: romojimenez@yahoo.com

### Resumen:

Las especies que conforman el género *Chlamydia* afectan una amplia gama de hospederos animales, causando diversas patologías. *Chlamydia abortus* (*C. abortus*), *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) y *Chlamydia pecorum* (*C. pecorum*) son las de mayor relevancia clínica en pequeños rumiantes a nivel mundial, ya que han sido relacionadas con problemas reproductivos, oculares y del tracto digestivo respectivamente; dos de estas (*C. abortus* y *C. psittaci*), representan un riesgo potencial zoonótico al ser humano. El diagnóstico de infecciones por organismos de este género resulta complicado; ya que, en la mayoría de los casos no hay signología clínica que indique la presencia del agente en animales afectados. Actualmente en países europeos la prevención y control principalmente de *C. abortus* se realiza mediante la administración de inmunógenos atenuados comerciales; sin embargo, su uso no ha mostrado resultados satisfactorios en la protección de animales susceptibles. Por lo tanto, la implementación de nuevas opciones de inmunización basadas en la utilización de proteínas recombinantes es la línea de investigación que más realce está tomando actualmente. Adicionalmente, el uso de proteínas con potencial inmunogénico podrían ser herramientas importantes para el diagnóstico, prevención y control de estos patógenos. Debido a esto, la presente revisión se centró en recapitular los estudios más actuales enfocados al uso experimental de diferentes proteínas inmunogénicas de *Chlamydia* spp.

empleadas a nivel mundial, destacando su innovación y resultados obtenidos en los modelos experimentales.

**Palabras clave:** *Chlamydia*, Diagnóstico, PCR, Proteínas recombinantes, Vacunas.

Recibido: 28/11/2019

Aceptado: 02/12/2020

## Introducción

Las bacterias del género *Chlamydia* son organismos Gram negativos, intracelulares obligados que se caracterizan por compartir un ciclo de desarrollo bifásico único, cuentan con dos estructuras morfológicas denominadas: cuerpo elemental (CE); la cual, es la forma infectiva y el cuerpo reticular (CR), forma de la bacteria metabólicamente activa<sup>(1)</sup>. Estas bacterias causan una amplia gama de enfermedades en diferentes hospederos animales y el hombre<sup>(1,2)</sup>. Dentro del género, se han reportado un total de doce especies<sup>(3)</sup>: *C. trachomatis*, *C. muridarum*, *C. suis*, *C. psittaci*, *C. abortus*, *C. caviae*, *C. felis*, *C. pneumoniae*, *C. pecorum*, *C. avium*, *C. gallinacea*, *C. poikilothermis* y cuatro candidatos a especie: *C. ibidis*, *C. serpentis*, *C. corallus* y *C. sanzinia*<sup>(4-6)</sup>.

Algunas de estas especies tienden a afectar animales de producción; además, representan un riesgo potencial zoonótico al ser humano<sup>(7)</sup>. Las principales especies del género identificadas en estas especies animales son: *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum*; además, de que las patologías asociadas con éstas han sido ampliamente documentadas<sup>(1,2,8)</sup>.

Las patologías relacionadas con estos organismos son diversas, entre las que destacan: abortos, queratoconjuntivitis y problemas en el tracto digestivo<sup>(2,9)</sup>; sin embargo, *C. abortus* es la de mayor importancia en la producción pecuaria generando mayores pérdidas en los rebaños que por la presencia de *C. psittaci* y *C. pecorum*<sup>(1,2)</sup>.

Debido a la importancia para la salud pública y animal que representan estos organismos, la presente revisión se enfocó en realizar una recopilación de los estudios más recientes acerca del desarrollo de pruebas de diagnóstico, tratamiento y control de infecciones causadas por estas especies bacterianas, donde se resaltan los estudios enfocados a la producción de proteínas recombinantes; los cuales, han sido objeto de estudio en los últimos años.

## Especies del género *Chlamydia* que afectan a pequeños rumiantes

### *Chlamydia abortus*

Agente causal del Aborto Enzoótico Ovino (AEO), enfermedad que está ampliamente distribuida a nivel mundial; la cual, causa pérdidas económicas en países que se dedican a la actividad pecuaria. La enfermedad provoca aborto en ovejas gestantes en el último tercio de la gestación o en algunos casos el nacimiento de corderos débiles que no superan las 48 h de vida<sup>(1, 2)</sup>. Actualmente es considerada la patología de origen clamidial de mayor importancia; ya que, representa un riesgo potencial zoonótico ocupacional y para mujeres embarazadas que están en contacto con animales infectados<sup>(2)</sup>. En este orden, se han realizado diferentes reportes en los que además de causar abortos, provoca otras afecciones, tales como: enfermedad febril, desarrollo de coagulación intravascular diseminada, insuficiencia renal aguda y edema pulmonar<sup>(10)</sup>, septicemia y lesiones importantes en hígado, riñón y corazón; cabe mencionar que estas patologías se presentaron posterior al aborto<sup>(11)</sup>. Se describe también como agente causal de enfermedad pélvica inflamatoria<sup>(12)</sup>. En México la prevalencia de anticuerpos contra *C. abortus* se reportó en grupos de riesgo expuestos (trabajadores y médicos veterinarios) que estaban en contacto con rebaños con antecedentes de aborto<sup>(13)</sup>. Finalmente, también ha sido reportada como agente causal de problemas de neumonía<sup>(14)</sup>, demostrado de este modo el potencial zoonótico de esta especie bacteriana.

