

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



OBTENCIÓN DE NUEVOS INMUNÓGENOS DE
Chlamydophila pneumoniae MEDIANTE
INMUNOSCREENING PARA SU APLICACIÓN EN EL
SERODIAGNÓSTICO

Enrique Villegas Martínez

Granada, 2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Enrique Villegas Martínez
D.L.: GR. 2285-2009
ISBN: 978-84-692-3082-4

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



Obtención de nuevos inmunógenos de *Chlamydophila pneumoniae* mediante inmunoscreening para su aplicación en el serodiagnóstico

Memoria presentada por
Enrique Villegas Martínez
para optar al título de Doctor

Granada, Junio de 2009

El trabajo que se describe en esta memoria ha sido realizado en los laboratorios Vircell S.L. (Santa Fe, Granada), bajo la dirección de la Dra. Ana Camacho Páez y el Dr. José Gutiérrez Fernández, gracias a la financiación obtenida del Proyecto de Excelencia CTS-138 “Descripción de inmunógenos de *Chlamydia pneumoniae* reconocidos por los sueros de sujetos con enfermedad arterial periférica. Relaciones clínicas” y del grupo de investigación CTS-521 “Investigación traslacional en Microbiología Médica” concedidos por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía.

Fdo: Enrique Villegas Martínez



D. José Gutiérrez Fernández, Profesor Titular de Microbiología de la Facultad de Medicina de Granada y D^a Ana Camacho Páez, Doctora en Farmacia y Directora del Departamento de Biología Molecular de la empresa VIRCELL S.L. (Santa Fe, Granada)

CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por el Ldo. Enrique Villegas Martínez, titulado **“Obtención de nuevos inmunógenos de *Chlamydophila pneumoniae* mediante inmunoscreening para su aplicación en el serodiagnóstico”**, ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular de VIRCELL S.L. y en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina, bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral, para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Granada, Junio de 2009

Fdo: Ana Camacho Páez

Fdo: José Gutiérrez Fernández

Parte de los contenidos de esta Tesis Doctoral están publicados en las revistas:

- Villegas E, Sorlózano A, Camacho A y Gutiérrez J. 2008. *Chlamydophila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 26: 627-35.
- Villegas E, Camacho A, Carillo JA, Sorlózano A, Rojas J y Gutiérrez J. 2008. Emerging strategies in the diagnosis, prevention and treatment of *Chlamydophila pneumoniae* infections. *Expert Opin Ther Patents*; 18: 1175-89.
- Carillo JA, Gutiérrez J, García F, Muñoz A, Villegas E, Rojas J, Sorlózano A y Rojas A. 2009. Development and evaluation of a multiplex test for the detection of atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood. *Clin Microbiol Infect*; Published online: 19 Mar 2009.

Nothing should be accepted as impossible
unless it is clearly proved to be impossible

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Historia de <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	3
1.2. Taxonomía de <i>C. pneumoniae</i>	4
1.3. Características microbiológicas y ciclo celular	5
1.4. Antígenos	9
1.4.1. Lipopolisacárido (LPS)	10
1.4.2. Proteínas de la membrana externa	12
1.4.3. Proteínas del proceso celular	15
1.4.4. Proteínas relacionadas con el metabolismo	17
1.4.5. El peptidoglucano	18
1.5. Epidemiología y patogénesis de la infección por <i>C. pneumoniae</i>	19
1.6. Infección persistente	21
1.7. <i>C. pneumoniae</i> y la arteriosclerosis	22
1.8. Diagnóstico	24
1.8.1. Cultivo celular	25
1.8.2. PCR	26
1.8.3. Métodos serológicos	29
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL	37
3.1. Líneas celulares y cepas bacterianas	39
3.2. Medios de cultivo	39
3.2.1. Para HEp-2	39
3.2.2. Para <i>C. pneumoniae</i>	40
3.2.3. Para <i>E. coli</i>	40
3.2.4. Suplementación de medios	40
3.3. Tampones y soluciones	42
3.4. Material para Biología Molecular	44
3.4.1. Plásmidos	44
3.4.2. Reactivos	46

3.5. Material Serológico	47
3.5.1. Sueros	47
3.6. Instrumentación	48
3.6.1. Para cultivos celulares	48
3.6.2. Para electroforesis	48
3.6.3. Centrífugas	48
3.6.4. Para electroporación	49
3.6.5. Otros	49
3.7. Software	49
4. MÉTODOS	51
4.1. Crecimiento y manipulación de células	53
4.1.1. <i>C. pneumoniae</i>	53
4.1.2. Línea celular HEp-2	54
4.1.3. <i>E. coli</i>	55
4.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos	60
4.2.1. Retrotranscripción	60
4.2.2. PCR	60
4.2.3. Recombinación homóloga	61
4.2.4. Digestión con enzimas de restricción	61
4.3. Construcción de una genoteca de expresión	62
4.3.1. Genoteca de entrada	62
4.3.2. Titulación de la genoteca de ADNc	63
4.3.3. Transferencia de la genoteca a un vector de expresión para <i>E. coli</i>	63
4.4. Separación de macromoléculas	64
4.4.1. Electroforesis	64
4.4.2. Cromatografía	66
4.5. Inmunoabsorción de anticuerpos primarios	69
4.6. Western-blot	69
4.6.1. Transferencia	69
4.6.2. Inmunodetección	70
4.7. Técnicas serológicas	70
4.7.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	70
4.7.2. Prueba inmunoenzimática para determinación de anticuerpos (ELISA)	71

4.7.3. Interpretación	72
4.8. Inmunización del conejo	73
4.9. Inmunoscreening de la genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i> en la cepa BL21	74
4.10. Cuantificación de macromoléculas	75
4.10.1. Espectrofotómetro	75
4.10.2. En placas de agarosa-EtBr	76
4.10.3. Método Bradford	76
5. RESULTADOS	77
5.1. Construcción de una genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	79
5.1.1. Construcción de una genoteca de entrada de <i>C. pneumoniae</i> utilizando tecnología Gateway®	79
5.1.2. Transferencia de la genoteca a un vector de expresión de <i>C. pneumoniae</i> utilizando la tecnología Gateway®	81
5.1.3. Análisis de la genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	82
5.1.4. Expresión de la genoteca transferida a pDEST17	83
5.2. Inmunoscreening de la genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	84
5.2.1. Estudios preliminares	84
5.2.2. Inmunoscreening propiamente dicho de la genoteca de expresión	87
5.3. Identificación bioinformática de las secuencias de <i>C. pneumoniae</i>	96
5.4. Purificación de las proteínas/polipéptidos recombinantes inmunoreactivos	97
5.4.1. Exinucleasa ABC subunidad C	99
5.4.2. ADN Topoisomerasa I	100
5.4.3. GTPasa	102
5.4.4. Péptido transportador ABC de la ATPasa	104
5.4.5. Small protein B	105
5.4.6. LtuB	107
5.5. ELISA con inmunógenos de <i>C. pneumoniae</i> obtenidos de la genoteca	109
5.5.1. Selección y validación de sueros humanos	110
5.5.2. Medidas de ELISA usando los recombinantes de <i>C. pneumoniae</i> como antígenos	111

6. DISCUSIÓN	117
6.1. Análisis del ARN usado para la construcción de la genoteca de expresión	119
6.2. Genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	121
6.2.1. Proceso de construcción de la genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	121
6.2.2. Análisis de clones de la genoteca de entrada y de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	121
6.2.3. Demostración de la presencia de ADN específico de <i>C. pneumoniae</i> insertado en la genoteca	122
6.3. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI	123
6.3.1. Análisis del sistema de inmunoscreening con un anticuerpo monoclonal	124
6.3.2. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI con sueros de pacientes	125
6.3.3. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI con suero de conejo	126
6.4. Identificación y análisis de los clones inmunoreactivos	128
6.5. Selección de sueros con anticuerpos anti-<i>C. pneumoniae</i> y sueros control para los ensayos ELISA	129
6.6. Estudio de la capacidad inmunogénica de los recombinantes en ELISA	130
7. CONCLUSIONES	137
8. BIBLIOGRAFÍA	141
9. ANEXOS	159
10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	173

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasa

ADNc: ADN complementario

APS: persulfato amónico

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasa

ARNm: ARN mensajero

ARNr: ARN ribosomal

ARNt: ARN de transferencia

ATP: adenosintrifosfato

BSA: *bovine serum albumin* / seroalbúmina bovina

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention* / Centros para el control y
prevención de la enfermedad

CE: cuerpo elemental

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CPE: cuerpo persistente

CR: cuerpo reticular

CsCl: cloruro de cesio

CV: volumen de columna

d(A/C/G/T)TP: desoxi-(Adenina/Citosina/Guanina/Timina) trifosfato

dNTP: desoxi-nucleótidos trifosfato

DEPC: dietilpirocarbonato

DO: densidad óptica

EAC: enfermedad arterial coronaria

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay* / ensayo inmunoabsorbente ligado a
enzimas

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica

EtBr: bromuro de etidio

Fc: fracción constante

FDA: *US Food and Drug Administration*

GTP: guanosintrifosfato

His: histidina

Hsp: *heat shock protein* / proteína de choque térmico

IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa

IEX: *ion exchange* / intercambio iónico

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL-1: interleukina-1

Inc: proteína de inclusión

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

LB: Luria-Bertani

LPS: lipopolisacárido

M: masa molecular

MI: membrana de inclusión

MOMP: *major outer membrane protein* / proteína principal de la membrana externa

NC: nitrocelulosa

Omc: *outer membrane complex* / proteína del complejo de membrana externa

Omp: *outer membrane protein* / proteína de la membrana externa

p/v: peso/volumen

pb: pares de bases

PBS: *phosphate buffered saline* / tampón fosfato salino

PCR: *polymerase chain reaction* / reacción en cadena de la polimerasa

PCRm: PCR múltiple

Pmps: *polimorphic membrane proteins* / proteínas polimórficas de membrana externa

PMSF: fluoruro fenilmetanosulfonil

PSI: *pounds per square inch* / libras por pulgada cuadrada. Unidad de presión

PVDF: fluoruro de polivinilideno

Rf: razón frontal

RT-PCR: *real-time PCR* / PCR a tiempo real

SFB: suero fetal bovino

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato sódico

Taq polimerasa: *Thermus aquaticus polymerase* / polimerasa de *Thermus aquaticus*

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina

Th: *T helper cells* / células T colaboradoras

TMB: tetrametilbenzidina

Tris: trihidroximetil aminometano

U: cantidad de enzima capaz de digerir 1 μg de ADN en 1 h a 37° C

ufc: unidad formadora de colonias

UV: ultravioleta

v/v: volumen/volumen

1.1. Historia de <i>Chlamydophila pneumoniae</i>	3
1.2. Taxonomía de <i>C. pneumoniae</i>	4
1.3. Características microbiológicas y ciclo celular	5
1.4. Antígenos	9
1.5. Epidemiología y patogénesis de la infección por <i>C. pneumoniae</i>	19
1.6. Infección persistente	21
1.7. <i>C. pneumoniae</i> y la arteriosclerosis	22
1.8. Diagnóstico	24

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de *Chlamydomphila pneumoniae*

Chlamydomphila pneumoniae (*C. pneumoniae*) fue declarada como una nueva especie en 1989 (Kuo y cols., 1995). Es una bacteria patógena intracelular obligada, extremadamente común, que infecta a casi todo el mundo y, frecuentemente, causa infecciones recurrentes a lo largo de la vida. La mayoría de esas infecciones inicialmente implican las vías altas y bajas del aparato respiratorio (faringitis, sinusitis, bronquitis y neumonía). La infección en humanos puede variar desde una enfermedad asintomática a una neumonía severa que requiera hospitalización. Además, se han publicado evidencias que sugieren que este organismo puede infectar a los macrófagos dentro del tracto respiratorio que, posteriormente, a través del torrente circulatorio, se transportan a otras zonas como el endotelio vascular, donde las células endoteliales, células del músculo liso y macrófagos pueden ser infectados (Gieffers y cols., 2001), implicando a este patógeno en el desarrollo de la arteriosclerosis, enfermedades cardiovascular y otras enfermedades degenerativas. Sin embargo, el papel de *C. pneumoniae* como agente etiológico en estas enfermedades todavía no ha sido probado y continua siendo controvertido.

C. pneumoniae se aisló por primera vez en 1965 de la conjuntiva de un niño taiwanés durante una vacunación anti-tracoma (Kuo y cols., 1986). En 1971, cuando los métodos de cultivo celulares estuvieron suficientemente desarrollados, se observaron inclusiones densas en las células hospedadoras de cultivos celulares infectadas por la cepa TW-183, que tenían una morfología más similar a las de *Chlamydomphila psittaci* que a las de *Chlamydia trachomatis*.

El papel de este organismo como patógeno humano no fue definido hasta 1983, cuando se obtuvo el primer aislamiento respiratorio (AR-39) en Seattle, Washington, de un estudiante universitario con faringitis (Grayston y cols., 1986). El aislamiento se realizó gracias a las evidencias serológicas, que indicaban que la cepa TW-183 estaba asociada con la neumonía (Saikku y cols., 1985).

De estos aislamientos deriva el nombre de “TWAR”, que se le dio inicialmente a *C. pneumoniae*, una combinación de los identificadores de laboratorio de los primeros aislamientos: conjuntivo (TW-183) y respiratorio (AR-39).

1.2. Taxonomía de *C. pneumoniae*

Este orden divergió muy pronto de otras bacterias en la evolución bacteriana, y su genoma sugiere que se adaptaron a la vida intracelular desde hace mucho tiempo (Stephens, 1999). Poseen un único ciclo de desarrollo bifásico que los diferencia del resto de microorganismos y es la base de su clasificación taxonómica dentro de un orden separado, *Chlamydiales* (Moulder, 1984).

Históricamente, el orden *Chlamydiales* incluye la familia *Chlamydiaceae*, clasificada en base a sus propiedades fenotípicas y a su ciclo único de desarrollo, con un sólo género, *Chlamydia*, y cuatro especies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*. Más recientemente, en base al análisis de las secuencias de los genes del ARNr 16S y ARNr 23S, se comprobó que existían suficientes diferencias entre *Chlamydia trachomatis* y el grupo *Chlamydia psittaci-Chlamydia pneumoniae*, lo que llevó a dividir esta familia en dos géneros diferentes (Everett y cols., 1999): *Chlamydia* y *Chlamydophila*, respectivamente, creándose una nueva clasificación. No obstante, junto a las especies anteriores, patógenos humanos, existen otras pertenecientes al orden *Chlamydiales* que carecen, en estos momentos, de interés clínico.

Tanto la nueva clasificación como la antigua, que no carecieron de controversia respecto a cual de ellas era la más apropiada, son actualmente usadas en la literatura (Figura 1.1.).

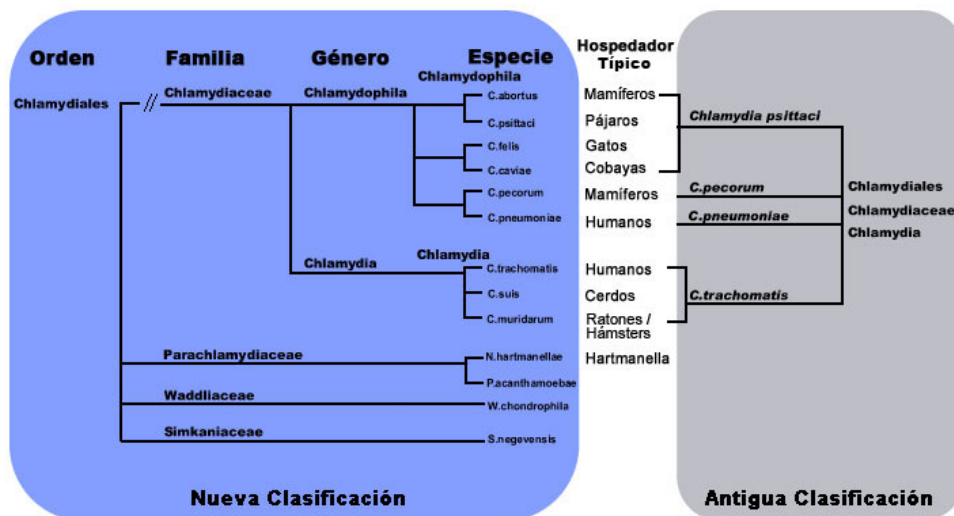


Figura 1.1. Taxonomía del orden *Chlamydiales*. Nueva y antigua clasificación del orden *Chlamydiales*. Imagen tomada de <http://www.chlamydiae.com>. Adaptada de Bush y Everett, 2001.

1.3. Características microbiológicas y ciclo celular

Durante su ciclo celular adopta dos morfologías distintas: una forma infecciosa extracelular, el cuerpo elemental (CE), y una forma replicativa intracelular, el cuerpo reticular (CR) (Figura 1.2.). El primero es pequeño y denso, tiene un tamaño entre 0,2 y 0,4 μm , una forma característica de pera y un gran periplasma. Morfológicamente es distinto a los CEs redondeados de *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) y *Chlamydophila psittaci* (*C. psittaci*). No obtiene nutrientes del exterior, y carece de actividad metabólica y de replicación. Posee una pared celular rígida, aunque lo suficientemente laxa como para permitir esta forma de pera, gracias a la presencia de proteínas ricas en aminoácidos azufrados, que forman un entramado denso que lo hace resistente a los factores ambientales.

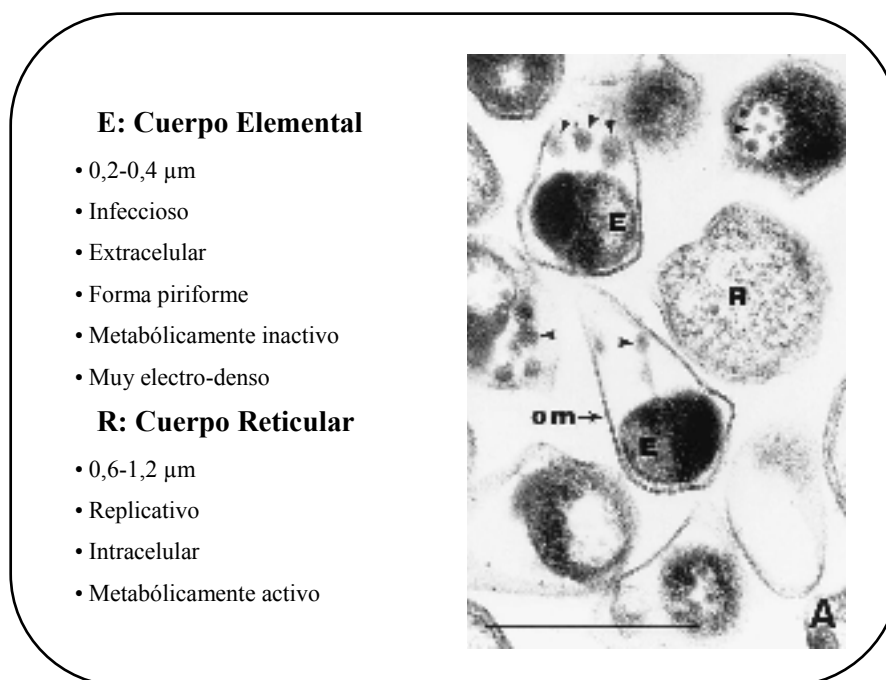


Figura 1.2. Caracteres generales de los cuerpos elementales y reticulares de *C. pneumoniae*.
Imagen tomada de Kuo y cols., 1995.

El CR es más grande, con un tamaño entre 0,6 y 1,2 μm . Procede de la transformación del CE tras entrar en la célula hospedadora. Éste obtiene nutrientes del citoplasma de la célula y se multiplica por división binaria. Los CRs son lábiles, osmóticamente inestables, e incapaces de infectar otras células.

C. pneumoniae es una bacteria intracelular obligada, con un ciclo único de desarrollo bifásico. Es gram-negativa y no se ha demostrado la presencia de peptidoglucano, aunque

si posee los genes que codifican las enzimas necesarias para su síntesis.

Su replicación se lleva a cabo mediante división binaria, que realiza en el interior de las células hospedadoras por carecer de capacidad para la síntesis de compuestos energéticos, que los obtiene de la célula que infecta. Durante el crecimiento en cultivos celulares, es auxotrófica para todos los aminoácidos excepto para la lisina (Kuo y Grayston, 1990). Es capaz de sintetizar sólo algunas proteínas y no puede sin embargo sintetizar ATP o GTP, moléculas altamente energéticas, que tiene que obtener de la célula infectada.

Tiene un genoma de solo 1.230.230 pb (Kalman y cols., 1999), de los más pequeños de los procariontes, con la excepción de *Mycoplasma* spp, pero hasta cinco veces más grande que el de los virus más complejos (Mandell y cols., 2004).

Carece de material genético extracromosómico (Read y cols., 2000), a diferencia de algunas cepas de *C. psittaci* (McClenaghan y cols., 1988) y la mayoría de *C. trachomatis* que contienen un plásmido de aproximadamente 7,5 kb.

Los diferentes aislados de *C. pneumoniae* obtenidos hasta la fecha tienen del 94% al 100% de homología genética entre ellos, y de menos del 10% de homología con *C. trachomatis* y *C. psittaci* (Cox y cols., 1988).

Todas las cepas de *C. pneumoniae* analizadas son inmunológicamente similares, además, las cepas representativas de distintos países han sido examinadas y han resultado ser muy similares (Moulder, 1991). En conclusión, a diferencia de las otras especies de *Chlamydia*, actualmente *C. pneumoniae* solo tiene un inmunotipo o serotipo. Finalmente, todo el género comparte un ciclo único celular que utiliza una forma infecciosa extracelular, el CE, y una forma replicativa intracelular, el CR.

El ciclo celular (Figura 1.3.) se inicia cuando un CE se acopla, por su zona más aguda, a la célula hospedadora por un mecanismo del tipo adhesina-receptor. Si bien, la identidad de las adhesinas y de los receptores de las células hospedadoras continúa siendo incierta. Se han propuesto varios proteoglicanos de la superficie de las células eucariotas como potenciales ligandos, siendo los glucosaminoglicanos, homólogos al heparán sulfato,

los candidatos más prometedores (Wuppermann y cols, 2001). Penetran en la célula por endocitosis y se forma un fagosoma, que no se fusiona con los lisosomas de la célula hospedadora (Hammerschlag, 2002). Es característica del orden *Chlamydiales* su habilidad para inhibir la fusión lisosomal, por mecanismos no definidos, permitiendo al CE habitar en una vesícula, rodeada de una membrana protectora, llamada membrana de inclusión (MI), visible al microscopio óptico. Entonces se modifica la membrana externa del CE, desaparecen los aminoácidos azufrados y se conforman, funcionalmente, las porinas (Stephens, 1999).

El paso de CE a CR, y viceversa, requiere un ciclo intracelular de 2-4 días en *C. pneumoniae* (Figura 1.3.). El CE se transforma en CR cuando penetran metabolitos, como fosfatos ricos en energía, y aminoácidos, aumentando la actividad metabólica. Estos procesos iniciales incluyen la síntesis de nuevas proteínas, reducción de los enlaces disulfuro y la activación de la adenosina trifosfatasa (Stratton y Mitchel, 1997).

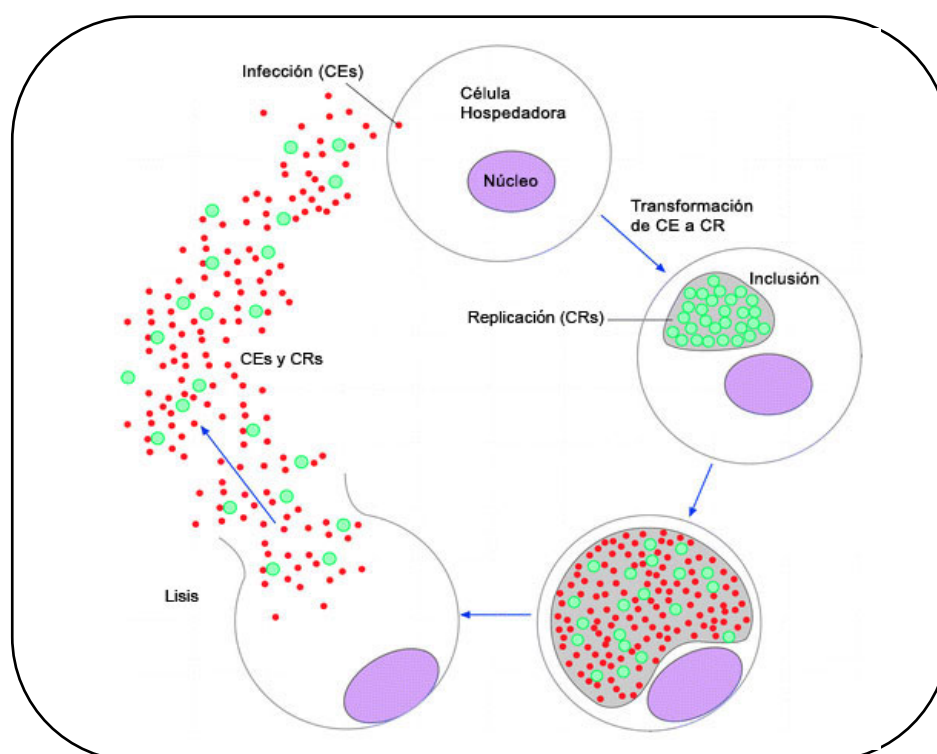


Figura 1.3. Esquema del ciclo replicativo de *C. pneumoniae*.
Imagen tomada de <http://www.chlamydiae.com>. Cortesía del Dr. Everett, KD.

Los CRs se dividen por fisión binaria produciendo una extensión de la inclusión que finalmente se llena de células. La inclusión clamidial y la célula infectada muestran en la superficie antígenos derivados de la bacteria. Los CRs madurarán, reduciendo su tamaño y

reorganizando su pared celular, a modo de CEs. En ese momento, las inclusiones contendrán CRs maduros y futuros CEs.

La condensación de CR a CE conlleva una compactación de la cromatina generando un núcleo electro-denso. Esta compactación es mediada por dos proteínas, Hc1 y Hc2, homólogas a las histonas H1 eucariotas, principalmente debido a su composición en aminoácidos básicos. Esta condensación tiene un efecto sobre la transcripción de genes específicos que marcan la diferenciación de un CR vegetativo a un CE infeccioso (Murata y cols., 2007). Dependiendo de las especies, las proteínas de la membrana se entrelazan durante la condensación o durante la lisis celular y liberación. La liberación de los CEs de las células infectadas se puede realizar por lisis celular, extrusión de las inclusiones o exocitosis y se cierra el ciclo de desarrollo permitiendo la infección de nuevas células.

En ocasiones, el ciclo celular se puede detener, de forma temporal o permanente, en la fase de CR, después del tratamiento con citoquinas, como el interferón- γ (IFN- γ), o antibióticos, después de la restricción de ciertos nutrientes o espontáneamente bajo ciertas condiciones de cultivo, pasando a denominarse cuerpos persistentes (CPEs). Así, Beatty y cols. (1994a), realizando cultivos celulares en líneas de epitelio de faringe humana, determinaron que uno de los mecanismos que induce a entrar a la bacteria en un estado persistente es la presencia de bajos niveles de IFN- γ .

Estos CPEs son CRs más grandes. Están caracterizados como grandes formas aberrantes no infectivas. Este estado críptico conlleva la reducción en la expresión de algunos antígenos, cambios en la morfología y pérdida de la infectividad. La infección persistente de *C. pneumoniae* parece estar relacionada con la continua expresión de genes asociados a la replicación del ADN pero no con los genes involucrados en la división celular. La división celular es muy lenta y la actividad metabólica es compleja. Así, mientras la expresión de algunos genes disminuye, como los relacionados con la división celular (*fisK*, *fisW*) otros aumentan su expresión (*pgk*, *groEL*), dependiendo de las condiciones de restricción y del tiempo transcurrido desde la infección (Hogan y cols. 2004). Estos CPEs poseen un menor número de porinas, comparado con los CRs, y una menor expresión de la mayoría de los componentes estructurales del organismo, incluyendo el lipopolisacárido (LPS), la proteína del complejo de membrana externa B (OmcB) y la proteína principal de la membrana externa (MOMP). Sin embargo, la síntesis

de la proteína de choque térmico de 60 kDa (Hsp60) se mantiene (Beatty y cols., 1994a), lo que hace pensar que los CPEs pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la infección crónica.

En estudios de persistencia de *C. trachomatis* en cultivos celulares, se demostró un menor ratio MOMP/Hsp60. Sin embargo, recientes estudios de *C. pneumoniae* informaron de un aumento de la expresión de MOMP, aumentando el ratio MOMP/Hsp60, lo que indicaría que este ratio no puede ser usado como un marcador universal de persistencia, como en un principio se pensó (Villegas y cols, 2008).

C. pneumoniae ha sido implicada en la patogénesis de varias enfermedades crónicas, incluyendo el asma y la arteriosclerosis. Este estado persistente podría ser una adaptación de la bacteria al hospedador para evitar el sistema inmunológico, reducir una virulencia innecesaria o mantenerse viable en condiciones adversas. Su presencia puede tener, como en el caso de *C. trachomatis*, repercusiones diagnósticas, porque pueden generar falsos negativos debido a la escasa expresión de antígenos o a la baja viabilidad de los CPEs en el cultivo celular. También puede tener repercusiones terapéuticas, ya que la pérdida de porinas esta frecuentemente asociada con la resistencia al tratamiento (Geisler y cols, 2001).

1.4. Antígenos

La membrana externa de *C. pneumoniae* muestra una gran complejidad (Figura 1.4.). Sus antígenos han sido ampliamente descritos en numerosos estudios, y los más importantes se recogen en la tabla 1.1. (Bannantine y cols., 2000; Gutiérrez y cols., 2006; Montigiani y cols., 2002; Pérez Melgosa y cols., 1994; Peterson y cols., 1998; Thorpe y cols., 2007; Vandahl y cols., 2001). Aunque se conoce el tipo y composición de sus principales proteínas antigénicas, se necesita un mayor estudio de los antígenos inmunogénicos para mejorar el diagnóstico y prevención de esta enfermedad.

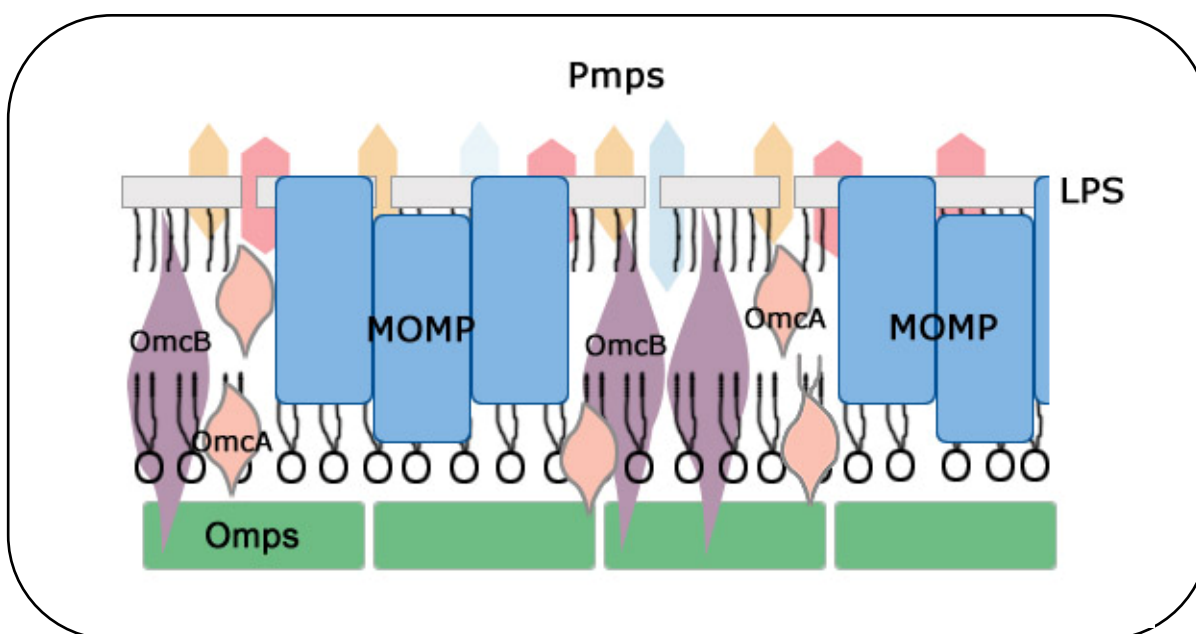


Figura 1.4. Modelo genérico de las proteínas de la membrana externa de los CE de *C. pneumoniae*. LPS: lipopolisacárido; MOMP: proteína principal de la membrana externa; Omc: proteína del complejo de membrana externa; Omps: proteínas de la membrana externa; Pmps: proteínas polimórficas de membrana.

1.4.1. Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es un antígeno presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Su presencia se ha demostrado mediante pruebas de fijación del complemento, inmunofluorescencia (IFI) (Karimi y cols., 1989) y ELISA (Birkelund y cols., 1989) y es una causa importante de las reacciones cruzadas que, con frecuencia, se observan en la serología de *Chlamydiaceae*.

Está presente en los CE, en los CRs, en la membrana de las células infectadas y en la región proximal de células no infectadas anejas a la anterior (Campbell y cols., 1994). Su presencia se ha demostrado a las 20 horas de la infección celular. Dado que la superficie de los CRs es muy superior a la de los CE, durante la transformación de los CRs nuevamente a CE, es probable que sean expulsadas grandes cantidades de LPS al exterior, a través de vesículas, desde la inclusión intracelular al citoplasma y a la superficie de la célula. Este hecho apoya la hipótesis que implica al LPS en la patogenia de las manifestaciones clínicas asociadas a *C. pneumoniae*.

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Caracterización de los principales antígenos de *Chlamydophila pneumoniae*.