### *Chlamydia psittaci*

Bacteria de origen aviar que provoca psitacosis en aves y con riesgo potencial zoonótico comprobado. En los últimos cinco años se han realizado distintos estudios evidenciando el riesgo que representa esta especie bacteriana para el humano, principalmente por contacto con aves infectadas<sup>(2)</sup>. En primera instancia causando psitacosis, ornitosis<sup>(2)</sup> o neumonía atípica<sup>(15)</sup>. Asimismo, se ha reportado como agente causal de infecciones genitales en mujeres<sup>(16)</sup>. Se ha identificado en pacientes con enfermedades respiratorias; por ejemplo, neumonía en granjeros que trabajaban con animales infectados<sup>(17)</sup>. De igual forma, se ha relacionado con neumonía, tosferina y conjuntivitis<sup>(18)</sup>. No menos importante, asociando los posibles factores de riesgo involucrados en el contagio de la psitacosis en personas que manipulan aves<sup>(19,20)</sup>. Recientemente, se reportó como agente causal en un brote relacionado con enfermedad respiratoria grave entre trabajadores de plantas de sacrificio de aves de corral en USA<sup>(21)</sup>. Actualmente no existen reportes de contagio de *C. psittaci* de mamíferos al hombre.

## *Chlamydia pecorum*

Esta bacteria se aloja de forma natural en el tracto digestivo y ocasiona enteritis; en la mayoría de los casos ésta se presenta de manera subclínica, evitando así la detección oportuna de la enfermedad<sup>(22)</sup>. *C. pecorum* también, ha sido asociada con otras enfermedades, entre ellas: artritis, queratoconjuntivitis, encefalomiелitis, infertilidad, neumonía y mastitis, y ocasionando pérdidas económicas en las unidades de producción<sup>(22)</sup>. A pesar de la gran variedad de patologías con las que ha sido relacionado este agente bacteriano, el potencial zoonótico de esta especie de *Chlamydia* es aún desconocido<sup>(23)</sup>.

## Transmisión

Se ha documentado ampliamente que la forma en la que se transmiten mayormente estos organismos es mediante la vía oronasal<sup>(1)</sup>. *C. abortus* es excretado por las ovejas infectadas mediante fluidos vaginales o restos placentarios, los cuales, contaminan el agua o alimentos, el ingreso a animales susceptibles es mediante la ingesta de estos<sup>(2)</sup>.

*C. psittaci* habitualmente esta contenido en las heces fecales de aves y pequeños rumiantes, por lo cual, la principal ruta de transmisión de este patógeno es mediante la inhalación de aerosoles contaminados por las heces, en los comederos o zonas al aire libre<sup>(7)</sup>.

Se cree que la transmisión de *C. pecorum* se lleva a cabo mediante la vía oral-fecal o por ingestión o inhalación de bacterias contenidas en secreciones de animales infectados. Algunos estudios han sugerido una transmisión como resultado de factores como aseo mutuo, inhalación y hacinamiento<sup>(22)</sup>.

## Diagnóstico

Debido a la variedad de cuadros clínicos, hospederos animales y dado que estos agentes a menudo se diagnostican en combinación con otros agentes infecciosos, un diagnóstico definitivo generalmente requiere pruebas de laboratorio en la mayoría de los casos<sup>(24)</sup>. El diagnóstico de enfermedades de origen clamidial es complicado y requiere de metodologías complejas que necesitan de personal altamente capacitado para poder llevar a cabo un diagnóstico ideal<sup>(24)</sup>. Para realizar el diagnóstico de especies de *Chlamydia*, las muestras por elección son hisopados (vaginales, conjuntivales y/o rectales) conservados en medio de transporte especial para *Chlamydia* spp., sacarosa-fosfato-glutamato (SPG)<sup>(24,25)</sup>; por otra parte, el diagnóstico puede realizarse por métodos indirectos (ELISA) o directos (cultivo celular y PCR)<sup>(24)</sup>.

## Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas o ELISA (*del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), es una prueba de diagnóstico indirecta que detecta anticuerpos en suero de individuos afectados contra anticuerpos específicos de las bacterias de este género<sup>(2,24)</sup>, actualmente existen pruebas de ELISA disponibles comercialmente, entre las desventajas que tienen este tipo de pruebas son las reacciones cruzadas entre especies (*C. abortus* y *C. pecorum*); lo cual, dificulta el diagnóstico específico<sup>(2)</sup>. Los ensayos que evalúan diferentes antígenos para la detección de especies de *Chlamydia* spp. han sido diversos. Primeramente evaluando fragmentos de la MOMP a través de una prueba de ELISA indirecta (rOMP91B iELISA), la cual, mostró una sensibilidad y especificidad del 84.2 y 98.5 % respectivamente; el estudio demostró que la prueba de ELISA indirecta fue mejor en la diferenciación de animales infectados con *C. abortus* y *C. pecorum*<sup>(26)</sup>. Posteriormente, otro estudio evaluó diferentes antígenos recombinantes, todos estos fueron identificados a partir de la Proteína Polimórfica de la Membrana Externa o POMP90 (*del inglés, Polymorphic Outer Membrane Protein*). De las 11 fracciones identificadas, OMP90-3 y OMP90-4 fueron las más efectivas mostrando una sensibilidad del 95.7 y 94.3 % respectivamente y una especificidad del 100 % para ambas. Los hallazgos del estudio revelaron que la prueba de ELISA con el fragmento rOMP90-4 fue más sensible que la de rOMP90-3, ya que identificaba más muestras positivas para OEA y además, ambas fueron superiores a la prueba de fijación del complemento o CFT (*del inglés complement fixation test*)<sup>(27)</sup>.

Adicionalmente y de manera complementaria a estos estudios, se realizó un estudio en el cual, se evaluaron cuatro pruebas de ELISA experimentales basadas en CE completos de *C. abortus* (CE), una preparación a partir de la membrana externa de bacteria completa (SolPr) y dos fragmentos recombinantes de POMP90 (rOMP90-3 y rOMP90-4), contra tres pruebas comerciales, la prueba CHEKIT1 *Chlamydomphila abortus*, Pourquier1 ELISA *Chlamydomphila abortus* y ImmunoComb Ovine *Chlamydomphila* Antibody, Los resultados durante la prueba mostraron que la prueba de ELISA comercial ImmunoComb obtuvo la mayor sensibilidad (98.4 %) en comparación con las demás; sin embargo, la especificidad determinada (65.4 %) fue menor que todas las pruebas evaluadas. Los resultados al finalizar el estudio determinaron que, de las ocho pruebas de ELISA evaluadas, la prueba que ofrece mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad, fue la prueba de ELISA basada en el fragmento recombinante rOMP90-3 con valores de 96.8 % y 100 % respectivamente, este estudio demostró que esta prueba de ELISA experimental puede ser una alternativa adecuada para el diagnóstico serológico de AEO<sup>(28)</sup>. A estos resultados, se suma un estudio realizado en 2018; el cual, comparó tres pruebas comerciales (IDvet, MVD-Enfer y LSI) para la detección de anticuerpos contra *C. abortus* en ovejas, se evaluaron animales vacunados durante diferentes periodos de tiempo para medir la producción de anticuerpos entre animales que abortaban y animales que llegaban a término, los resultados revelaron que la prueba más