Antígenos	Tamaño	Función	Presencia	Inmunogenicidad	pI*
LPS	No especificado	Integridad estructural	CEs y CRs	Inmunogénica específica-género	No especificado
<i>Asociados con la membrana externa</i>					
MOMP	39,5 kDa	Porina Integridad estructural	CEs y CRs	No inmunodominante	6,1
OmcA	9 kDa	Adhesina Integridad estructural	CEs	No especificado	6,1
OmcB	2 x 60 kDa	Adhesina periplásmica	CEs	Inmunogénica específica-género	5,6
Pmps 1-21	180-94 kDa	Proteínas autotransportadoras	CEs y CRs	Inmunogénicas	5-7
OmpH	17,3 kDa	Des	Des	Des	4,7
Omp85	74 kDa	Des	Des	Inmunogénica	8,3
Proteína 76 kDa	76 kDa	Des	CEs	Inmunogénica específica-especie	4,9
<i>Asociados con el proceso celular</i>					
IncA	No especificado	Desarrollo y mediadores de la MI	MI	No especificado	No especificado
IncB	No especificado	“	MI	No especificado	No especificado
IncC	No especificado	“	MI	No especificado	No especificado
Hsp60	58 kDa	Chaperona	CEs y CRs	Inmunogénica	5,3
Hsp70	71 kDa	Chaperona	CEs y CRs	Inmunogénica	5,6
Proteína E de respuesta baja en calcio	43 kDa	Regulador sistema de secreción tipo III	Des	Inmunogénica	5
<i>Asociados con el metabolismo</i>					
Enolasa	46 kDa	Invasión tisular Coagulación	Des	Inmunogénica	4,7

CEs: cuerpos elementales; CRs: cuerpos reticulares; Hsp: proteína de choque térmico; Inc: proteína de inclusión; LPS: lipopolisacárido; MOMP: proteína principal de la membrana externa; MI: membrana de inclusión; Omc: proteína del complejo de membrana externa; Omp: proteína de la membrana externa; Pmps: proteínas polimórficas de membrana; pI*: punto isoeléctrico teórico; Des: desconocido. (Bannantine y cols., 2000; Montigiani y cols., 2002; Pérez Melgosa y cols., 1994; Peterson y cols., 1998; Thorpe y cols., 2007; Vandahl y cols., 2001).

De manera indirecta, en base a la capacidad neutralizante de los anticuerpos monoclonales, pero no bien caracterizada, se han supuesto también en el LPS de *C. pneumoniae*, la presencia de epítomos específicos de especie (Peterson y cols., 1998). Del mismo modo, los estudios con anticuerpos monoclonales han sugerido que, durante el proceso de transformación de los CRs en CEs, la estructura del LPS puede sufrir algún cambio (Birkelund y cols., 1988; Birkelund y cols., 1989).

1.4.2. Proteínas de la membrana externa

1.4.2.1. Proteína principal de la membrana externa (MOMP)

Uno de los antígenos mejor caracterizados en las especies de *Chlamydia* es la MOMP. Es la proteína que se halla en mayor proporción (60%) en los CEs y CRs. Tiene una masa molecular de aproximadamente 39,5 kDa (entre 41,6 kDa y 37,72 kDa).

En los CEs tiene la función de mantener la integridad estructural. También actúa como porina, pero, para ello, se debe encontrar químicamente reducida, situación que consigue modificando las uniones entre las proteínas ricas en cisteína, estableciendo una situación sin enlaces disulfuro, permitiendo dicha función (Wyllie y cols., 1999) en los CRs activos metabólicamente (Bavoil y cols., 1984).

Esta proteína es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies. Tiene cuatro dominios variables, que tienden a situarse en la superficie de la membrana, y cinco constantes. MOMP es un antígeno inmunodominante en *C. trachomatis* y *C. psittaci*, induciendo la producción de anticuerpos neutralizantes durante la infección (Zhang y cols., 1989; Pérez Melgosa y cols., 1991). A pesar de la notable similitud de las secuencias de MOMP entre las especies de *Chlamydia*, en *C. pneumoniae* no está expuesta en la superficie y no se considera inmunodominante (Christiansen y cols., 1999; Wolf y cols., 2001). Esto se ha intentado explicar por la posible incapacidad del sistema inmunológico para identificar los epítomos superficiales de la MOMP, a causa de un mecanismo de interposición o enmascaramiento que ejercerían las proteínas polimórficas de membrana (Pmps) (Christiansen y cols., 1999). Esto no impide que algunos anticuerpos monoclonales sí puedan reconocer antígenos especie-específicos de *C. pneumoniae* y neutralizar la infección *in vitro* (Puolakkainen y cols., 1995). Finalmente, se han realizado numerosos esfuerzos para caracterizar los epítomos inmunogénicos de MOMP, ya que es una proteína inmunogénica, pero la producción de anticuerpos parece ocurrir solamente en condiciones nativas, porque la mayoría de sus epítomos parecen ser conformacionales (Wolf y cols., 2001).

1.4.2.2. Proteínas del complejo de membrana externa (Omc) ricas en cisteína

Están presentes en grandes cantidades en el CE y se sintetizan de manera tardía en la maduración del CR hacia CE. No están presentes en el CR (a diferencia de la MOMP) (Newhall, 1987). Se han denominado OmcA y OmcB por su asociación con el complejo de membrana externa (Omc).

La proteína OmcA recuerda a las lipoproteínas mureínicas de las bacterias gram-negativas. Es una adhesina (9 kDa) que se fija a las moléculas de heparina, facilitando la infectividad. Está anclada en la membrana externa por su región lipídica, mientras que la zona peptídica se extiende hacia el periplasma (Everett y cols., 1994).

Más controvertida es la estructura de la OmcB, una proteína constituida, a su vez, por dos fracciones de 60 kDa (Hatch y cols., 1984). Se ha propuesto que OmcB se situaría por encima de la capa interna de la membrana externa, constituyendo una red poliproteínica (Miyashita y cols., 1993) y extendiendo su fragmento hidrofílico de aminoácidos hacia el periplasma (Everett y Hatch, 1995). También se ha descrito la OmcB como una adhesina de localización periplásmica y con un extremo N-terminal extendido hacia la superficie, más o menos asociado a un canal hidrófilo de la membrana externa. En cualquier caso, el fragmento expuesto en la superficie sería muy escaso puesto que ningún estudio inmunológico ha conseguido detectar OmcB en la superficie de los CEs (Mygind y cols., 1998).

Se sabe que la posición de las cisteínas está muy conservada y mediante análisis por Western-blot, que es una proteína altamente inmunogénica, pero no se considera específica de especie, ya que, aunque existen epítomos específicos de especie, los anticuerpos humanos se unen a las regiones conservadas de OmcB, reduciendo la especificidad del ensayo serológico con este antígeno (Mygind y cols., 1998).

Finalmente, los puentes disulfuro de OmcB forman uniones cruzadas con los dominios periplásmicos de OmcA y de otras proteínas, contribuyendo a la estabilidad del CE (Everett y cols., 1994). Algunos autores proponen que este complejo es el equivalente al peptidoglucano, cuya presencia en *Chlamydia* es discutida (Hatch, 1996).

1.4.2.3. Proteínas polimórficas de membrana (Pmps)

Existen 21 Pmps en *C. pneumoniae*. Esta superfamilia esta considerada como proteínas autotransportadoras (Grimwood y Stephens, 1999). Las Pmps son específicas de especie, abundantes y, junto con MOMP y Omc, son las proteínas dominantes en la membrana externa de *C. pneumoniae* (Mygind y cols., 2004). Su disposición en la superficie bacteriana e inmunogenicidad justifican el interés por estas proteínas (Grimwood y cols., 2001). Se ha demostrado que al menos algunas de ellas son accesibles a los anticuerpos y pueden inducir una respuesta inmunológica. No obstante, los epítomos dominantes de las Pmps parecen ser conformacionales (Christiansen y cols., 1997; Knudsen y cols., 1999). Aunque, todavía no se conocen bien ni están suficientemente caracterizados, existen evidencias de que las Pmps estimulan tanto la defensa inmune como la innata durante la infección en ratones con *C. pneumoniae* (Mygind y cols., 2004).

Se ha demostrado que las secuencias de todas estas proteínas son transcritas, pero solamente se ha descrito la traducción estable y presencia en la membrana externa de algunas de ellas (Henderson y Lam, 2001). Son polimórficas, ya que tienen la capacidad de variar su antigenicidad y estructura. La existencia de genes silenciosos en esta familia indica que estos tienen la posibilidad de expresarse o no, variando la composición proteica de la superficie (Shirai y cols., 2000). Se piensa que dicha variabilidad depende del número de residuos de guanina, aunque no se ha demostrado con claridad si esta variabilidad es utilizada para evadirse del sistema inmunológico del hospedador o es intrínseca (Vandahl y cols., 2002). Aunque el papel biológico de las Pmps todavía no ha sido aclarado completamente, se ha propuesto su participación además, de el transporte molecular, en la adhesión y otras funciones asociadas a la pared celular (Montigiani y cols., 2002)

1.4.2.4. Otras proteínas de la membrana externa

Existen otras proteínas en la membrana externa de *C. pneumoniae* y cuya función no es bien conocida. Las que mayor interés despiertan, porque pueden ser importantes objetivos inmunoterapéuticos, son las siguientes (Tabla 1.1.):

- OmpH: es una proteína de la membrana externa de 17,3 kDa, que parece pertenecer a una familia de proteínas (Skp) con actividad chaperonina. En un estudio realizado por

Finco y col. (2005), se informó que es capaz de inducir anticuerpos neutralizantes *in vitro*, inhibir la diseminación de *C. pneumoniae* en hámsteres y que parece ser una proteína inmunoaccesible.

- **Omp85:** es una proteína localizada en la membrana externa, conservada y presente en muchos patógenos gram-negativos. No se conoce cual es su función y parece ser que no actúa como porina. Es un antígeno inmunoaccesible y sus anticuerpos pueden neutralizar la infección *in vitro* (Stephens y Lammel, 2001). Su masa molecular teórica es de 86 kDa, pero Vandahl y cols. (2001) informaron que la masa molecular observada experimentalmente era de 74 kDa.

- **Proteína de 76 kDa:** es una proteína que contiene epítomos específicos de especie y es capaz de neutralizar la infectividad de *C. pneumoniae in vitro*. Podría desempeñar un papel en la patogénesis y ser útil como herramienta de diagnóstico. No se ha observado reactividad con *C. trachomatis* ni con *C. psittaci*, y no se ha encontrado similitud en su secuencia con las secuencias de otras especies de *Chlamydia* (Pérez Melgosa y cols., 1994).

Stephens y Lammel (2001) sugieren que estas proteínas deberían ser investigadas por su uso potencial como vacunas.

1.4.3. Proteínas del proceso celular

Integra proteínas que sirven para la adaptación a condiciones atípicas, división celular, traducción, producción de toxinas, resistencia, transporte metabólico, función de chaperonas y de secreción. Dentro de este grupo destacamos las siguientes:

1.4.3.1. Proteínas de inclusión (Inc)

Se localizan en las membranas de inclusión (MI) de *C. pneumoniae* y del resto de miembros del orden *Chlamydiales*. Cada proteína posee un dominio hidrofóbico único de 50 a 80 aminoácidos (Bannantine y cols., 2000; Rockey y cols., 2002). Sus funciones se han relacionado con el desarrollo de la inclusión, la evasión del sistema inmunológico, la adquisición de nutrientes, e incluso, son mediadores en los procesos de transición de CRs a

CEs, y viceversa. Constituyen una familia de proteínas que juegan un importante papel en la infección, crecimiento y supervivencia en el hospedador celular (Toh y cols., 2003). Incluye las proteínas IncA, IncB e IncC.

1.4.3.2. Chaperonas

Parte de ellas son proteínas de choque térmico (Hsp) y favorecen el plegamiento correcto y/o corrigen plegamientos incorrectos de las proteínas desnaturalizadas. La Hsp60 (60 kDa) es una proteína muy conservada y parece estar implicada en los daños ocasionados en las arterias de los sujetos infectados debido a la hiperestimulación de macrófagos y a la inducción de autoanticuerpos, por mimetismo molecular con las Hsps humanas (Domeika y cols., 1998), lo que produciría citoquinas proinflamatorias y metaloproteinasas, que degradarían el colágeno (Kol y cols., 1998; Vandahl y cols., 2001; Lamb y cols., 2003). Se relaciona, por tanto, con la arteriosclerosis, por inducir un ataque a la pared endotelial, mediante una reacción de hipersensibilidad retardada, propia de las infecciones crónicas (Taylor y cols., 1990), pudiendo ser el eslabón entre los microorganismos involucrados y la autoinmunidad (Fong y cols., 2002; Mayr y cols., 1999).

Por su parte, la Hsp70 (70 kDa) está presente de forma temprana en la infección y juega un importante papel en el transporte de proteínas a través de las membranas (Hirono cols., 2003).

1.4.3.3. Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III en las bacterias gram-negativas está generalmente relacionado con la patogénesis de la infección. Permite la adhesión a la superficie de la célula eucariota, para inyectar proteínas bacterianas. Sin embargo, en *C. pneumoniae* está relacionada con el hecho de poder residir en vacuolas e inyectar proteínas a través de la MI al citoplasma de la célula hospedadora. Este aparato de secreción está constituido por unas 25 proteínas, lo que las hace atractivas para el diseño de vacunas (Cornelis y cols., 2000).

Se ha demostrado, tanto en CEs como en CRs, que *Chlamydia* está cubierta por unas protuberancias que parecen constituir este sistema. Estas protuberancias sirven para la

inyección de ciertas proteínas necesarias para la infección, la endocitosis y la muerte de macrófagos (Hueck, 1998). Sería lógico pensar que se tratara de las proteínas Inc las que se introdujeran a través de este sistema, debido a su localización en la MI y la ausencia de otras señales de secreción para ellas (Subtil y cols., 2001).

Una de las proteínas que constituyen este sistema de secreción tipo III, es la proteína E de respuesta baja en calcio (LcrE), que está considerada como un regulador del sistema de secreción tipo III. Parece estar presente en la superficie de los CEs y accesible a los anticuerpos, según estimaciones de Montigiani y cols. (2002), induciendo la activación de las células T CD4 y CD8, con secreción de citoquinas y de anticuerpos neutralizantes efectivos en la eliminación de la infección (Thorpe y cols., 2007). Estas condiciones la hacen ser un posible candidato como vacuna, puesto que al estar asociado al sistema de secreción tipo III, un eficiente bloqueo de este sistema puede inhibir, de forma constante, el proceso infeccioso de *C. pneumoniae*.

1.4.4. Proteínas relacionadas con el metabolismo

Entre las proteínas relacionadas con la biosíntesis de moléculas, se encuentran las que sintetizan cofactores (biotina, folatos), grupos prostéticos (grupo hemo, cobalamina) y transportadores metabólicos (ubiquinona y riboflavina).

Otro grupo de proteínas son las relacionadas con la degradación proteica. Se clasifican en 3 grupos:

- 1.- Degradación de proteínas, péptidos y glucoproteínas.
- 2.- Unión y estabilización de proteínas.
- 3.- Modificación y reparación.

Dentro de las proteínas relacionadas con el metabolismo del ADN y del ARN destacan las proteínas involucradas en la replicación, recombinación y reparación del ADN, como las polimerasas, exinucleasas e integrasas. También las proteínas relacionadas con la transcripción, implicadas en la formación, procesamiento y degradación del ARN, factores de transcripción y las proteínas relacionadas con la traducción, como las proteínas ribosomales, los factores de translación, los aminoácidos y los ARNt y ARNr modificados

(Kalman y cols., 1999).

Otro grupo de proteínas son las relacionadas con el metabolismo intermediario. Son las enzimas necesarias para el metabolismo del nitrógeno, de los componentes fosforados, sulfurados y amino-azucarados. Dentro de las relacionadas con el metabolismo energético está la enolasa que facilita la invasión tisular (Fontan y cols., 2000). Esta proteína comparte antígenos con la enolasa humana, presente en las células hematopoyéticas, por lo que en las infecciones por *Chlamydia*, la inducción de anticuerpos anti-enolasa podría ser responsable de reacciones autoinmunes inflamatorias (Montigiani y cols., 2002).

La enolasa es capaz de inducir *in vitro* anticuerpos neutralizantes, además ha mostrado capacidad para inhibir la diseminación de *C. pneumoniae* en hámsteres. Actualmente, ésta proteína está clasificada como de localización citoplasmática o periplasmática. Igualmente, estos resultados pusieron de manifiesto la inmun accesibilidad de la enolasa en los CEs viables, indicando una localización superficial (Finco y cols., 2005).

1.4.5. El peptidoglucano

La presencia de peptidoglucano en estas bacterias fue inicialmente puesta de manifiesto por estudios llevados a cabo por Matsumoto y Manire (1970) referidos a los CRs de *C. trachomatis*, en los que se comprobó que antibióticos como penicilina o cicloserina, inhibían el proceso de división celular. Así mismo, se ha demostrado la presencia, en el genoma del serovar D de *C. trachomatis*, de genes para la síntesis del peptidoglucano (Stephens y cols., 1998). Sin embargo, los estudios realizados en *C. pneumoniae* con objeto de detectar ácido N-acetilmurámico (la molécula característica del peptidoglucano) no han sido concluyentes. La razón ha sido la fragilidad osmótica del CR, que hace que sea muy difícil aislarlo puro fuera del hospedador (Barbour y cols., 1982). Por consiguiente, no se puede descartar su presencia en los CRs de *C. pneumoniae*. Podría ser posible que el peptidoglucano estuviera presente de forma transitoria y escasa, en determinados momentos del ciclo vital, y con funciones muy concretas. Apoyando esta hipótesis se ha sugerido que, en el CR, sustituiría la función de las proteínas ricas en cisteína de la pared celular del CE, participando en la división de la bacteria (Holtje y cols., 1988), y en la adhesión a la membrana y superficie celular.