sensible fue la LSI (94.74 %) seguida por MVD-Enfer (78.95 %) y por último IDvet (73.68 %), los tres kits detectaron niveles altos de anticuerpos en las ovejas que abortaban en comparación con las que tenían corderos sin complicaciones. La prueba más sensible en este estudio se basa en la identificación del lipopolisacárido (LPS) clamidial; el cual, muestra reacción cruzada con todas las especies del género *Chlamydia*, se determina adecuado para identificar ovejas infectadas con cualquier especie de *Chlamydia*, pero no se considera específico para *C. abortus*<sup>(29)</sup>. Finalmente, un estudio reveló las desventajas que tienen este tipo de pruebas comerciales en cuanto a reacciones cruzadas entre *C. abortus* y *C. pecorum*, realizando la evaluación en diferentes rebaños, las pruebas serológicas revelaron una baja seropositividad de *C. abortus* empleando una prueba de ELISA basada en péptidos (1.2 %) en ovejas australianas y una seropositividad moderada en un rebaño de suiza con antecedentes clínicos de aborto asociados a *C. abortus* (26.9 %). Utilizando pruebas de CFT y ELISA, la seropositividad fue significativamente mayor, lo que sugiere reactividad cruzada entre estas dos especies. Adicionalmente, empleando una prueba de PCR tiempo real para detectar ADN de *C. pecorum* en animales australianos seropositivos a *Chlamydia* spp., se concluyó que la seropositividad de *Chlamydia* puede estar relacionado a la reactividad cruzada con infecciones endémicas de *C. pecorum*<sup>(30)</sup>. Debido a las desventajas que demuestran este tipo de pruebas es recomendable complementarlas con alguna otra más específica como las pruebas de PCR<sup>(24)</sup>.

### **Cultivo celular**

Por su naturaleza intracelular obligada, estas bacterias requieren de medios vivos para su aislamiento; debido a esto, actualmente se emplea el cultivo celular (células McCoy por elección) para dicho fin<sup>(24)</sup>, hasta hace algunos años esta técnica era considerada el estándar de oro para el diagnóstico de *Chlamydia* spp.<sup>(1)</sup>; sin embargo, el desarrollo de nuevas metodologías como la amplificación de ácido nucleico (PCR y secuenciación) empleadas para mejorar el diagnóstico, se consideran actualmente el estándar de oro para diagnosticar infecciones por *Chlamydia* spp.<sup>(8)</sup>. Otras pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa; la cual, es una técnica mucho más específica para la detección y tipificación de especies de *Chlamydia* spp. se emplean con mucha más frecuencia debido a que cuenta con una mayor sensibilidad y especificidad en comparación con el cultivo celular<sup>(2)</sup>.

### **Prueba de reacción en cadena de la polimerasa**

Esta prueba detecta ADN específico de cualquier organismo; por lo cual, es una prueba mucho más sensible y específica que el cultivo celular al momento de identificar el género y especie implicada en los individuos afectados<sup>(24)</sup>. En los últimos 15 años el uso de esta técnica ha tomado mucha relevancia y sus diferentes variantes revelan mejores resultados en comparación con las mencionadas anteriormente tales como: i) procesar un mayor número

de muestras, ii) menor tiempo para la obtención de resultados, iii) el uso de diferentes tipos de muestras para el diagnóstico, iv) los organismos no tienen que estar cien por ciento viables y v) mayor sensibilidad y especificidad. Desde que se implementó su uso en laboratorios de diagnóstico veterinario, los genes empleados para la identificación de estos agentes bacterianos han sido diferentes: proteína principal de la membrana externa o MOMP (*del inglés, Major Outer Membrane Protein*), proteínas de la membrana polimórfica o Pmp's (*del inglés, Polymorphic membrane protein*), 16S y 23S<sup>(24)</sup>. Las metodologías de PCR para la detección específica de especies de *Chlamydia* son variadas, por mencionar algunas: La prueba de PCR “*Touchdown enzyme time release*” para amplificar diferentes secuencias de ADN en las regiones variables de los genes de ARNr espaciador 16S y 16S-23S específicos para la identificación de especies de este género bacteriano; por ejemplo, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia psittaci*<sup>(31)</sup>. Otra variante de esta prueba, la PCR-RFLP prueba que identifica en primera instancia la presencia del gen *omp2* específico de la familia *Chlamydiaceae* y posteriormente mediante una digestión con la enzima de restricción *AluI*, tiene la capacidad de identificar un total de nueve especies del género *Chlamydia* entre estas, *C. abortus*, *C. pecorum*<sup>(32)</sup> y *C. psittaci*<sup>(33)</sup>. Adicionalmente, una variante enfocada al gen 16S específico de la familia *Chlamydiaceae* pero empleando una prueba de PCR en tiempo real demostró alta especificidad al evaluar muestras de diferentes especies de *Chlamydia* contra otros géneros bacterianos<sup>(34)</sup>; adicionalmente, esta variante también puede ser empleada para la identificación específica de especies de *Chlamydia* empleando iniciadores específicos para cada una<sup>(35)</sup>. Posteriormente, se desarrolló una prueba de PCR multiplex para la identificación de *C. abortus*, *C. pecorum* y *Coxiella burnetii*, implicadas como agentes causales de aborto, esta prueba a diferencia de las antes mencionadas, ayuda a identificar de manera simultánea a las tres especies, dicha prueba demostró ser altamente específica y rápida para la detección de estos agentes bacterianos<sup>(36)</sup>.

## Tratamiento

### Antibióticos

Para el tratamiento de patologías de origen clamidial, los antibióticos son los fármacos de elección, ya que las bacterinas en el caso del AEO solo están disponibles en algunos países de Europa y los costos que requieren para su implementación son muy elevados<sup>(2,7)</sup>. La administración de tetraciclina, penicilina y el cloranfenicol para el tratamiento de infecciones causadas por estos agentes bacterianos ha demostrado inhibir el crecimiento de estos organismos<sup>(24)</sup>, es importante recalcar, que el uso de los antibióticos debe ser de manera controlada para minimizar el desarrollo de resistencia por parte del patógeno. Aunque los antibióticos sirven para disminuir las pérdidas a causa de estos patógenos, este tipo de tratamientos no eliminan a las bacterias; ya que, los animales afectados siguen eliminando a los organismos; por lo cual, su uso profiláctico no es recomendado<sup>(37)</sup>. En países europeos,

además del uso de antibióticos también se implementa para el caso del AEO la administración de bacterinas para prevenir y controlar la enfermedad en rebaños con animales susceptibles, esto debido, a que es la única enfermedad de origen clamidial para la que existen bacterinas disponibles comercialmente<sup>(2)</sup>.

## Inmunógenos

En el siglo pasado, los inmunógenos destinados al tratamiento y prevención de enfermedades a nivel mundial han sido uno de los mayores logros de la salud pública; en este rubro, entre 2 a 3 millones de vidas son salvadas por la implementación de estas medidas de salud<sup>(38)</sup>. En el ámbito veterinario, los avances tecnológicos en el desarrollo de inmunógenos para el control de enfermedades han tenido un realce importante en los últimos 25 años, desde el empleo de bacterias completas ya sean vivas o muertas hasta el uso de inmunógenos de ADN; los cuales, ofrecen medidas más seguras tanto para el animal como para el médico veterinario que las administra<sup>(39)</sup>.

En los últimos 70 años, los estudios para el desarrollo de inmunógenos para combatir enfermedades de origen clamidial en especies animales principalmente ganado (ovinos, caprinos, bovinos y porcinos) se enfocan en prevenir pérdidas económicas en las unidades de producción; sin embargo, el objetivo principal es preservar la salud humana por la zoonosis que algunas de éstas representan. En los últimos 10 años los ensayos vacunales contra *Chlamydia* spp. se han incrementado, en estos estudios la proteína más empleada en los desafíos contra *Chlamydia* spp. ha sido la MOMP<sup>(40)</sup>. Adicionalmente, se han realizado estudios enfocados en la búsqueda de antígenos específicos de esta proteína de superficie para una diferenciación entre especies<sup>(41)</sup>. Posteriormente, se han empleado diferentes tipos de antígenos en el desarrollo de inmunógenos contra agentes clamidiales, las primeras pruebas empleaban tradicionalmente los CE, los cuales, eran inactivados mediante tratamientos con luz ultravioleta o vivos (atenuados) fijados con formalina. Posteriormente, a mediados de la década de los 90's los enfoques en el uso de otros antígenos para el desarrollo de vacunas de subunidades como: proteínas recombinantes, péptidos sintéticos, vectores de expresión y ADN comenzaron a emplearse para el desafío en modelos murinos principalmente<sup>(40)</sup>.

En el caso de *C. pecorum* solo existen dos ensayos de vacunas contra este agente; los cuales, han sido desafiados en modelos murino, aunque los resultados revelaron respuesta inmune en los animales, estos deben tratarse con cautela debido a que pocas veces los casos clínicos de abortos son relacionados con *C. pecorum*<sup>(42)</sup>.

Por último, aunque existen vacunas disponibles comercialmente para el control y prevención de *C. abortus*, está bien documentado que en el caso de la vacuna viva atenuada 1B C.

*abortus*, tiene el potencial de reactivación y causar la enfermedad en animales inmunizados<sup>(43-45)</sup>.

Del total de los desafíos vacunales contra *Chlamydia* spp. solo el 5 % han sido enfocadas a *C. abortus*, evaluados en ratones, vacas, ovejas y cerdos de Guinea<sup>(40)</sup>, los estudios evalúan algunas proteínas principalmente las Pmp's buscando diferentes variaciones o mutaciones que puedan servir como puntos clave para la prevención del AEO<sup>(46)</sup>.

## **Vacunas de subunidades, nuevas tecnologías para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico y prototipos vacunales**

A la fecha se han desarrollado diferentes estudios que han identificado a estos posibles candidatos, tanto para el diagnóstico como para el desarrollo de vacunas<sup>(2)</sup>. Las proteínas inmunorreactivas, expresadas en animales infectados, se han propuesto como nuevos candidatos como antígenos marcadores para el diagnóstico y el uso de diferentes genes de virulencia que pueden ser empleados para el desarrollo de prototipos de vacunas de subunidades para la prevención y control de enfermedades causadas por especies de *Chlamydia* spp<sup>(47)</sup>. En el caso de *C. abortus*, se han realizado diversos estudios, evaluando diferentes proteínas. Un estudio evaluó la respuesta inmune humoral provocada por algunas proteínas de superficie (MOMP, MIP, Pmp13G) y asociadas con la virulencia (CPAF, TARP, SINC), dicho estudio demostró que las ovejas que abortaron mostraron una fuerte respuesta de anticuerpos a los antígenos de superficie. Adicionalmente, identificaron que el antígeno más específico para el serodiagnóstico de las infecciones humanas por *C. abortus* fue la Pmp13G; esta proteína no mostró reactividad cruzada con otras especies de *Chlamydia* spp. que afectan a humanos<sup>(47)</sup>.