1.5. Epidemiología y patogénesis de la infección por *C. pneumoniae*

C. pneumoniae es un patógeno extremadamente común y con presencia universal. Los estudios seroepidemiológicos indican que aproximadamente entre el 50 y el 75% de los adultos tiene anticuerpos frente a este microorganismo. Esta elevada prevalencia ocurre a pesar del hecho de que los títulos de anticuerpos decaen entre los 3-5 años siguientes a la infección inicial, indicando que los niveles de anticuerpos se mantienen por repetidas reinfecciones a lo largo de la vida (Kuo y cols., 1995).

Es una importante causa de enfermedades respiratorias, cuyos síndromes clínicos más comunes son la neumonía atípica y bronquitis. También causa infección de las vías altas, incluyendo sinusitis y faringitis, sola o asociada con infección de las vías respiratorias bajas. Es una importante causa de enfermedad respiratoria en jóvenes adultos y puede causar serias enfermedades respiratorias en individuos ancianos debilitados (Grayston, 1992), aunque la mayoría de las infecciones por *C. pneumoniae*, implican una enfermedad suave que se resuelve generalmente sola o bien cursa de forma asintomática.

El período de incubación de la enfermedad aguda es de varias semanas (media de tres), siendo este más largo que para otros muchos patógenos respiratorios (Kishimoto y cols., 1994).

Para penetrar en el organismo humano, la bacteria utiliza las células del epitelio respiratorio, infectando inicialmente las vías respiratorias altas y/o bajas, causando faringitis, otitis media, bronquitis y neumonía. Posteriormente, puede infectar un amplio rango de células como macrófagos/monocitos, células del endotelio vascular y células del músculo liso (Redecke y cols., 1998). Los macrófagos alveolares infectados migran a través de la barrera mucosa, dando acceso al patógeno, hacia el sistema linfático y el sistema circulatorio (Gieffers y cols., 2004).

La diseminación sistémica desde el tracto respiratorio requiere un sistema de transporte celular, puesto que es un patógeno intracelular obligado y los CEs nunca se han encontrado circulando libremente dentro del torrente sanguíneo. Es asumido que los monocitos circulantes son el sistema de transporte dentro del torrente sanguíneo de la

infección, permitiendo la colonización a distancia de muchos lugares del organismo, tales como la pared vascular (Gieffers y cols., 2001).

Durante la infección de una célula hospedadora eucariota, el patógeno es capaz de introducirse en vacuolas formando las inclusiones y deteniendo la apoptosis, lo que le permite la replicación de los CRs y una posible cronificación de la infección. Durante este proceso, los antígenos de *C. pneumoniae* son secretados a la superficie de la célula hospedadora, estimulando una respuesta inmunológica en el hospedador.

Estos antígenos son procesados y presentados por células presentadoras de antígenos, como macrófagos, células dendríticas y células endoteliales, dentro de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II, activando a las células T CD4. El reconocimiento de los antígenos por estas células produce la secreción de citoquinas. Dependiendo de las citoquinas liberadas se inducirá una respuesta inmunológica de tipo Th1 o Th2 (Guermonprez y cols., 2002).

La respuesta inmunológica de tipo Th1 es más común frente a los patógenos intracelulares. Genera una estimulación de las células T CD8 citotóxicas que reconocen antígenos asociados a las moléculas del CMH de clase I, que se expresan en la superficie de cualquier tipo de célula infectada y destruyen las células infectadas con patógenos intracelulares.

La respuesta inmunológica de tipo Th2 esta relacionada con la inmunidad humoral. Esta activa a las células B, produciendo anticuerpos que actúan neutralizando los patógenos extracelulares (Guermonprez y cols., 2002).

Las células T CD8 inducen la producción de IFN- γ , entre otras citoquinas, y está demostrado que el IFN- γ es capaz de inhibir la replicación de *C. pneumoniae* (Hogan y cols., 2004), por su capacidad de inducir la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO degrada el triptófano, inhibiendo la formación de inclusiones. Elevadas concentraciones de IFN- γ restringen completamente el crecimiento, mientras que bajas concentraciones restringen parcialmente el desarrollo de *Chlamydia* e inducen el desarrollo de formas morfológicamente aberrantes intracelulares, cuerpos persistentes (Beatty y cols.,

1994b). Estos estudios sugieren que bajas concentraciones de IFN- γ podría generar y mantener la infección crónica. Cuando el triptófano es repuesto, la inhibición se revierte (Malinverni y cols., 1995).

Se han estudiado otros agentes inmunomoduladores que pueden interaccionar sinérgicamente con los interferones (IFNs), aumentando la cantidad de IDO. Se ha demostrado que la interleukina-1 (IL-1) puede aumentar la inhibición del crecimiento de *Chlamydia* mediado por IFNs, incluso cuando la actividad de IDO es pequeña y permite el crecimiento de *Chlamydia*, en presencia de IL-1, ese crecimiento se suprime (Carlin y Weller, 1995).

Frente a una infección por *C. pneumoniae*, puesto que se trata de un patógeno intracelular, la respuesta inmunológica mediada por células parece ser más importante que la respuesta humoral. La respuesta humoral aunque contribuye, no es suficiente para resolver la infección crónica, aunque si podría serlo en una infección aguda. Sin embargo la respuesta inmune mediada por células aunque no es muy intensa, es persistente en el tiempo y puede resolver la infección (Braun y cols., 1994).

La reinfección es frecuente a lo largo de la vida porque surgen variantes alélicas, debido a la presión inmunológica y por su elevada prevalencia. Además, no se ha demostrado la capacidad de neutralización de los anticuerpos para evitar nuevas infecciones (Puolakkainen y cols., 1994). Finalmente, hay evidencias de que una infección reciente superada puede conferir protección frente a enfermedades graves posteriores, aunque no a la reinfección (Thom y cols., 1994).

1.6. Infección persistente

Después de la infección primaria, la bacteria intracelular obligada puede persistir en el hospedador causando infecciones crónicas. Los cuerpos persistentes se encuentran frecuentemente en el tracto respiratorio (Miyashita y cols., 2002; Droeman y cols., 2007) o en los vasos sanguíneos arterioscleróticos (Maass y cols., 1998; Johnston y cols., 2005; Kaperonis y cols., 2006). Además, representan un potencial factor de riesgo para las enfermedades respiratorias inflamatorias crónicas (Paldanius y cols., 2007; Black y cols., 2000). También se ha observado en los monocitos, el establecimiento de la infección

persistente.

La infección persistente puede ser inducida *in vitro* en células entoteliales y epidérmicas cuando existen bajas concentraciones de triptófano, por el IFN- γ o el factor de necrosis tumoral- α , pero no se induce en estas condiciones en monocitos/macrófagos (Airenne y cols., 1999). En los monocitos/macrófagos se puede entrar espontáneamente en estado persistente bajo condiciones de cultivo *in vitro* y no es inducida por antibióticos, porque ocurre sin suplementación de ningún antibiótico, aunque es dependiente de las transmisiones de citoquinas en otras poblaciones celulares (Gieffers y cols., 2001). En los monocitos, las inclusiones en el estado persistente y su contenido son morfológicamente diferentes de las encontradas durante la infección aguda en células epiteliales. El estado persistente parece ser típico en monocitos humanos tras la infección por *Chlamydia*.

Varios estudios han sugerido la existencia de una asociación directa entre la infección por *C. pneumoniae* y la patogénesis de las enfermedades respiratorias crónicas, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (Miyashita y cols., 1998) o el asma (Paldanius y cols., 2007; Black y cols., 2000). Muchos de los resultados en este campo han sido inconsistentes, dividiendo a los especialistas. Esto puede ser debido a las diferencias en los estudios de población, variaciones epidemiológicas y limitaciones de las principales técnicas de diagnóstico, como la serología o PCR. Por tanto, el posible papel de *C. pneumoniae* en la patogénesis de las EPOC o del asma sigue siendo controvertido, y las consecuencias de la infección del tejido crónico con *C. pneumoniae* no quedan claras (Droemann y cols., 2007)

En cuanto al papel de *C. pneumoniae* en la arteriosclerosis se ha generado un amplio campo de investigación, el cual sigue dividido.

1.7. *C. pneumoniae* y la arteriosclerosis

La asociación de una posible influencia de la infección vascular de *C. pneumoniae* en la patogénesis de enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas fue sugerida por primera vez en 1988 por los resultados de un estudio seroepidemiológico realizado en Finlandia (Saikku y cols., 1988). Este campo ha sido el foco de cientos de publicaciones científicas desde que se identificara la presencia de *C. pneumoniae* en ateromas coronarios

por microscopia electrónica y confirmada por PCR e inmunohistoquímica (Shor y cols., 1992).

Sin embargo, otros estudios no han conseguido demostrar esta asociación, ni mediante la detección directa del patógeno en placas ateromatosas en arterias coronarias (Thomas y cols., 1999) ni en estudios seroepidemiológicos (Bloemenkamp y cols., 2003; Puolakkainen y cols., 1993). El posible papel causal de *C. pneumoniae* en la patogénesis de la arteriosclerosis es controvertida puesto que existen múltiples inconvenientes que hacen conflictiva su asociación, como la dificultad de evitar el contagio por este patógeno o la gran variación que se produce en la respuesta inmunológica individual.

Las manifestaciones clínicas de la arteriosclerosis varían desde la enfermedad arterial coronaria (EAC) a la enfermedad cerebrovascular. Los factores de riesgo clásicos, incluyendo el tabaco, la hipertensión y elevados niveles de lípidos en suero, solo pueden explicar el 60% de los casos (Gutiérrez y cols., 2006). Actualmente, se relacionan varios agentes infecciosos con la arteriosclerosis, como son citomegalovirus, herpesvirus simplex, *Helicobacter pylori* y *C. pneumoniae*, que es el patógeno más ampliamente estudiado en este contexto (Bartels y cols., 1999; Choussat y cols., 2000; Espinola-Klein y cols., 2000). Estas asociaciones podrían ayudar a explicar los casos no relacionados con los factores de riesgo clásicos.

C. pneumoniae ha sido detectada en varios vasos ateromatosos (coronaria, carótida y aneurisma aórtica, y arterias femoral y poplítea) (Grayston y cols., 1995; Kuo y cols., 1993a; Kuo y cols., 1993b; Gutiérrez y cols., 2001) mediante microscopia electrónica, inmunohistoquímica o PCR, pero no en arterias sanas (Fong, 2000).

Mediante la técnica de Reverso Transcriptasa-PCR, se demostró la presencia de bacterias viables en los ateromas, que fue confirmado mediante cultivo, aislando el organismo de las arterias coronarias y carótidas (Ramirez, 1996; Jackson y cols., 1997). *C. pneumoniae* es difícil de cultivar desde el tejido ateromatoso y ha sido recuperado en solo unas pocas ocasiones (Ramirez, 1996; Jackson y cols., 1997; Maass y cols., 1998). Actualmente, se explica esta dificultad de cultivar el organismo desde ateromas debido a su presencia en estado latente, con una baja actividad metabólica que genera formas viables pero difícilmente cultivables.

El efecto de la infección de *C. pneumoniae* en la arteriosclerosis parece ejercerse por el establecimiento del patógeno de forma persistente en el tejido cardiovascular. Este patógeno persistente podría inducir una respuesta inflamatoria que inicie o exacerbe la enfermedad. La inflamación de la pared de los vasos juega en papel esencial tanto en el inicio como en el progreso de la arteriosclerosis y existen múltiples rutas por las que el agente infeccioso podría influir en la patogénesis de esta enfermedad.

Se han realizado muchos intentos para producir arteriosclerosis experimentalmente en animales por inoculación de *C. pneumoniae* y se ha demostrado que tras la diseminación de la infección respiratoria por vía sistémica, se puede inducir o aumentar el desarrollo de la arteriosclerosis (Moazed y cols., 1999; Fong y cols., 1997), aunque faltan más estudios concluyentes. En humanos, se han realizado ensayos terapéuticos con antibióticos para la prevención de la EAC en pacientes con infección intravascular de *C. pneumoniae*, con la intención de establecer una relación causal del patógeno con la arteriosclerosis y la EAC, sin embargo, los resultados obtenidos no han sido concluyentes.

Casi todos los métodos de diagnóstico (serológicos, inmunohistoquímicos, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos) han sido usados para explorar la relación entre la infección por *C. pneumoniae* y la arteriosclerosis, con resultados inconsistentes. Estos métodos no están estandarizados y los resultados varían ampliamente dependiendo del método de diagnóstico usado y de los laboratorios donde se realizan los experimentos. Por tanto, existe la necesidad de un criterio estándar en los métodos de elección para que se pueda establecer una relación clave entre *C. pneumoniae* y la arteriosclerosis.

1.8. Diagnóstico

Respecto a las técnicas serológicas, la detección de la enfermedad actual está dificultada por la elevada prevalencia de IgG en adultos, por las repetidas infecciones asintomáticas y por la ausencia de IgM en algunos casos de infección primaria (Dowell y cols., 2001). El cultivo celular continúa siendo el método de elección predominante para demostrar la infección actual por *C. pneumoniae* y para establecer la viabilidad e infectividad, pero esta técnica es compleja y tiene una sensibilidad limitada (Boman y Hammerschlag, 2002). Según los Centros para el control y prevención de la enfermedad (CDC), la confirmación de cultivo positivo requiere la propagación del aislado o la

confirmación por PCR. Las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos son las más sensibles y tiene potencial para mejorar la detección de *C. pneumoniae* (Boman y cols., 1999). Sin embargo, aunque son ampliamente usadas para el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae*, todavía no están suficientemente validadas ni estandarizadas (Kumar y Hammerschlag, 2007; Apfalter y cols., 2001).

Más estudios prospectivos son necesarios en el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae* en la arteriosclerosis, puesto que, actualmente, no hay una herramienta diagnóstica disponible para detectar las infecciones persistentes, lo que se refleja en la amplia variación de resultados entre estudios.

Los métodos serológicos que permitan un diagnóstico diferencial del estado de la infección por *C. pneumoniae* (infección aguda, pasada o persistente) pueden ofrecer la clave para resolver la controversia sobre el posible papel de *C. pneumoniae* en la EAC. La proteómica tiene mucho que contribuir a este respecto, obteniendo antígenos selectivos o combinaciones de antígenos asociados con el estado de la infección. (Villegas y cols., 2008).

1.8.1. Cultivo celular

El cultivo celular ha sido una técnica ampliamente utilizada pero muy insensible. Aunque su avance ha sido menor que el de otras técnicas, a lo largo del tiempo ha mejorado su sensibilidad. Para ello, se usaron protocolos específicos para células HEP-2 (Wong y cols., 1992) y se facilitó la infección con un paso de centrifugación previo al cultivo de estas células. La incorporación de la cicloheximida en el medio de cultivo, para inhibir el metabolismo de la célula hospedadora, también mejoró la sensibilidad del aislamiento.

Sin embargo, el uso del cultivo celular para la detección de *C. pneumoniae* es problemático porque crece escasamente, puede tardar de 3 a 7 días. Además, las inclusiones formadas son más pequeñas que las observadas en otras especies de *Chlamydia* y es una técnica no exenta de riesgo. Todo esto implica dificultades metodológicas y retraso en el diagnóstico. A pesar de estas dificultades, sigue siendo una técnica importante para demostrar la infección actual por *C. pneumoniae* y establecer tanto la viabilidad como

la infectividad.

En cuanto a los resultados obtenidos en cultivos de tejidos vasculares realizados por diferentes laboratorios, no siempre son reproducibles. Algunos investigadores informan de una recuperación regular de *C. pneumoniae* viables (Bartels y cols., 1999; Maass y cols., 1998), mientras que otros grupos han descrito pequeños índices de aislamiento (Kuo y cols., 1997; Weiss y cols., 1996). El uso del cultivo celular para la detección de *C. pneumoniae* es problemático por la dificultad de crecimiento del patógeno, especialmente cuando procede de muestras de tejido (Dowell y cols., 2001).

Un sistema altamente sensible de cultivo celular fue desarrollado por Maass y cols. (1998), el cual examinó 70 muestras de arterias coronarias para demostrar la presencia de *C. pneumoniae* viables y de ADN de *C. pneumoniae*, mediante cultivo celular y la técnica de PCR anidada, respectivamente. El 82% de los pacientes con un cultivo positivo resultó también positivo para la PCR en los 3 segmentos de arteria coronaria que independientemente fueron examinados y el 18% fueron positivos en 2 de los 3 segmentos de arteria coronaria. Todos los aislados, excepto dos, fueron confirmados por cultivo y todos fueron PCR positivos. En este estudio, se demostró que es posible aislar *C. pneumoniae* viable de muestras de arterias coronarias arterioscleróticas (Maass y Harig, 1995).

1.8.2. PCR

Existe una gran variedad de técnicas de amplificación molecular basadas en secuencias genómicas que se han usado para detectar y diferenciar especies de *Chlamydia*. Estas incluyen la hibridación de ADN con sondas de ADN genómico, análisis polimórfico de fragmentos de restricción de productos amplificados de PCR y PCR anidada, entre otras. Estas técnicas han demostrado mejorar la sensibilidad comparada con el cultivo y otras técnicas de diagnóstico para la detección de infecciones por *Chlamydia* en ciertos tejidos y muestras respiratorias (Madico y cols., 2000).