En cuanto a las proteínas empleadas actualmente para el desarrollo de prototipos vacunales, los estudios se han enfocado a tres proteínas que juegan un rol principal en el ciclo de desarrollo de la bacteria<sup>(40)</sup>. Otras proteínas de este género bacteriano utilizadas como antígenos en ensayos vacúnales son las proteínas de la superficie membranal de *Chlamydia* spp. las cuales, han mostrado que tienen regiones altamente conservadas<sup>(48)</sup>. Las proteínas de choque térmico (HSP) y las proteínas del factor de actividad similar a la proteasa de clamidia (CPAF) también, se han considerado como candidatos adecuados para el desarrollo de inmunógenos para el control y prevención de enfermedades de origen clamidial, estas han demostrado provocar una fuerte respuesta inflamatoria en el hospedero<sup>(49)</sup>. Otro estudio evalúa tres diferentes tipos de vacunas: vacuna de ADN, vacuna de fagos (*OmpA*) y una vacuna comercial viva atenuada, liofilizada basada en la cepa 1B de *Chlamydia abortus*. Aunque la vacuna de fagos ofrece buenos resultados, no supera la ofrecida por la vacuna comercial; sin embargo, el estudio concluye que este novedoso sistema de administración de vacunas ofrece ventajas que superan por mucho a las vacunas comerciales, tales como:

manejo, seguridad más eficiente y producción relativamente más económica<sup>(50)</sup>. Otras pruebas evaluaron una combinación con el polisacárido de *Lycium barbarum* (LBP3a), los resultados demostraron una buena protección en ratones desafiados con *C. abortus* empleando un polisacárido LBP3a combinado con una vacuna de ADN que codifica la MOMP de *C. abortus*<sup>(51)</sup>.

Posteriormente, se han propuesto otras proteínas, tales como las pertenecientes a la familia de las Pmp's, éstas han demostrado tener el potencial inmunogénico para el desarrollo de inmunógenos contra *C. abortus*<sup>(2)</sup>. Un estudio evaluó la Pmp18D en dos diferentes formulaciones, FL (ligando de tirosina quinasa 3 tipo Fms; Flt3L) y fantasmas de *Vibrio cholerae* (VCG) para inducir inmunidad innata y de protección cruzada contra la infección genital por *C. abortus*. La evaluación se realizó con la regulación de la expresión de la proteína, por la activación y diferenciación de diferentes tipos celulares. Los resultados demostraron que la formulación que ofrece mejores resultados es la Pmp18D+VCG<sup>(52)</sup>, así como otra variante, empleando un fragmento N-terminal de esta proteína, denominada Pmp18D.1, el estudio evaluó su capacidad para inducir una respuesta inmunes innata en células dendríticas y activar las vías de señalización involucradas en la secreción de IL-1 $\beta$ <sup>(53)</sup>. Otras proteínas empleadas como antígenos combinados (MIP y CPAF) demostraron una eficacia del 50% contra una vacuna viva atenuada comercial; adicionalmente, aunque existe liberación del patógeno por parte de los animales inmunizados, estos se liberan en menor cantidad en comparación con el control negativo. No obstante, se pudo observar en dicho estudio que cuando estas dos proteínas son administradas de manera individual no tiene efecto alguno contra la infección experimental<sup>(54)</sup>.

Contra *C. psittaci* se han realizado diversos estudios empleando diferentes tipos de proteínas. Inicialmente enfocada en la evaluación de la persistencia de una vacuna de ADN (pcDNA1-MOMP) y la expresión de la proteína recombinante (rMOMP) a partir de la MOMP de una cepa aviar de *C. psittaci*; la cual, ocasiona problemas respiratorios en pavos, los resultados demostraron que la persistencia de la vacuna fue de 10 semanas y la expresión de la proteína fue proporcional al tiempo de persistencia<sup>(55)</sup>. Posteriormente, empleando una vacuna de adenovirus recombinante empleando la misma proteína, se evaluó en aves contra la clamidiosis aviar, los resultados de este estudio demostraron que esta vacuna era segura y que la tasa de protección alcanzó hasta un 90 % en los animales desafiados. Aunque el período de protección de la vacuna fue de seis meses se enfatiza que los períodos de crecimiento de las aves utilizadas en carne son aproximadamente similares. Sin embargo, las aves destinadas a postura deben vacunarse dos veces, debido a que estas tienen periodos de vida más amplios<sup>(56)</sup>.

Por otra parte, también se han empleado las Pmp's como candidatos para el desarrollo de vacunas contra *C. psittaci*; en este sentido, un estudio desarrolló y examinó una vacuna recombinante administrada por el herpesvirus de los pavos, empleando el extremo 5' del gen

PmpD el cual codifica la fracción N-terminal de este (pmpD-N). La evaluación del virus recombinante (rHVT-pmpD-N) en las aves desafiadas reveló niveles aumentados de anticuerpos específicos contra PmpD y una proliferación de linfocitos específicos contra este. Después del desafío con la cepa *C. psittaci* CB7, se encontró una disminución significativa en la dificultad respiratoria, las lesiones y la carga bacteriana en el grupo desafiado<sup>(57)</sup>. Un estudio evaluó la eficacia de la vacunación con proteínas plasmídicas para prevenir la infección pulmonar por *C. psittaci* en ratones, en el cual, se emplea una proteína recombinante de CPSIT\_p8; la cual, pertenece a un importante factor de virulencia en forma de un plásmido "críptico" de 7,5 kb altamente conservado. Se produjo una recombinante de esta proteína y se desafió en modelo murino. Los resultados en este estudio demostraron que la inmunización disminuyó significativamente la carga bacteriana en los pulmones de los ratones desafiados, también se observó un nivel más bajo de IFN- $\gamma$ . Sus resultados concluyen que la proteína recombinante evaluada en dicho estudio induce una inmunidad protectora significativa contra *C. psittaci* y que ésta podría ser considerada como candidato para el desarrollo de una nueva vacuna para la prevención de infecciones causadas por esta bacteria<sup>(58)</sup>.

No obstante, otras proteínas implicadas en la virulencia de esta bacteria tales como, las proteínas de membrana de inclusión clamidial (Inc's) también ha sido empleadas como candidatos en el desarrollo de prototipos vacunales. Un estudio empleó una recombinante de la proteína de cabeza transmembrana CPSIT\_0846 y desafió ratones con infección en las vías respiratorias causada por *C. psittaci*, el estudio reveló un fuerte perfil de citocinas con altos niveles de IFN- $\gamma$ ; de igual forma, se detectó una fuerte respuesta inmune humoral en los ratones desafiados contando con altos títulos de anticuerpos IgG específicos. La fuerte respuesta inmune se correlacionó con una concentración bacteriana significativamente reducida y una disminución en la patología inflamatoria en los pulmones de los ratones después del desafío. Los resultados de este estudio sugieren que la proteína CPSIT\_0846 puede ser un posible antígeno candidato para el desarrollo de una vacuna para inducir protección contra este tipo de infecciones<sup>(59)</sup>.

Para la detección de anticuerpos contra *C. psittaci*, se desarrolló una prueba de ELISA basada en el fragmento N-terminal de la PmpD (PmpD-N), las pruebas se realizaron para determinar su sensibilidad y especificidad en aves infectadas experimentalmente y no infectadas. Los resultados de dicho estudio revelaron que la ELISA-PmpD-N tuvo una sensibilidad y especificidad del 97.9 %, 100 % respectivamente; además, no hubo reacción cruzada con sueros positivos para otros patógenos aviares. Los resultados concluyeron que esta fracción proteínica (PmpD-N) puede ser empleada como antígeno para el diagnóstico de infecciones por *C. psittaci* en aves<sup>(60)</sup>. Cabe destacar que todos los estudios se han realizado en *C. psittaci* de origen aviar; sin embargo, dado que *C. psittaci* está genéticamente relacionada con *C. abortus*<sup>(61)</sup>, con estas evidencias se puede contemplar la idea de enfocar los estudios en la variante que afecta a los pequeños rumiantes.

En *C. pecorum* el estudio más reciente enfocado al desarrollo de prototipos vacunales empleando proteínas de superficie se han realizado en ovejas infectadas experimentalmente y evaluando dos proteínas recombinantes: rMOMP y rPmpG, dicho estudio identificó epítomos de células B en animales asintomáticos, con artritis relacionada con este agente y animales inmunizados con una vacuna recombinante de estas proteínas. Los resultados de este estudio concluyen que estas pruebas pueden ayudar en mejorar las pruebas de diagnóstico de este agente en rebaños ovinos<sup>(62)</sup>.

Posteriormente, un estudio evalúa una prueba de ELISA directa utilizando dos antígenos de proteínas recombinantes de esta especie bacteriana (rPmpG y rMOMP-G) y mediante el método de Pepscan, se realizó un mapeo y caracterización de epítomos de células B en estas proteínas en corderos con infecciones por *C. pecorum* asintomáticas, con poliartritis asociada a *C. pecorum* y vacunados con las proteínas recombinante. Los resultados revelaron que existe una respuesta inmune de anticuerpos contra PmpG en la infección natural. Los anticuerpos contra MOMP-G se elevaron en animales con poliartritis. Finalmente, se identificó una respuesta de epítomos en corderos inmunizados y en corderos infectados naturalmente<sup>(63)</sup>.

## Conclusiones

Los estudios enfocados a la identificación de proteínas inmunorreactivas para el desarrollo de pruebas de ELISA y prototipos vacunales contra enfermedades causadas por especies del género *Chlamydia* que afectan a pequeños rumiantes han tomado mucha relevancia en los últimos años, debido a la importancia en salud pública, bienestar animal y económica que estas representan.

Los inmunoensayos con proteínas específicas de cada especie como las Pmp's, pueden ser un punto clave para evitar reacciones cruzadas entre especies; lo cual, disminuiría resultados erróneos en los laboratorios de diagnóstico veterinario.

*C. abortus* es la especie del género que más importancia ha tenido en la última década; ya que, las vacunas comerciales disponibles no han dado resultados satisfactorios para la prevención y control del AEO; además, del riesgo biológico que esta representa. El uso de vacunas de subunidades como opción para el desarrollo de prototipos tiene buenos niveles de seguridad en comparación con las vacunas comerciales; ya que, no representan un riesgo para el personal que las maneja y ofrecen resultados iguales o superiores a los ofrecidos por éstas.

### Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflicto de intereses.

### Literatura citada:

1. Longbottom D, Coulter LJ. Animal chlamydioses and zoonotic implications. *J Comp Pathol* 2003;128:217–244.
2. Rodolakis A, Laroucau K. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Vet Microbiol* 2015;181:107-118.
3. Sachse K, Bavoil PM, Kaltenboeck B, Stephens R, Kuo CC, Rosselló-Móra R. *et al.* Emendation of the family *Chlamydiaceae*: Proposal of a single genus, *Chlamydia*, to include all currently recognized species. *Syst Appl Microbiol* 2015;38:99–103.
4. Vorimore F, Hsia R-ching, Huot-Creasy H, Bastian S, Deruyter L, Passet A. *et al.* Isolation of a new *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS One* 2013;8(9):e74823.
5. Taylor-Brown A, Bachmann NL, Borel N, Polkinghorne A. Culture-independent genomic characterisation of Candidatus *Chlamydia sanzina*, a novel uncultivated bacterium infecting snakes. *BMC Genomics* 2016;17(1):710.
6. Staub E, Marti H, Biondi R, Levi A, Donati M, Leonard CA, *et al.* Novel *Chlamydia* species isolated from snakes are temperature-sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. *Sci Rep* 2018;(1):5660
7. Bommana S, Polkinghorne A. Mini review: Antimicrobial control of chlamydial infections in animals: Current practices and issues. *Front Microbiol* 2019;10:1-9.
8. Borel N, Polkinghorne A, Pospischil A. A review on chlamydial diseases in animals: still a challenge for pathologists? *Vet Pathol* 2018;55:374-390.
9. Jelocnik M, Laurence M, Murdoch FR, Polkinghorne A. Detection of *Chlamydiaceae* in ocular swabs from Australian pre-export feedlot sheep. *Aust Vet J* 2019;97(10):401-403.
10. Johnson F, Matheson BA, Williams H, Laing AG, Jandial V, Davidson-Lamb R, *et al.* Abortion due to infection with *Chlamydia psittaci* in a sheep farmer's wife. *Br Med J* 1985;290:592-594.
11. Pospischil A, Thoma R, Hilbe M, Grest P, Gebbers FO. Abortion in woman caused by caprine *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serovar 1). *Swiss Med Wkly* 2002;132:64-66.