Dentro de las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos está incluida la PCR, la cual tiene la habilidad de amplificar rápidamente pequeñas cantidades de ácidos nucleicos (ADN o ARN) específicos, discriminando otros ácidos nucleicos presentes, desde el propio

del hospedador hasta el de otros microorganismos. Estas características han hecho de esta técnica, una potencial herramienta para el diagnóstico de *C. pneumoniae* (Boman y Hammerschlag, 2002). Esta prueba es aplicable directamente sobre la muestra clínica. Actualmente, existen muchos tests de PCR en el mercado, los cuales utilizan diferentes oligos específicos de *C. pneumoniae* dirigidos frente a una secuencia específica de la bacteria. Entre ellos, los más utilizados son los que van dirigidos al gen que codifica la subunidad ARNr 16S, al gen *ompA* que codifica la proteína MOMP y al gen *omcB* que codifica la proteína rica en cisteína de 60 kDa (Kumar y Hammerschlag, 2007).

En los últimos años, numerosos tests de PCR ha sido optimizados para detectar diferentes patógenos implicados en la neumonía. La aplicación de la PCR a muestras respiratorias (esputo, frotis nasofaríngeos, aspirados nasofaríngeos), en pacientes con neumonía comunitaria adquirida, ha sido ampliamente desarrollada. Los primeros estudios se realizaron con una PCR simple y con la PCR anidada. Recientemente, se ha introducido la PCR múltiple (PCRm) para detectar los principales microorganismos causantes de la neumonía comunitaria adquirida, con diferentes técnicas para visualizar los amplicones (Carillo y cols., 2009). Sin embargo, no hay ninguna técnica estandarizada para la detección ni de muestras respiratorias ni de otro tipo que haya sido aprobada por la US Food and Drug Administration (FDA), aunque si por la Comunidad Europea (CE).

Recientemente, la PCR a tiempo real (RT-PCR) se ha usado como una técnica cuantitativa de ampliación de genes para la detección tanto de bacterias como de virus asociados a enfermedades del tracto respiratorio (Morozumi y cols., 2006; Loens y cols., 2006; Hardick y cols., 2004; Apfalter y cols., 2003; Kuoppa y cols., 2002). La RT-PCR es un método de diagnóstico prometedor para la detección cuantitativa de infecciones respiratorias y quizás de otras infecciones por *C. pneumoniae*. En un estudio realizado por Kuoppa y cols. (2002), para la detección de ADN de *C. pneumoniae* en muestras respiratorias, se usó el gen que codifica MOMP como diana de la amplificación. En este estudio se concluyó que la RT-PCR es un método de detección más sensible que la PCR anidada, y aunque la PCR anidada ha sido previamente validada como un método de detección sensible y específico para *C. pneumoniae* comparado con otros métodos como el cultivo celular (Kuoppa y cols., 2002), no tiene la capacidad para una medida cuantitativa. Además, tiene el inconveniente de un alto riesgo de contaminación (Kumar y Hammerschlag, 2007; Apfalter y cols., 2001).

La necesidad de encontrar métodos más sensibles para la detección de *C. pneumoniae* en otros tejidos, como el tejido vascular, donde los métodos de diagnóstico clásicos no llegan, ha hecho que la amplificación de ácidos nucleicos sea empleada para este fin. Mediante la técnica de la PCR es posible detectar ADN o ARN de microorganismos que están presentes en pequeño número, que no son viables o tienen un pequeño crecimiento, además de poder ser usada en tejidos no disponibles para el cultivo.

Sin embargo, varios problemas se mantienen, la mayoría relacionados con la sensibilidad y especificidad de los tejidos y la validación de nuevos ensayos (Boman y cols., 1999). La razón principal de esta variación puede ser el uso de diferentes procedimientos de extracción del ADN y protocolos de PCR. Consecuentemente, incluso si las muestras son del mismo paciente y son analizadas por distintos laboratorios, la variación de los resultados puede ser significativa (Apfalter y col., 2001).

Apfalter y cols. (2001) realizaron un estudio entre laboratorios de los diferentes métodos de PCR para la detección de *C. pneumoniae* en tejido vascular; todos los laboratorios recibieron alícuotas de 20 muestras con la misma composición. La máxima concordancia fue de un 25% para una muestra. No hubo una pauta consistente en los resultados positivos entre laboratorios y el índice de positividad para los ensayos individuales no se correlacionó con la sensibilidad de los ensayos. Esto indica que la variabilidad en la prevalencia de *C. pneumoniae* en tejido vascular obtenido por PCR puede ser debido principalmente a las diferentes metodologías utilizadas, más que a las cantidades de microorganismo presentes en el tejido.

Otro problema que afecta a la PCR son los falsos negativos y falsos positivos que genera. Los falsos negativos pueden ser el resultado de la degradación del ADN por la liberación de endonucleasas (Meijer y cols., 1999) o la presencia de inhibidores, como sangre o componentes del moco (Ieven y Goossens, 1997), y algunos reactivos (Persing y cols., 1993). Además, la naturaleza desconocida de la mayoría de los inhibidores en muestras clínicas no facilita el desarrollo de técnicas que los eliminen. Se ha propuesto el uso de métodos alternativos de tratamiento de muestras, así como la introducción de controles positivos internos (Dowell y cols., 2001).

Los falsos positivos son debidos a la contaminación, tanto en el procesamiento en el laboratorio y el muestreo, como a deficiencias en la técnica. La introducción de controles negativos, los cuales están sujetos a la misma manipulación que las muestras, es importante puesto que su propósito es detectar contaminaciones. Además, la técnica utilizada también es importante. Según Ieven y Hoymans (2005), de un total de 3551 muestras para detectar ADN de *C. pneumoniae*, 2688 fueron negativas y 863 (24,3%) fueron positivas. La prevalencia de *C. pneumoniae* en vasos arterioscleróticos va desde 0% a 100%. Sin embargo, una considerable proporción (por encima de 6,5%) de las arterias control también fueron PCR positiva. Esta elevada positividad en las arterias control ha llevado a un escepticismo tanto en lo referente a la técnica como a la selección de controles negativos.

Muchos estudios han demostrado la falta de correlación entre la detección por PCR y las técnicas serológicas. Así, *C. pneumoniae* ha sido detectado por PCR en pacientes sin anticuerpos o bajos títulos y frecuentemente no detectados en presencia de altos títulos de anticuerpos (Ieven y Hoymans, 2005).

1.8.3. Métodos serológicos

La detección de anticuerpos es la principal forma, aunque tardía, de realizar un diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae*, por su relación con el estado de enfermedad del sujeto, facilidad en la ejecución y porque la detección de la bacteria es compleja y no exenta de riesgos.

En la primoinfección surgen primero los anticuerpos anti-LPS y luego los anti-proteínas. La infección por *C. pneumoniae* induce una respuesta de IgG, IgA e IgM que se pueden detectar mediante IFI o ELISA.

1.8.3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Los criterios serológicos de infección para la IFI descritos en 2001 por los CDC (Dowell y cols., 2001), son:

Infección aguda:

IgM \geq 1/16, o incrementos de IgG en 4 títulos o más entre los sueros de las fases aguda y de convalecencia, obtenidas con 4 semanas o más de intervalo. (Por la elevada prevalencia de anticuerpos anti-*C. pneumoniae*).

Posible infección aguda:

IgG \geq 1/512

Supuesta infección pasada:

IgG \geq 1/16

La IgM, mediante IFI, aparece 3 semanas después de la aparición de la enfermedad. La IgG puede no hacerlo hasta las 6 u 8 semanas después del inicio de la enfermedad. En la reinfección, la IgM puede no aparecer o aparecer en títulos bajos, no detectados mediante IFI. La IgG sube rápida y frecuentemente en 1 ó 2 semanas y puede alcanzar un título de 1/512 o más. La IgM usualmente comienza a descender a los 2 meses y desaparece entre 4 y 6 meses después de una infección aguda; la IgG persiste y puede ser detectada durante al menos 3 años, después de la infección aguda.

La IFI es considerada como la técnica de referencia o *gold standard* serológico para el diagnóstico de la infección aguda (Dowell y cols., 2001), pero es un método que requiere tiempo, necesita de un microscopio de fluorescencia y su lectura se realiza por un operador experto, lo que conlleva una interpretación subjetiva.

Aunque hay estudios de muchos equipos de IFI comerciales que han mostrado una buena concordancia, otros han informado de variaciones significativas entre laboratorios. Así, Littman y cols. (2004) usando un protocolo estándar para IFI en dos laboratorios líderes en el desarrollo de equipos de IFI, compararon los títulos de IgG e IgA específicos de *C. pneumoniae* en 392 individuos. El porcentaje de concordancia exacto fue del 38% para IgG y del 55% para IgA, y del 66% y 75%, respectivamente, en dos títulos de diferencia. Peeling y cols. (2000) también realizaron un estudio entre laboratorios usando la técnica de IFI. Diez grupos de 10 sueros se enviaron a catorce laboratorios para la determinación de IgG e IgM. Cada grupo de sueros tenía 2 o 3 muestras del mismo

individuo. El porcentaje de concordancia fue del 80%.

Finalmente, se ha informado de la ausencia de anticuerpos por IFI en infecciones confirmadas por cultivo. Esto es raro en adultos pero puede ser más común en niños (Kutlin y cols., 1998).

1.8.3.2. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

Para evitar los problemas relacionados con la IFI, se desarrolló la técnica de ELISA que es relativamente fácil de realizar, requiere menos tiempo, es más objetiva (debido a la lectura fotométrica de los resultados), además de ser más fácil de estandarizar (porque los resultados se expresan en unidades internacionales) (Hoymans y cols., 2003).

Los equipos de ELISA puede contener: (i) células infectadas con el LPS específico de *Chlamydia*, (ii) CEs a los que se le elimina el LPS o (iii) inmunógenos recombinantes (Kutlin y cols., 1997).

En un estudio realizado por Hermann y cols. (2002) con sueros de individuos aparentemente sanos, se encontró una amplia variación en la sensibilidad de los equipos de serodiagnóstico. Sin embargo, en un estudio posterior realizado por el mismo grupo de investigación con sueros de pacientes con enfermedades del tracto respiratorio y un grupo control de niños, se informó de una elevada sensibilidad y especificidad con los ELISA utilizados y se obtuvo una buena correlación con los equipos de IFI utilizados (Hermann y cols., 2004).

La técnica de ELISA es comúnmente usada en estudios seroepidemiológicos porque es menos costosa y más fácil de realizar a gran escala. Sin embargo, la IFI continua siendo más usada para el diagnostico individual.

La IFI como el ELISA, pueden generar falsos resultados positivos debido a reacciones cruzadas con otras especies de la familia *Chlamydiaceae*. Así, en *Chlamydia*, los mayores epítomos de genero están localizados en el LPS y son los responsable de la mayoría de las reacciones cruzadas. Aunque el LPS se ha utilizado en ELISA para detectar IgG, IgA e IgM, no hay consenso en su utilidad clínica (Gutiérrez y cols., 2002). La

mayoría de los ELISA desarrollados utilizan como antígeno, los CEs sin LPS.

Por el contrario, en un estudio realizado por Hermann y cols. (2004) se obtuvieron falsos negativos por ELISA en las muestras con los títulos más bajos (1/64) por IFI, mientras que todas las muestras con medios (1/256 y 1/512) y altos (1/1024) títulos por IFI fueron correctamente procesadas.

Esta demostrado que la relación entre la seropositividad por *C. pneumoniae* y las enfermedades arterioscleróticas, están influenciadas por el ensayo serológico aplicado, ya que varían mucho en sensibilidad y especificidad. La elección del ensayo serológico tiene importantes implicaciones cuando se realizan estudios seroepidemiológicos y cuando se examina si la seropositividad a *C. pneumoniae* representa un factor de riesgo cardiovascular (Hoymans y cols., 2003). Además, existen importantes variaciones inter e intralaboratorios y una pobre relación entre los diferentes ensayos de *C. pneumoniae* (Gutiérrez y cols., 2005).

2. OBJETIVOS

A pesar de existir numerosos estudios, bien caracterizados, que han obtenido proteínas antigénicas de *C. pneumoniae* con el propósito de aportar información sobre la patogenia de la enfermedad y mejorar los sistemas de diagnóstico existentes, no se ha conseguido obtener una proteína inmunógena representativa de esta bacteria, ni tampoco una que aporte una relación causa-efecto clara, con las nuevas enfermedades con las que se le relaciona.

Actualmente, el diagnóstico serológico de *C. pneumoniae* se realiza exclusivamente usando CEs o componentes de la superficie celular (LPS, MOMP, PMPs) como antígenos. Sin embargo, presentan problemas como las reacciones cruzadas que generan los CEs o el LPS, con todas las especies de *Chlamydia*, o la diversidad interespecie e intraespecie de MOMP o algunas PMPs, por no ser inmunodominantes, mientras que, otras proteínas de *C. pneumoniae* han mostrado inmunogenicidad en animales infectados o en pacientes humanos. Estos estudios indicarían que otras proteínas de *C. pneumoniae* aparte del LPS, MOMP y PMPs son inmunogénicas y pueden ser usadas como antígenos para el diagnóstico.

Las técnicas serológicas basadas en combinaciones selectivas de antígenos específicos podrían mejorar en gran parte el serodiagnóstico de las infecciones por *C. pneumoniae* y representan una posible clave para conseguir un diagnóstico diferencial del estado de la infección por *C. pneumoniae*, como la diferenciación entre infección aguda, pasada o persistente (Bunk y cols., 2008).

En base a lo anterior, este trabajo tiene como objetivo general describir nuevos inmunógenos candidatos para el diagnóstico de la infección por *Chlamydomphila pneumoniae* obtenidos de una genoteca de esta bacteria con sueros inmunizados por *C. pneumoniae*. Para ello, los objetivos específicos que se engloban en este objetivo general son los siguientes:

1. Construir una genoteca de expresión de *Chlamydomphila pneumoniae*, cepa CM-1, a partir del ARNm de cuerpos elementales.

2. OBJETIVOS

2. Expresar, detectar e identificar proteínas recombinantes inmunogénicas de *Chlamydophila pneumoniae* a partir de la genoteca de expresión, mediante inmunoscreening, con un anticuerpo policlonal anti-*Chlamydophila pneumoniae*.
3. Sobreexpresar en un sistema heterólogo y purificar los recombinantes inmunogénicos.
4. Estudiar la capacidad inmunogénica de los recombinantes para su posible aplicación en el serodiagnóstico de *Chlamydophila pneumoniae*, mediante la detección de la sensibilidad y especificidad de cada una de las proteínas recombinantes purificadas y aplicados en ensayos de ELISA.

3.1. Líneas celulares y cepas bacterianas	39
3.2. Medios de cultivo	39
3.3. Tampones y soluciones	42
3.4. Material para Biología Molecular	44
3.5. Material Serológico	47
3.6. Instrumentación	48
3.7. Software	49

3. MATERIAL (Material y Métodos)

3.1. Líneas celulares y cepas bacterianas

Las características de las líneas celulares y cepas bacterianas usadas en este trabajo están descritas en la tabla 3.1 y tabla 3.2, respectivamente.

Tabla 3.1. Líneas celulares.

Línea celular	Descripción	Uso en este trabajo	Referencia
HEp-2	Línea celular de carcinoma epidérmico de laringe humana	Cultivo celular	Eagle, 1955

Tabla 3.2. Cepas de *Escherichia coli* y *Chlamydomonas reinhardtii*.

Cepa bacteriana	Genotipo	Uso en este trabajo	Referencia
<i>E. coli</i> DH10B T1	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ ⁻ <i>rpsL nupG tonA</i>	Transformación por electroporación en las reacciones de recombinación	Calvin y Hanawalt, 1988
<i>E. coli</i> DB3.1	F ⁻ <i>gyrA462 endA1</i> Δ(<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B , m _B -) <i>supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>xyl-5</i> λ ⁻ <i>leu mtl1</i>	Propagación y mantenimiento de plásmidos	Hanahan, 1983 Bernard y Couturier, 1992
<i>E. coli</i> BL21-AI	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> λ(DE3) <i>araB::T7ARNP-tetA</i>	Inmunoscreening de la genoteca de expresión	Groberg y Dunn, 1988 Studier y Moffatt, 1986
<i>E. coli</i> NovaBlue	<i>endA1 hsdR17</i> (r _{K12} ⁻ m _{K12} ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> F' <i>[proA⁺B⁺ lacIZΔM15:: Tn10]</i> (Tet ^R)	Clonación inicial, propagación y mantenimiento de plásmidos	Bullock y col., 1987
<i>C. pneumoniae</i> CM-1		Línea de investigación	Black y cols., 1991

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. Para HEp-2

Medio RPMI: Medio de crecimiento enriquecido con 1% de L-glutamina y con 10% de suero fetal bovino (SFB). El medio RPMI procede de BioWhihaker y el SFB de

Kraeber. Se utilizó para el desarrollo de la línea celular eucariota HEp-2.

3.2.2. Para *C. pneumoniae*

Medio RPMI: Medio usado para infectar la línea celular HEp-2 con *C. pneumoniae* para su cultivo *in vitro*.

Medio Ham's F-12: Se utilizó como medio de mantenimiento de la línea celular y de crecimiento para *C. pneumoniae*. Enriquecido con 1% de glucosa, 5% de SFB y 1 µg/ml de cicloheximida. El medio procede de BioWhihaker y la cicloheximida de Sigma.

3.2.3. Para *E. coli*

Medio líquido LB (Luria-Bertani) (Miller, 1972) cuya composición es: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 5 g/l de NaCl 0,5%. El medio sólido lleva 15 g/l de agar bacteriológico.