12. Walder G, Meusburger H, Hotzel H, Oehme A, Neunteufel W, Dierich MP, *et al.* *Chlamydophila abortus* Pelvic Inflammatory Disease. *Emerg Infect Dis* 2003;9(12):1642-1644.
13. Barbosa Mireles MA, Salazar García F, Fernández Rosas P, Montes de Oca-Jiménez R. Detection of serologic antibodies against *Chlamydophila Abortus* in two groups of people exposed to risk in ovine farms in Xalatlaco, Mexico. *Trop Subtrop Agroecosystem* 2013;16:423-429.
14. Ortega N, Caro MR, Gallego MC, Murcia-Belmonte A, Álvarez D, del Río L, *et al.* Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Irish Vet J* 2016;69:78.
15. Fossádal ME, Grand M, Gaini S. *Chlamydophila psittaci* pneumonia associated to exposure to fulmar birds (*Fulmaris glacialis*) in the Faroe Islands. *Infect Dis (Auckl)* 2018;50:817-821.
16. Osman KM, Ali HA, Eljakee JA, Gaafar MM, Galal HM. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of multiple *chlamydiaceae* species isolated from genital infection of women in Egypt. *Microb Drug Resist* 2012;18:440-445.
17. Lagae S, Kalmar I, Laroucau K, Vorimore F, Vanrompay D. Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. *J Med* 2014;63:399-407.
18. Cadario ME, Frutos MC, Arias MB, Origlia JA, Zelaya V, Madariaga MJ, *et al.* Epidemiological and molecular characteristics of *Chlamydia psittaci* from 8 human cases of psittacosis and 4 related birds in Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2017;49:323-327.
19. Čechová L, Halánová M, Babinská I, Danišová O, Bartkovský M, Marcincák S, *et al.* Chlamydiosis in farmed chickens in slovakiaand zoonotic risk for humans. *Ann Agric Environ Med* 2018;25:320-325.
20. Tolba HMN, Abou Elez RMM, Elsohaby I. Risk factors associated with *Chlamydia psittaci* infections in psittacine birds and bird handlers. *J Appl Microbiol* 2019;126:402-410.
21. Shaw KA, Szablewski CM, Kellner S, Kornegay L, Bair P, Brennan S, *et al.* Psittacosis outbreak among workers at chicken slaughter plants, Virginia and Georgia, USA, 2018. *Emerg Infect Dis* 2019;25(11):2143–2145.

22. Walker E, Lee EJ, Timms P, Polkinghorne A. *Chlamydia pecorum* infections in sheep and cattle: A common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. *Vet J* 2015;206:252–260.
23. Rodolakis A, Mohamad KY. Zoonotic potential of *Chlamydophila*. *Vet Microbiol* 2010;140:382.
24. Sachse K, Vretou E, Livingstone M, Borel N, Pospischil A, Longbottom D. Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. *Vet Microbiol* 2009;135:2-21.
25. Mora Diaz JC, Díaz Aparicio E, Herrera López E, Suarez Güemes F, Escalante Ochoa C, Jaimes Villareal S, *et al.* Aislamiento de *Chlamydia abortus* en rebaños caprinos lecheros y su relación con casos de aborto en Guanajuato, México. *Vet Mex* 2015;2:11.
26. Longbottom D, Psarrou E, Livingstone M, Vretou E. Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS Microbiol Lett* 2001;195:157-161.
27. Longbottom D, Fairley S, Chapman S, Psarrou E, Vretou E, Livingstone M. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. *J Clin Microbiol* 2002;40:4235-4243.
28. Wilson K, Livingstone M, Longbottom D. Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydophila abortus* infection in sheep. *Vet Microbiol* 2009;135:38-45.
29. O'Neill LM, O'Driscoll, Markey B. Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish Vet J* 2018;71:1-9.
30. Bommana S, Jelocnik M, Borel N, Marsh I, Carver S, Polkinghorne A. The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock. *J Med* 2019;68:627-632.
31. Madico G, Quinn TC, Boman J, Gaydos CA. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae* and *C. psittaci* Using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *J Clin Microbiol* 2000;38:1085-1093.
32. Marsilio F, Di Martino B, Di Francesco CE, Meridiani I. Diagnosis of ovine chlamydial abortions by PCR-RFLP performed on vaginal swabs. *Vet Res Commun* 2005;29:99-106.

33. Hartley JC, Kaye S, Stevenson S, Bennett J. PCR Detection and molecular identification of *Chlamydiaceae* species. *J Clin Microbiol* 2001;39:3072-3079.
34. Condon K, Oakey J. Detection of *Chlamydiaceae* DNA in veterinary specimens using a family-specific PCR. *Lett Appl Microbiol* 2007;45:121-127.
35. Nordentoft S, Kabell S, Pedersen K. Real-time detection and identification of *Chlamydomphila* species in veterinary specimens by using SYBR green-based PCR assays. *Appl Environ Microbiol* 2011;77:6323-6330.
36. Berri M, Rekiki A, Boumedine K, Rodolakis A. Simultaneous differential detection of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum* and *Coxiella burnetii* from aborted ruminant's clinical samples using multiplex PCR. *BMC Microbiol* 2009;9:130.
37. Essig A, Longbottom D. *Chlamydia abortus*: new aspects of infectious abortion in sheep and potential risk for pregnant women. *Curr Clin Microbiol Reports* 2015;2:22-34.
38. Delany I, Rappuoli R, De Gregorio E. Vaccines for the 21st century. *EMBO Mol Med* 2014;6(6):708-720.
39. Francis MJ. Recent advances in vaccine technologies. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract* 2018;48:231-241.
40. Phillips S, Quigley BL, Timms P. Seventy years of *Chlamydia* vaccine research - Limitations of the past and directions for the future. *Front Microbiol* 2019;10:1-18.
41. Hoelzle LE, Hoelzle K, Wittenbrink MM. Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. *Vet Microbiol* 2004;103:85-90.
42. Rekiki A, Bouakane A, Rodolakis A. Combined vaccination of live 1B *Chlamydomphila abortus* and killed phase I *Coxiella burnetii* vaccine does not destroy protection against chlamydiosis in a mouse model. *Can J Vet Res* 2004;68(3):226–228.
43. García-Seco T, Pérez-Sancho M, Salinas J, Navarro A, Díez-Guerrier A, García N, *et al.* Effect of preventive *Chlamydia abortus* vaccination in offspring development in sheep challenged experimentally. *Front Vet Sci* 2016;3:67.
44. Laroucau K, Aaziz R, Vorimore F, Menard MF, Longbottom D, Denis G. Abortion storm induced by the live *C. abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild-type infection. *Vet Microbiol* 2018;225:31-33.