Medio líquido SOC (Hanahan, 1983), compuesto por: 20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄ y 20 mM de glucosa.

3.2.4. Suplementación de medios

Los medios fueron suplementados con determinados antibióticos y con diferentes sustancias en función de los experimentos y requerimientos de las líneas celulares.

3.2.4.1. Antibióticos

Ampicilina: A partir de una solución stock de 100 mg/ml, se utilizó a una concentración de 100 µg/ml. Utilizado para la selección y propagación de plásmidos y de colonias obtenidas de la genoteca de expresión que portan un vector con el gen de la β-lactamasa, responsable de la resistencia a este fármaco.

Kanamicina: A partir de una solución stock de 30 mg/ml, se utilizó a una concentración de 30 µg/ml. Antibiótico utilizado para la selección y propagación de plásmidos, y para, la selección de recombinantes que portan el plásmido pDONR222, que porta el gen que confiere resistencia a este fármaco.

Cloranfenicol: A partir de una solución stock de 30 mg/ml, se utilizó a una concentración de 15 µg/ml. Usado en la selección y propagación de los plásmidos (plásmidos con el gen *ccdB*).

Tetraciclina: A partir de una solución stock de 10 mg/ml, se utilizó a una concentración de 10 µg/ml. Se usó para el cultivo de colonias de la cepa de expresión BL21-AI y de la cepa de mantenimiento NovaBlue. La presencia del gen *tetA* confiere resistencia a la tetraciclina y permite por tanto la verificación de la identidad de las cepas usando tetraciclina.

3.2.4.2. Nutrientes

L-glutamina: Suplemento para crecer las células que serán infectadas por *C. pneumoniae*.

Glucosa: Suplemento para crecer y mantener *C. pneumoniae*.

Suero fetal bovino: Suplemento utilizado como nutriente.

Cicloheximida (1µg/ml): Suplemento para inhibir el crecimiento de células eucariotas.

Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG): (1 mM). Sustancia química que activa la expresión del gen *lacZ*, el cual codifica el enzima β-galactosidasa. Es un inhibidor de la represión y su efecto final es una inducción de la expresión del gen heterólogo que está bajo la acción del promotor de la T7 ARN polimerasa.

L-arabinosa: (0,2% p/v) Monosacárido que regula la expresión de la T7 ARN polimerasa, ya que este gen esta insertado en el locus *araB* del operón *araBAD* induciendo

la expresión del promotor *araBAD* (Lee, 1980; Lee y cols., 1987).

3.3. Tampones y soluciones

Los diferentes tampones y soluciones usados vienen descritos en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Composición de tampones y soluciones usados.

Tampón/solución	Composición
Tampón de lisis 10X	NaH ₂ PO ₄ 430 mM, KH ₂ PO ₄ 147 mM pH 7,3
Tampón de desarrollo 10X para electroforesis de proteínas	Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%
Gel de separación para electroforesis de proteínas.	Acrilamida/bisacrilamida 12,5-15-20%, SDS 0,1%, "separating buffer" 4X (Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8) 25% y agua bidestilada.
Gel de empaquetamiento para electroforesis de proteínas.	Acrilamida/bisacrilamida 5%, SDS 0,1 %, "stacking buffer" 4X (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8) 25% y agua bidestilada.
Tampón de carga 4x para proteínas	0,75% de APS al 10% y 0,025% TEMED
Tampón de transferencia de Western-blot	Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 0,71 M, azul de bromofenol 0,025%
Solución de lavado para Western-blot	Tris-HCl 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, SDS 0,02%
Solución de bloqueo para Western-blot	PBS 20%, Brij 1%, proclín 0,01%
PBS (tampón fosfato salino)	Leche en polvo desnatada 5% (p/v) en solución de lavado
Solución de tinción de proteínas en gel	NaCl 0,14 M, KCl 2,6 mM, NaH ₂ PO ₄ 10 mM, KH ₂ PO ₄ 1,2 mM, pH 7,4
Solución de decoloración	Azul brillante Coomassie R 0,25% (p/v), metanol 50%, ácido acético glacial 9%
Tampón TEN	Metanol 30% y ácido acético glacial 10%
Tampón TE	Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EDTA 0,1 mM y NaCl 0,25 mM
Tampón carga 10X para ADN y ARN	Tris-HCl 10 mM, pH 8 y EDTA 1 mM
Tampón TAE 10x	Azul de bromofenol 0,1%, xilencianol 0,1%, glicerol 30%, EDTA 10 mM
Tampón de lisis para inmunoscreening	Tris-HCl 0,4 M, ácido acético glacial 0,2 M, EDTA 10 mM pH 8
	Tris-HCl 0,1 M pH:7,8, NaCl 0,15 M, MgCl ₂ 5 mM, BSA 1,5% (p/v), ADNasa 1 µg/ml, lisozima 40 µg/ml

3. MATERIAL

Tampón TNT	Tris-HCl 10 mM pH:8,0, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05%
Solución de lavado 1 para inmunoscreening	Tampón TNT + BSA 0,1%
Solución de lavado 2 para inmunoscreening	Tampón TNT + BSA 0,1% + Nonidet P-40 0,1%
Solución de bloqueo para inmunoscreening	Leche en polvo desnatada 5% (p/v) en tampón de lavado
Solución de suero anti- <i>C. pneumoniae</i>	Tampón de lavado + 5% Leche en polvo + suero anti- <i>C. pneumoniae</i> según dilución
Solución anticuerpo secundario (anti-humano)	Anticuerpo anti-IgG humano conjugado con peroxidasa estabilizado en PBS 1/21.000-1/105.000
Solución anticuerpo secundario (anti-conejo)	Anticuerpo anti-IgG conejo conjugado con peroxidasa estabilizado en PBS 1/2.000
Tampón de equilibrado y lavado para cromatografía de afinidad (proteína A)	Fosfato sódico 20 mM pH 7
Tampón de elución para cromatografía de afinidad (proteína A)	Ácido cítrico 0,1 M pH 3
Tampón de neutralización para cromatografía de afinidad (proteína A)	Tris-HCl 1M pH 9
Solución DEPC (Ausubel y cols., 1994)	Agua bidestilada estéril con DEPC al 0,1% (v/v)
Tampón glucosa estéril para ADN y ARN	Tris 25 mM, EDTA 10 mM, Glucosa 50 mM
Solución de lisis para ADN y ARN	NaOH 0,2 N y SDS al 1%
Solución de precipitación de proteínas I	Acetato sódico 3M pH 5,2
Solución de precipitación de proteínas II	Acetato amónico 7,5 M
SSC 20x	NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7
Solución de inhibidores de proteasas para medida de actividad en extractos	Leupeptina 5 µM, PMSF 2 mM y lisozima 1 mg/ml
Medio de congelación	60% SOC y 40% glicerol

3.4. Material para Biología Molecular

3.4.1. Plásmidos

pUC19 (Invitrogen): Se usó para chequear la eficiencia de transformación de las bacterias ElectroMAX™ DH10B™ T1, y como control de las otras reacciones de transformación. Contiene el gen de la β-lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina, como un marcador seleccionable, y un fragmento de ADN derivado del operón lac de *E. coli* (*lacZ*) que codifica el fragmento N-terminal de la β-galactosidasa, la cual permite la selección de colonias blancas-azules.

pDONR222 (Invitrogen) (Figura 3.1.): Se usó para la reacción de recombinación BP entre el ADN complementario (ADNc) flanqueado por las secuencias *attB* y dicho plásmido, para generar una genoteca de entrada. Contiene el gen *ccdB* que permite una selección negativa después de la recombinación y la transformación. La proteína CcdB interfiere con la ADN girasa de *E. coli*, por lo que inhibe el crecimiento de la mayoría de las cepas.

Cuando la recombinación ocurre entre el pDONR222 y el ADNc, el gen *ccdB* es reemplazado por el fragmento de ADNc. Las células que tomen el pDONR222 no recombinado mantendrán el gen *ccdB*, impidiendo su crecimiento. Esto permite una alta eficacia de recuperación de los clones deseados. Además, este plásmido contiene el gen de resistencia a la kanamicina y al cloranfenicol. El gen de resistencia al cloranfenicol lo pierde cuando sufre recombinación en sus secuencias *attB*.

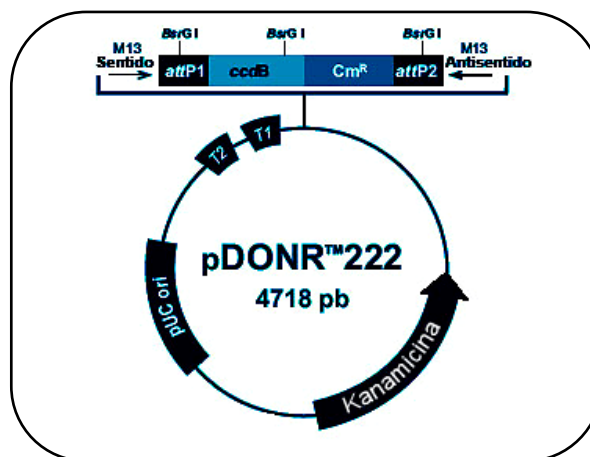


Figura 3.1. Mapa del plásmido pDONR222 (Invitrogen).

pDEST17 (Invitrogen) (Figura 3.2.): Se usó para la reacción de recombinación LR entre las secuencias *att* del plásmido pDONR222, que lleva los distintos fragmentos de ADNc y este plásmido. Este vector lleva el sistema de expresión pET, desarrollado por Studier y cols. (1990), que aprovecha la alta actividad y especificidad de la T7 ARN polimerasa, la cual permite regular la expresión de genes heterólogos en *E. coli* desde el promotor T7 (Rosenberg y cols., 1987; Studier y Moffatt, 1986; Studier y cols., 1990). Los dos lugares de recombinación *attR1* y *attR2* están localizados “aguas abajo” del promotor T7. También contiene el gen *ccdB* entre los sitios *attR* para llevar a cabo una selección negativa.

El pDEST17 fusiona una cola de 6 histidinas al extremo N-terminal de la proteína heteróloga, la cual facilita la posterior detección y purificación de las proteínas recombinantes obtenidas.

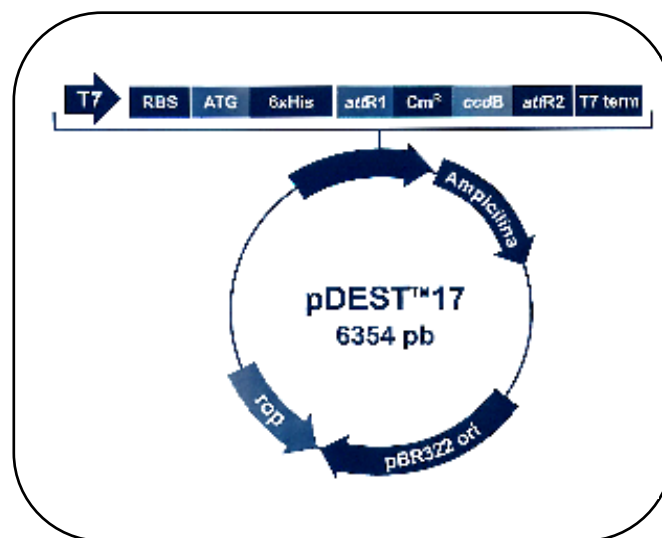


Figura 3.2. Mapa del plásmido pDEST17 (Invitrogen).

pEXP7-tet (Invitrogen): Se usó como control positivo para la reacción de recombinación BP. El pEXP7-tet incluye un fragmento de aproximadamente 1,4 kb que contiene el gen de resistencia a la tetraciclina y su promotor (Tc^r) flanqueado por *attB*. El pEXP7-tet también se usó en este trabajo como control para la cuantificación de ADN en placas de agarosa.

pENTR-gus (Invitrogen): Se usó como control positivo para la reacción de recombinación LR y expresión. Este vector permite generar clones de expresión que

contienen el gen que codifica la β -glucuronidasa (*gus*) (Kertbundit y cols., 1991).

pUC18 (Stratagene): Plásmido usado como control negativo para llevar a cabo experimentos de inmunoscreening en membranas de nitrocelulosa (NC).

p23pET (Vircell S.L.): Plásmido fusionado a una cola de 6 histidinas que permite la expresión de la proteína p23 del virus Epstein-Barr, usado como control positivo para llevar a cabo experimentos de inmunoscreening en membranas de NC.

MOMPpET (Vircell S.L.): Plásmido que permite la expresión de MOMP de *C. pneumoniae*, usado como control positivo en PCR realizadas sobre la genoteca de expresión.

OmcBpET (Vircell S.L.): Plásmido que permite la expresión de OmcB de *C. pneumoniae*, usado como control positivo en PCR realizadas sobre la genoteca de expresión.

3.4.2. Reactivos

Los reactivos utilizados en Biología Molecular, así como las casas comerciales que los suministraron fueron los siguientes:

Fermentas: Endonucleasas de restricción *Bsp1407I* y *EcoRI*.

Invitrogen: ClonerMiner™ cDNA Library Construction Kit (para la construcción de la genoteca), Sephacryl® S-500 HR, LR clonase th, Gateway pDEST17 vector, DTT (ditiotreitól) 0,1M, ADN ligasa y ADN polimerasa I de *E. coli*, ARNasa H de *E. coli*, ADN polimerasa T4 y ADN ligasa T4, proteinasa K.

Cambrex Bio Science Rockland: Agarosa SeaKem® LE.

Ambion: MagMAX RNA Isolation Kit (para aislamiento de ARNm).

GE Healthcare Life Sciences: Ni Sepharose™ 6 Fast Flow, Capto™ Q, Marcadores de masas moleculares para transferencia de proteínas, Rainbow™.

Bio-Rad: Macro-Prep® High S Support.

Millipore: Membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) Immobilon-P 0,45 μ m.

Schleicher & Schuell: Membranas de nitrocelulosa free HATF 0,45 μ m 137 mm.

Sigma-Aldrich: Acrilamida/bis-acrilamida solución al 30%, dietil pirocarbonato (DEPC), N,N,N',N'- tetrametiletlenodiamina (TEMED), persulfato amónico (APS), ADNasa, ARNasa, lisozima, proteinasa K, seroalbúmina bovina (BSA).

3MM: papel Whatman.

Neogen Corporation: TMB/H₂O₂ Membrane Substrate.

Stratagene: Reverso transcriptasa Stratagene® RT (50U/μl).

Bioron: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM).

Roche: PCR buffer 10X.

Isogen Life Science: oligonucleótidos para amplificaciones de los genes que codifican para MOMP y OmcB.

Vircell S.L.: Equipo *Chlamydomphila pneumoniae* IFA IgG, Equipo *Chlamydomphila pneumoniae* ELISA IgG, VirTaq polimerasa y marcadores de masas moleculares de ADN del fago λ digerido con *Eco91I* y compuesto de 14 fragmentos (pb): 8453, 7242, 6369, 5687, 4822, 4324, 3675, 2323, 1929, 1371, 1264, 702, 224 y 117.

3.5. Material Serológico

3.5.1. Sueros

Los sueros con los que se trabajó fueron obtenidos de una población hospitalaria del Servicio de Neumología del Hospital Clínico Universitario de Zaragoza. Se pudo disponer de 270 sueros de pacientes. Los sueros con anticuerpos frente a *C. pneumoniae* fueron determinados por ELISA con el equipo *Chlamydomphila pneumoniae* ELISA IgG (Vircell S.L.) y por IFI con el equipo *Chlamydomphila pneumoniae* IFA IgG (Vircell S.L.). Para la IFI, los títulos de anticuerpos fueron interpretados de acuerdo al criterio diagnóstico descrito por Dowell y cols. (2001). Un título de IgG ≥ 512 fue el criterio para la infección aguda y un título de IgG ≥ 16 indica infección pasada o crónica.

También se dispuso de un suero de conejo New Zealand, el cual fue inmunizado frente a CEs de *C. pneumoniae*.

3.6. Instrumentación

3.6.1. Para cultivos celulares

- Cabinas estériles de flujo laminar vertical AV-100 y BIO-II-A de Telstar.
- Incubador de P-Selecta.
- Sonificador Sonopuls GM70 de Bandelin electronics.
- Prensa de French Cell Disrupter de Thermo Electrón Corporation.
- Microscopio invertido de fluorescencia Olympus IMT-2.
- Incubador con agitación orbital para cultivo de bacterias Forma Orbital Shaker de Thermo Electron Corporation.
- Agitador orbital Yellow line OS 5 basic y IKA KS 30 basic.
- Agitador orbital para IFI Heidolph Polymax 104.

3.6.2. Para electroforesis

- Cubeta de electroforesis vertical Mini PROTEAN 3 Cell de Bio-Rad.
- Cubetas de electroforesis para ADN Max Fill de Vari-Gel.
- Cubeta de transferencia de proteínas BlueBlot wet/100 de Serva.
- Fuente de alimentación Power Pac Basic de Bio-Rad.
- Fuente de alimentación E132 de Labolan SL y Power Station 300 de Labnet.
- Fuente de alimentación Blue Power 500.

3.6.3. Centrífugas

- Centrífuga Rotanta 460 de Hettich.
- Centrífuga refrigerada 3K30 de Sigma laboratory centrifuges con rotores tipo 12155H y 12158H.
- Centrífuga refrigerada Medifriger BL-S de P-Selecta con rotores 7009079 y 7000609.
- Microcentrífuga Mikro 20 de Hettich.
- Microcentrífuga Mikro 200 de Hettich.
- Ultracentrífuga Beckman Optima LE-80K con rotor tipo 70Ti de Beckman Coulter.

3.6.4. Para electroporación

- Electroporador Gene Pulser Xcell™ de Bio-Rad y cubetas Gene Pulser®/ E. coli Pulser™ Cuvette, 0,1 cm electrode gap de Bio-Rad.

3.6.5. Otros

- Termociclador PCR Mastercycler gradient y Mastercycler personal de Eppendorf.
- Termobloque Thermomixer compact de Eppendorf.
- Agitador Vortex Zx3 de VELP Scientifica.
- Cámara fotográfica Olympus C5060.
- Espectrofotometro UV-Visible Cary 50 Bio de Varian acoplado a ordenador Pentium IV con Windows NT.
- Fotómetro Biophotometer de Eppendorf.
- Sistema de fotodocumentación UV/Visible Alpha Digidoc RT2 de Alpha Innotech.
- Transiluminador de luz UV Vilber Lourmat, modelo TCP-20-M.
- Transiluminador Rex-Leuchtplatte.
- Bolas de vidrio de 4 mm de diámetro.
- Homogenizador IKA T18 basic. Ultra-Turrax.
- Scanner HP OfficeJet Pro 1150C.
- Minilyser para ELISA de TECAN.

3.7. Software

El tratamiento de los datos se realizó en ordenadores personales Pentium IV e Intel Centrino Duo y los programas utilizados fueron los siguientes:

- AlphaEase. Alpha Innotech Corporation.
- Microsoft Office Excel 2003. Microsoft Corporation.
- Microsoft Office Word 2003. Microsoft Corporation.
- Adobe Reader Versión 8.0. Adobe.
- Adobe Photoshop Version CS. Adobe.
- CorelDRAW Graphics Suite 3x. Corel Corporation.

- Microsoft Office PowerPoint 2003. Microsoft Corporation.
- HP Scanner Test y PictureScan. Hewlett-Packard.
- Cary WinUV (RNA/DNA Applications) software. Varian.
- MedCalc Software, Version 9.5.2.0. Schoonjans F. © 1993-2008.
- pDRAW32 1.0 Revisión 1.1.101. ACACLONE software.
- Chromas Lite 2.01. Technelysium Pty Ltd 1998-2005.

Bases de datos rastreadas:

- Web National Center for Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Web European Bioinformatics Institute (EBI): <http://www.ebi.ac.uk>
- Web Expasy, Swiss Institute of Bioinformatics: <http://expasy.org>
- Web Biblioteca de la UGR: <http://www.ugr.es/~biblio/>

4.1. Crecimiento y manipulación de células	53
4.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos	60
4.3. Construcción de una genoteca de expresión	62
4.4. Separación de macromoléculas	64
4.5. Inmunoabsorción de anticuerpos primarios	69
4.6. Western-blot	69
4.7. Técnicas serológicas	70
4.8. Inmunización del conejo	73
4.9. Inmunoscreening de la genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i> en la cepa BL21	74
4.10. Cuantificación de macromoléculas	75

4. MÉTODOS (Material y Métodos)

4.1. Crecimiento y manipulación de células

4.1.1. *C. pneumoniae*

4.1.1.1. Cultivo y conservación

Se utilizó la cepa CM-1 de *C. pneumoniae* que se inoculó en células HEp-2 para su crecimiento (Wong y cols., 1992).

Crecidas las monocapas de células HEp-2 (ver sección 4.1.2.1.) en medio RPMI, se inoculó 1 ml de *C. pneumoniae* en cada frasco roux de 25 cm² y se centrifugaron a 1380 x g durante 45 min, para favorecer la penetración de la bacteria en la célula y se dejaron en reposo 1 h antes de cambiarle el medio de crecimiento por medio de mantenimiento Ham's F-12. Inoculados los frascos, se incubaron a 35-37° C durante 5 días, momento en el que se recogieron los CEs de *C. pneumoniae*.

4.1.1.2. Aislamiento de la bacteria

Para la obtención de CEs, crecidos en células HEp-2 (ver sección anterior), se despegaron las células HEp-2 de los frascos con bolas de vidrio estériles, y recogidas las células infectadas, se sonicaron 70 ciclos de 1 min al 50% de potencia y 50% de duración de pulso. Seguidamente, se almacenaron congelados a -80° C hasta su uso.

La suspensión de CEs se pasó a través de una jeringa de insulina para deshacer los restos celulares no lisados y se centrifugaron a 25 x g durante 2 min. Recuperado el sobrenadante, se centrifugó a 13200 x g durante 45 min. Se resuspendió el precipitado en PBS, obteniendo la bacteria aislada y recolectada, necesaria para el aislamiento de ARNm.

4.1.1.3. Manipulación y aislamiento de ARN

El ARN se degrada fácilmente por RNasas que pueden contaminar el medio. Por esta razón, se utilizó material plástico estéril libre de RNasas desechable. El material de cristal fue aclarado con agua libre de RNasas y autoclavado. Las soluciones fueron realizadas en recipientes libres de RNasas y con agua libre de RNasas, tratada con

DEPC 0.1% (v/v) con agitación vigorosa e incubadas durante 12 h, secadas y luego autoclavadas. Las muestras de ARN fueron divididas en alícuotas que se almacenaron a -80° C y se mantuvieron en hielo cuando se descongelaron.

Los CE se crecieron en células HEp-2 (ver sección 4.1.1.1.). Una vez crecidos se purificaron (ver sección 4.1.1.2.) eliminando los restos celulares de HEp-2 y centrifugando la bacteria, obteniendo así los CE aislados y recolectados. La extracción del ARNm se llevó a cabo utilizando el protocolo de aislamiento “MagMAX RNA Isolation Kit” de Ambion, según las instrucciones del fabricante, tras las cuales se disolvió en agua libre de ARNasas y así aislado fue conservado a -80° C.

4.1.2. Línea celular HEp-2

4.1.2.1. Cultivo y conservación

La línea celular HEp-2 (células de carcinoma de laringe) cedidas por Vircell S.L. se crecieron en frascos roux de 150 cm² con medio RPMI suplementados con L-glutamina y SFB. Se incubaron a 35-37° C durante 4-5 días hasta observar una monocapa de células continua.

Para el mantenimiento de la línea celular, se eliminó el medio, se lavó dos veces la monocapa con PBS para eliminar los restos de medio y se añadieron 5 ml de tripsina-EDTA para disociar la monocapa, seguidamente se añadió nuevo medio de crecimiento y se homogenizaron las células, volviéndolas a crecer en otros frascos.

4.1.2.2. Preparación de extractos crudos

Se partió de un cultivo de HEp-2 (ver sección anterior), el cual se centrifugó a 700 x g durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en PBS, este lavado se repitió de nuevo. Las células fueron sonicadas, las condiciones fueron de 3 series de 10 ciclos de 20 s al 70% de potencia y 50% de duración de pulso. Se centrifugó a 13200 x g durante 5 min, para eliminar las células que no habían sido lisadas. El sobrenadante se almacenó a -20° C alicuoteado.

4.1.3. *E. coli*

4.1.3.1. Cultivo y conservación

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas rutinariamente en medio líquido LB con agitación (400 rpm) a 37° C, a partir de un clon procedente de una colonia aislada crecida en medio LB agar, asegurando así las poblaciones homogéneas. Fueron suplementados con la concentración adecuada de antibiótico tanto en medio sólido como en líquido, cuando fue necesario. Las cepas se conservaron a -80° C con un 15% de glicerol.

4.1.3.2. Crecimiento e inducción de clones

Se usaron alícuotas de células competentes BL21-AI, cepa de expresión, que se transformaron con ADN plasmídico mediante choque térmico (ver sección 4.1.3.4.2.1.) y se crecieron en medio LB agar con el antibiótico adecuado, para la selección de clones, durante toda la noche a 37° C. Crecidas las colonias, se seleccionaron 10 clones que se transfirieron a un medio líquido de LB con la concentración de antibiótico adecuada y se incubaron a 37° C en agitación. Cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial ($DO_{600} = 0,4-0,6$) se indujeron, dejando una alícuota de cada clon sin inducir como control negativo. Para inducir la expresión del recombinante, se añadió IPTG a concentración final de 1mM y L-Arabinosa a una concentración final del 0,2% y se volvieron a incubar a 37° C, en agitación, entre 2-4 h.

Posteriormente, para la purificación de recombinantes se crecieron los cultivos en volúmenes mayores, a partir de los clones que mayor inducción presentaron. Se prepararon los cultivos con su antibiótico correspondiente, se añadieron los preinóculos no inducidos a una dilución 1/100 y se incubaron a 37° C en agitación. Cuando los cultivos llegaron a la fase de crecimiento exponencial, se indujeron con 1 mM de IPTG y 0,2% de L-Arabinosa, durante 2-3 h, en agitación. Finalmente, se centrifugaron a 1790 x g, durante 15 min, se lavaron con PBS y se volvieron a centrifugar a 2370 x g, durante 15 min. Seguidamente, se almacenaron los extractos a -20° C hasta su uso.

4.1.3.3. Preparación de extractos clarificados

La preparación de los extractos crudos tanto para la purificación de proteínas recombinantes (sección anterior) como para obtención extractos de *E. coli* sin expresión de recombinantes, se describe de forma general en este apartado.

Para el segundo caso, se creció BL21-AI a partir de un glicerol conservado a -80°C en LB agar con su marcador de resistencia (tetraciclina $10\ \mu\text{g/ml}$) y de una colonia aislada se creció un preinóculo. Crecido el preinóculo, se transfirió a un cultivo de mayor volumen a partir de una dilución 1/100, con su antibiótico adecuado y se dejó crecer toda la noche a 37°C , en agitación. Posteriormente, se centrifugó a $1790\ \text{x g}$, durante 15 min, se lavó con PBS, se volvió a centrifugar a $2370\ \text{x g}$, durante 15 min y se almacenó a -20°C .

Para ambos casos y en general, se resuspendió el extracto en 0,4 % (p/v) con tampón de lisis 10x (Tabla 3.3.), se añadió leupeptina a una concentración final de $5\ \mu\text{M}$, PMSF a $2\ \text{mM}$ y se homogenizó. Posteriormente, se añadió lisozima a una concentración final de $1\ \text{mg/ml}$. La lisis se realizó bien por sonicación o mediante prensa de French. Las condiciones de sonicación fueron las siguientes: 3 series de 10 ciclos de 20 s al 70% de potencia y 50% de duración de pulso, mientras que la lisis mediante la prensa de French se realizó a 1000 PSI, pasando el extracto 2 veces por la prensa. Finalmente, se centrifugó a $40700\ \text{x g}$, durante 30 min a 4°C , se alicuoteó el sobrenadante y guardo a -20°C hasta su uso.

4.1.3.4. Transformación

4.1.3.4.1. Preparación de bacterias competentes

4.1.3.4.1.1. Químicamente competentes

El método usado para hacer bacterias químicamente competentes fue el del CaCl_2 , descrito por Hanahan y Meselson (1983). El CaCl_2 hace permeables las paredes de las células, de modo que los fragmentos de ADN circulante en el fluido pueden penetrar rápidamente.

De una colonia aislada se preparó un preinoculo que se añadió a un cultivo a una dilución 1/100. Las bacterias se recogieron en fase logarítmica de crecimiento ($DO_{600}=0,375-0,5$). A partir de ese momento, se mantuvieron en todo momento por debajo de 4° C. Las células fueron recolectadas a 1000 x g durante 7 min a 4° C, se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial, en $MgCl_2$ 0,1 M frío y se dejaron en hielo 20 min. Nuevamente, se centrifugó usando las mismas condiciones descritas anteriormente y se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial en $CaCl_2$ 0,1M frío, manteniéndose en hielo al menos 1 h. Finalmente, se añadió a la solución un 15% de glicerol frío, se alicuotearon en 50 μ l y 200 μ l para los experimentos de transformación y se almacenaron a -80 ° C.

4.1.3.4.1.2. Electrocompetentes (Elvin y Birgham, 1991; Miller y Nickoloff, 1995)

Se preparó un preinóculo de medio líquido LB (dilución 1/50) y se incubó a 37° C en agitación. Crecido el preinóculo, se preparó un cultivo (dilución 1/100) y se incubó en las mismas condiciones. Las bacterias se recogieron en fase logarítmica ($DO_{600} = 0,5-0,7$, correspondiente aproximadamente a una concentración de 5×10^7 células/ml). Se centrifugó a 4000 x g/ 4° C/ 15 min, y se procedió a los lavados. Se resuspendió en 1 volumen de glicerol estéril frío al 10% y se volvió a centrifugar a 4000 x g/ 4° C/ 15 min. Seguidamente, se resuspendió en 0,5 volúmenes de glicerol estéril frío al 10%, 2 veces. Una vez más, se añadieron 0,04 volúmenes de glicerol estéril frío al 10%, utilizando siempre las mismas condiciones de centrifugación. La manipulación de las células debe hacerse siempre a 4° C. Finalmente, las células se resuspendieron en 0,002-0,004 volúmenes de glicerol estéril frío al 10%, se prepararon alícuotas de 50 μ l y se almacenaron a -80° C hasta su uso.

4.1.3.4.2. Proceso de transformación

4.1.3.4.2.1. Método del choque térmico (Hanahan y Meselson, 1983)

Para la transformación de células competentes de *E. coli*, se utilizaron alícuotas de 200 μ l para NovaBlue o de 50 μ l para BL21-AI, a las que se le añadió entre 1-10 μ g de ADN, y se mantuvieron en hielo durante 30 min. Se facilitó la introducción del plásmido sometiénolas a un choque térmico a 42° C, durante 45 s, y se mantuvieron posteriormente en hielo durante 2 min. La recuperación de las células se hizo a 37° C, en agitación durante

1 h en medio LB líquido sin selección. Finalmente, las células fueron recogidas y extendidas en medio semisólido LB, suplementadas con el antibiótico adecuado e incubadas a 37° C.

4.1.3.4.2.2. Electroporación (Bio-Rad)

La electroporación es un método de transformación que consiste en la administración de pulsos rápidos de una corriente eléctrica de gran voltaje a fin de producir poros transitorios en la membrana plasmática y volverla permeable al ingreso de un ADN recombinado.

Para ajustar las condiciones óptimas para la transformación, se utilizó como control pUC19. Las condiciones de electroporación fueron 2.0 kV, 200 Ω y 25 μ F (Invitrogen).

Alicuotas de 50 μ l de células electrocompetentes DH10B T1 se mezclaron con 1,5 μ l de ADN y se mantuvieron en hielo 1 min. Posteriormente, se transfirió a una cubeta fría de electroporación, asegurándonos de que toda la suspensión permaneció en el fondo de la cubeta. Inmediatamente después del pulso, se adicionó 1ml de medio SOC sobre la cubeta. Este paso es crítico y debe hacerse lo más rápido posible. Se resuspendieron y se transfirieron para ser incubadas a 37° C durante 1 h en agitación. Finalmente, bien se realizó una siembra en placa o bien se añadió 1 volumen de medio de congelación estéril (60% medio SOC: 40% glicerol) para el caso de la genoteca, se alicuoteó y se guardó a -80° C.

4.1.3.5. Aislamiento de ADN

Para el aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala, se utilizó miniprep alcalina y para gran escala, maxiprep y centrifugación con gradiente de densidad por CsCl. Se utilizó un método u otro en función de la cantidad y de la pureza requerida para el ADN en cada caso.

4.1.3.5.1. Miniprep alcalina (Birnboim y Doly, 1979)

Las células son lisadas con una solución de SDS a pH alcalino y posteriormente, neutralizadas con acetato sódico 3M a pH 5,2. Mediante este proceso, la mayoría del ADN cromosómico y las proteínas precipitan. Tras la centrifugación, el ADN plasmídico, que se encuentra en el sobrenadante, es tratado con ARNasa y precipitado con etanol.

4.1.3.5.2. Maxiprep

Se sigue el mismo procedimiento que la miniprep, pero partiendo de mayores volúmenes. Se parte de 40 ml de cultivo, aunque puede realizarse hasta con 500 ml. Se realiza una lisis alcalina y además una extracción fenólica previa a la precipitación con etanol.

4.1.3.5.3. Centrifugación con gradiente de densidad de CsCl (Radloff y cols., 1967)

Una descripción detallada del protocolo se encuentra en “Molecular cloning. A laboratory manual” (Sambrook y Russell, 1989).

Este método permite separar el ADN plasmídico del genómico debido a su diferencia de densidad. Al centrifugar a alta velocidad, la fuerza centrífuga es suficiente para generar y mantener un gradiente de átomos de cesio, dando lugar a una solución tan densa que el ADN flota en ella. Las moléculas de ADN se estabilizan en un punto donde la densidad de la solución de CsCl es exactamente igual a su propia densidad. El ADN se mezcla con el EtBr y posteriormente se suspenden las moléculas en un gradiente de CsCl. Las moléculas de EtBr se disponen entre las bases del ADN, abriendo la doble hélice y disminuyendo su densidad. Como los plásmidos son círculos cerrados, no pueden desenredarse tanto como los trozos lineales de ADN, absorbiendo menos EtBr y manteniendo por tanto una densidad superior. En una centrifugación a alta velocidad acaban colocándose en el gradiente de densidad más abajo que el ADN lineal, que al poder desenredarse, ha tomado más EtBr y flota más.