45. Longbottom D, Sait M, Livingstone M, Laroucau K, Sachse K, Harris SR, *et al.* Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine* 2018;36:3593-3598.
46. Burall LS, Rodolakis A, Rekiki A, Myers GSA, Bavoil PM. Genomic analysis of an attenuated *Chlamydia abortus* live vaccine strain reveals defects in central metabolism and surface proteins. *Infect Immun* 2009;77(9):4161–4167.
47. Forsbach-Birk V, Foddis C, Simnacher U, Wilkat M, Longbottom D, Walder G, *et al.* Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *J Clin* 2013;8:1-15.
48. Hagemann JB, Simnacher U, Longbottom D, Livingstone M, Maile J, Soutschek E, *et al.* Analysis of humoral immune responses to surface and virulence-associated *Chlamydia abortus* proteins in ovine and human abortions by use of a newly developed line immunoassay. *J Clin Microbiol* 2016;54:1883-1890.
49. Vasilevsky S, Stojanov M, Greub G, Baud D. Chlamydial polymorphic membrane proteins: Regulation, function and potential vaccine candidates. *Virulence* 2016;7(1):11–22.
50. Li W, Guentzel MN, Seshu J, Zhong G, Murthy AK, Arulanandam BP. Induction of cross-serovar protection against genital chlamydial infection by a targeted multisubunit vaccination approach. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14(12):1537-1544.
51. Ling Y, Liu W, Clark JR, March JB, Yang J, He C. Protection of mice against *Chlamydomytila abortus* infection with a bacteriophage-mediated DNA vaccine expressing the major outer membrane protein. *Vet Immunol Immunopathol* 2011;144:389–395.
52. Ling Y, Li S, Yang J, Yuan J, He C. Co-administration of the polysaccharide of *Lycium barbarum* with DNA vaccine of *Chlamydomytila abortus* augments protection. *Immunol Invest* 2011;40:1–13.
53. Pan Q, Pais R, Ohandjo A, He C, He Q, Omosun Y, *et al.* Comparative evaluation of the protective efficacy of two formulations of a recombinant *Chlamydomytila abortus* subunit candidate vaccine in a mouse model. *Vaccine* 2015;33:1865–1872.
54. Pan Q, Zhang Q, Chu J, Pais R, Liu S, He C, *et al.* *Chlamydomytila abortus* Pmp18.1 induces IL-1 $\beta$  secretion by TLR4 activation through the MyD88, NF- $\kappa$ B, and caspase-1 signaling pathways. *Front Cell Infect Microbiol Frontiers* 2017;7:514.

55. O'Neill LM, Keane OM, Ross PJ, Nally JE, Seshu J, Markey B. Evaluation of protective and immune responses following vaccination with recombinant MIP and CPAF from *Chlamydia abortus* as novel vaccines for enzootic abortion of ewes. *Vaccine* 2019;37:5428–5438.
56. Loots K, Vleugels B, Ons E, Vanrompay D, Goddeeris BM. Evaluation of the persistence and gene expression of an anti-*Chlamydophila psittaci* DNA vaccine in turkey muscle. *BMC Vet Res* 2006;2:18.
57. Qiu C, Zhou J, Cao XA, Lin G, Zheng F, Gong X. Immunization trials with an avian chlamydial MOMP gene recombinant adenovirus. *Bioeng Bugs* 2010;1:267-273.
58. Liu S, Sun W, Chu J, Huang X, Wu Z, Yan M, *et al.* Construction of recombinant HVT expressing PmpD, and immunological evaluation against *Chlamydia psittaci* and Marek's disease virus. *PLoS One* 2015;10(4):e0124992.
59. Liang M, Wen Y, Ran O, Chen L, Wang C, Li L, *et al.* Protective immunity induced by recombinant protein CPSIT\_p8 of *Chlamydia psittaci*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016;100:6385-6393.
60. Ran O, Liang M, Yu J, Yu M, Song Y, Yimou W. Recombinant protein CPSIT 0846 induces protective immunity against *Chlamydia psittaci* infection in BALB/c mice. *Pathog Dis* 2017;75:18.
61. Liu SS, Chu J, Zhang Q, Sun W, Zhang TY, He C. Development of a novel PmpD-N ELISA for *Chlamydia psittaci* infection. *Biomed Environ Sci* 2016;29:315-322.
62. Pannekoek Y, Dickx V, Beeckman DSAB, Jolley KA, Keijzers WC, *et al.* Multi locus sequence typing of *Chlamydia* reveals an association between *Chlamydia psittaci* genotypes and host species. *PLoS One* 2010;5(12):e14179.
63. Desclozeaux M, Jelocnik M, Whitting K, Saifzadeh S, Bommana S, Potter A, *et al.* Safety and immunogenicity of a prototype anti-*Chlamydia pecorum* recombinant protein vaccine in lambs and pregnant ewes. *Vaccine* 2017;35(27):3461–3465.