4.2. Manipulación enzimática de ácidos nucleicos

4.2.1. Retrotranscripción

Permite la conversión de ARN en ADN. A partir de una hebra de ARN se sintetiza la primera cadena de ADN. La reacción está catalizada por una transcriptasa inversa. Para la construcción de la genoteca se utilizó la SuperScript II proporcionada por Invitrogen. La reacción fue catalizada a 45° C durante 60 min. La incubación a esta temperatura inhibe las uniones no específicas del cebador al molde y reduce la síntesis interna, y extensión de ADNc por la transcriptasa inversa.

4.2.2. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) descrita por Arheim y Erlich (1992), permite producir grandes cantidades de un ADN específico a partir de una muestra de ADN complejo en una reacción enzimática. Esta técnica utiliza una polimerasa termoestable (Taq polimerasa). Mediante ciclos repetidos de desnaturalización de las hebras, acoplamiento de los cebadores y extensión de la síntesis del ADN, se puede conseguir una amplificación exponencial de los fragmentos.

Para la PCR realizada para detectar el ADNc que codifican las proteínas MOMP y OmcB de la genoteca de expresión, se utilizaron las siguientes condiciones. Los oligonucleótidos (MOMP 5'-TGGTACCTTGCCCTGTAGGGAAC-3' y 5'-TGTCGACTT AGAATCTGAACTGACC-3'; OmcB 5'-TGGATCCTCCAAACTCATCAGACGAG-3' y 5'-TAAGCTTAATACACGTGGGTATTTTCTG-3') fueron usados para amplificar y examinar la presencia de los genes *ompA* y *omcB* de *C. pneumoniae*. Los plásmidos MOMPpET y OmcBpET se usaron como controles positivos. Se añadió 100 ng de ADNc a 20 µl de la mezcla 10X de PCR (Tris-HCl pH 8,3 100 mM, KCl 500 mM, MgCl₂ 3 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos 1 µM) y 1 U VirTaq polimerasa (Vircell S.L.). Las condiciones fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de ADN de 5 min a 95° C, 35 ciclos de amplificación con un apareamiento (30s, a 56° C), una extensión (80s, a 72° C), una desnaturalización (30s, a 95° C) y un ciclo final de extensión de 2 min a 72° C.

4.2.3. Recombinación homóloga

La recombinación homóloga es un proceso por el cual moléculas de ADN parecidas intercambian su información.

Las recombinaciones homólogas realizadas en este trabajo se realizaron usando la tecnología Gateway[®]. Esta tecnología está basada en el sistema de recombinación específica de sitio del bacteriófago λ , que facilita la integración del bacteriófago dentro del cromosoma de *E. coli* y la activación entre la fase lítica y lisogénica (Landy, 1989). En la tecnología Gateway[®], los componentes del sistema de recombinación λ son modificados para mejorar la especificidad y eficiencia del sistema (Bushman y cols., 1985).

La recombinación λ ocurre entre los sitios específicos de unión *attB* en el cromosoma de *E. coli* y *attP* del cromosoma de λ . Los sitios *att* sirven como lugar de unión para las proteínas de recombinación y han sido bien caracterizados. Sobre λ integrado, la recombinación ocurre entre los sitios *attB* y *attP* para dar lugar a los sitios *attL* y *attR*. Este entrecruzamiento ocurre entre las regiones homólogas de 15 pb en los dos sitios, pero secuencias de alrededor son requeridas porque contienen los sitios de unión para las proteínas de recombinación (Landy, 1989). Posteriormente, se realiza otra reacción de recombinación entre los sitios *attL* generados anteriormente y los sitios *attR*, proporcionados por el vector de expresión pDEST17, generándose nuevamente tras la recombinación, los dos sitios *att* originales. Las dos reacciones de recombinación constituyen la base de la tecnología Gateway[®]. Con estas reacciones se clona y traslada el ADNc al vector de destino.

4.2.4. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de ADN se realizaron de acuerdo con las instrucciones indicadas por el fabricante. Se lleva a cabo la reacción en un volumen final de 20 μ l empleando de 1 a 10 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

Se usó la enzima *Bsp1407I* para determinar el tamaño de los insertos de los transformantes positivos. Esta enzima corta secuencias en los plásmidos pDONR222 y pDEST17. Las secuencias que reconoce están localizadas en los sitios *attL* y *attB* para

determinar el tamaño del inserto y en los sitios *attP*, *attR* y el gen *ccdB* para distinguir los vectores no recombinados. También, se usó la enzima *EcoRI* para realizar análisis de restricción con los plásmidos pUC18 y p23pET en el inmunoscreening. Cada uno de estos plásmidos contiene una diana para esta enzima.

4.3. Construcción de una genoteca de expresión

4.3.1. Genoteca de entrada

Se llevó a cabo utilizando el protocolo “CloneMiner™ cDNA Library Construction Kit” de Invitrogen y siguiendo las instrucciones del fabricante. El siguiente esquema resume el proceso de síntesis de ADNc que se siguió (Figura 4.1.):

- 1.- El cebador Biotina-*attB2*-Oligo(dT) anilla con la cadena (A)_n del ARNm.
- 2.- La transcriptasa inversa, SuperScript II, sintetiza la primera cadena de ADNc usando el ARNm como molde.
- 3.- La ADN polimerasa I de *E. coli* sintetiza la segunda cadena de ADNc usando la primera cadena como molde.
- 4.- El adaptador *attB1* se liga al extremo 5' del ADNc. La biotina impide la ligación del adaptador *attB1* con el extremo 3' del ADNc.

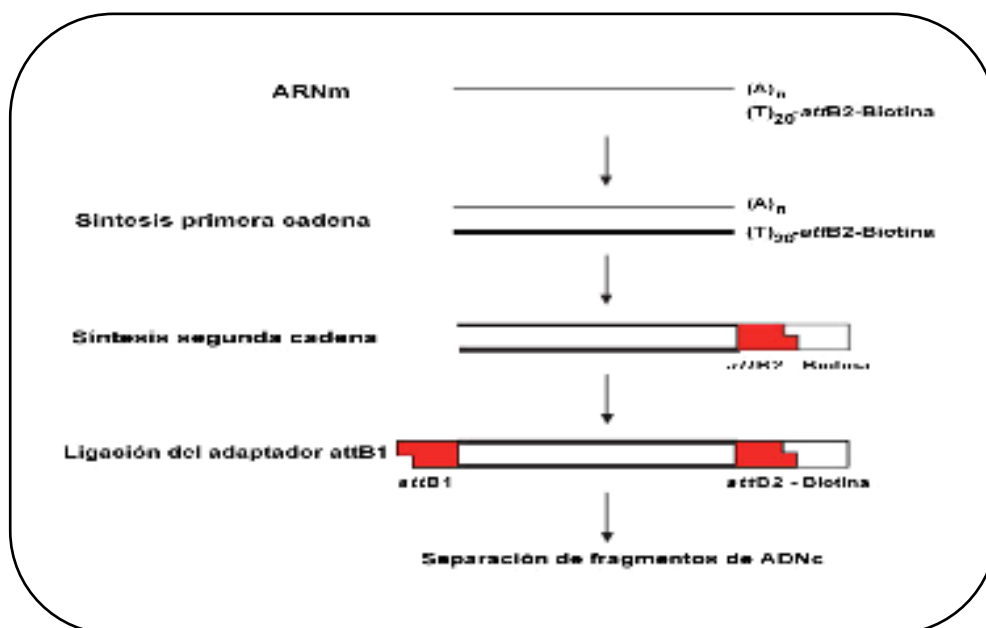


Figura 4.1. Esquema de la construcción de la genoteca de ADNc.

La separación de todos los fragmentos mayores de 500 pb se realizó por cromatografía de filtración en gel con la resina Sephacryl® S-500HR (Invitrogen).

Obtenidos todos los fragmentos de ADNc, se introdujeron dentro de un vector de selección, el plásmido pDONR222 (Invitrogen), mediante una reacción de recombinación dada entre el ADNc flanqueado por los adaptadores *attB* y el vector pDONR222, que contiene la secuencia *attP*. Generándose una genoteca de entrada que contiene secuencia *attL*.

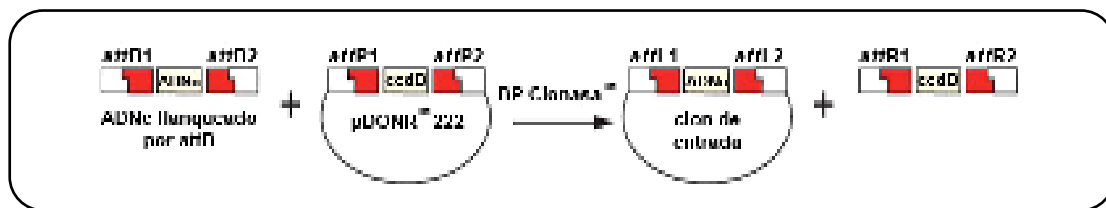


Figura 4.2. Reacción de recombinación entre ADNc y el vector de entrada pDONR222.

La transformación se realizó por electroporación en *E. coli* competentes ElectroMAX™ DH10B™ T1 (Invitrogen), las cuales son sensibles al gen *ccdB*. El siguiente paso fue recombinar el ADNc en un plásmido de expresión.

4.3.2. Titulación de la genoteca de ADNc

Para determinar los títulos de ADNc se calcularon las unidades formadoras de colonias (ufc) por volumen. Se realizaron diluciones seriadas en medio SOC (1/10), de la cepa transformada con el ADNc. Se plaquearon 100 µl de cada dilución por duplicado con su antibiótico correspondiente y se incubaron toda la noche a 37° C. Calculada la media de los títulos, se determinó el número total de ufc multiplicando por el volumen total de la genoteca obtenido.

4.3.3. Transferencia de la genoteca a un vector de expresión para *E. coli*

El plásmido de expresión usado fue el pDEST17 (Invitrogen). La transferencia de la genoteca se realizó mediante la reacción de recombinación LR (ver sección 4.2.3.), entre los sitios *attL* generados en el plásmido pDONR222 y *attR* proporcionados por este plásmido de expresión. El pDEST17 presenta una copia del promotor de la T7 ARN

polimerasa en su secuencia. La expresión de las proteínas recombinantes se indujo añadiendo al medio de cultivo 0,2% de L-Arabinosa, un inductor del promotor *araBAD* que controla la expresión de la T7 ARN polimerasa. Esta polimerasa actúa sobre el gen foráneo debido a la presencia en el vector pDEST17 del promotor T7, dando lugar a unos niveles de expresión muy elevados de la proteína extraña. La expresión basal de este gen, cuando no se induce su expresión con L-Arabinosa, es extremadamente baja (Studier y cols., 1990).

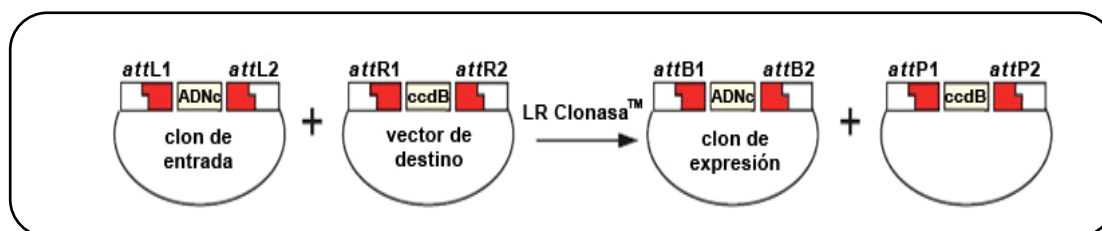


Figura 4.3. Reacción de recombinación entre el clon de entrada y el vector de destino pDEST17.

4.4. Separación de macromoléculas

4.4.1. Electroforesis

Este procedimiento se basa en la separación de moléculas por el paso a través de ellas de una corriente eléctrica.

4.4.1.1. De ADN

En el caso de los ácidos nucleicos, generalmente se lleva a cabo en agarosa, un polímero de cadena larga. Es el procedimiento más utilizado para separar, identificar y analizar moléculas de ARN y ADN. Los ácidos nucleicos son visualizados en el gel, gracias al EtBr, el cual se inserta entre las bases del ADN o ARN y estira ligeramente la hélice. Este producto hace que bajo luz ultravioleta (UV), puedan visualizarse cantidades de hasta 50 ng de ADN (Sharp y cols., 1973).

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 10X (2,5/1 v/v) y se cargaron en geles horizontales de agarosa desde 0,8 hasta 1,5%, según el tamaño medio de la molécula de ADN, hechos en tampón TAE y con EtBr a una concentración final de 0,05 µg/ml. El

desarrollo de la electroforesis se realizó en el mismo tampón a un voltaje entre 50 y 150 V y 145 mA. El marcador de masas moleculares utilizado, Lambda DNA/*Eco*91I (ver sección 3.4.2.) se desarrolló en paralelo para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN o de ARN. Finalmente, los geles se fotografiaron bajo iluminación UV (360 nm).

4.4.1.2. SDS-PAGE

Las proteínas se separan utilizando geles de poliacrilamida, una macromolécula que se entrelaza formando una malla que deja pequeños poros. La cantidad de poliacrilamida determina el tamaño medio de los poros, que a su vez restringen el paso de moléculas a través del gel.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil-sulfato sódico (SDS-PAGE) se realizaron bajo condiciones desnaturizantes como describe Laemmli (1970). Permite la separación de proteínas en función de su tamaño. El SDS es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas envolviendo los polipéptidos, lo que confiere al polipéptido una carga neta negativa, proporcional a su longitud. Dado que existe una relación lineal entre el logaritmo de la masa molecular de un polipéptido y su razón frontal (Rf), cociente entre la distancia de migración de la proteína y la distancia de migración del frente colorante, se puede generar una curva patrón a partir de los tamaños y las distancias de migración de proteínas patrón que se corren junto con las proteínas o polipéptidos a caracterizar.

Las electroforesis se realizaron en geles preparados al 5% de acrilamida/bisacrilamida (relación 30/0,8) para el gel de empaquetamiento y al 12,5, 15 o 20% para el gel de separación.

Para el desarrollo de la electroforesis se añadió tampón de desarrollo 1X (Tabla 3.3.) a la cubeta y se realizó a 50 mA y un voltaje de 150 V. Antes de cargar las muestras se añadió tampón de carga 1X, a cada muestra y fueron hervidas durante 10 minutos. El marcador de masas moleculares se desarrolló en paralelo a fin de estimar la movilidad relativa de las proteínas sujetas al análisis. Para visualizar los polipéptidos, los geles fueron teñidos con una solución que contenía 0,25% de Azul Coomassie (Tabla 3.3.), seguidos de una solución de decoloración, para eliminar el fondo azul.

4.4.2. Cromatografía

4.4.2.1. De ADN

4.4.2.1.1. Gel filtración

La cromatografía de filtración en gel separa las macromoléculas en base a su tamaño. Las moléculas se mueven a través de un lecho de partículas porosas, difundándose dentro de estas en mayor o menor grado. Las moléculas más pequeñas difunden hacia el interior de los poros y por tanto se mueven a través del lecho más despacio, mientras que las moléculas más grandes entran menos o no entran en los poros y además se mueven más rápidamente a través del lecho. Tanto la masa molecular como la forma tridimensional contribuyen al grado de retención.

El Sephacryl® S-500HR (Invitrogen) es un carbohidrato utilizado para la separación de macromoléculas en función de su tamaño. El fraccionamiento en columnas de Sephacryl S-500 se utilizó durante la construcción de la genoteca de expresión de *C. pneumoniae*, para separar las fracciones de ADNc en función de su tamaño. La resina retiene los fragmentos menores de 500 pb, como son: adaptadores, exceso de cebadores y pequeños fragmentos de ADNc. Así las fracciones que eluyen más rápidamente contienen los fragmentos de ADNc más grandes.

La cromatografía se realizó en columnas con 1 ml de resina empaquetada. La resina fue previamente lavada 4 veces con tampón TEN (Tabla 3.3). Posteriormente, se adicionó la muestra y se recogieron las fracciones eluidas por gravedad. A continuación, fueron cuantificados mediante el ensayo en placas de agarosa con EtBr.

4.4.2.2. De proteínas

4.4.2.2.1. Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad separa proteínas en base a una interacción reversible entre una proteína y un ligando específico anclado a la matriz. La cromatografía de afinidad es la única técnica que permite la purificación de una biomolécula en base a su

función biológica o estructura química individual y ofrece una alta selectividad, resolución y gran capacidad de unión.

4.4.2.2.1.1. Cromatografía de afinidad por Ni²⁺

Ni Sepharose™ 6 Fast Flow (GE Healthcare) esta constituida de partículas de agarosa de 90 µm altamente acopladas, en las que un ligando quelante se inmoviliza. Este ligando quelante esta cargado con iones de Ni²⁺, que es el primer ión metálico de elección para purificar la mayoría de las proteínas etiquetadas con histidina. Esta metodología explota la gran afinidad que presentan los iones de níquel (Ni²⁺) por los residuos del aminoácido histidina. La elución se produce utilizando un tampón con una alta concentración de imidazol, el cual al ser un análogo estructural del aminoácido histidina, compete con esta y la desplaza en su interacción con el Ni²⁺.

El proceso de purificación por este método cromatográfico fue realizado de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante (GE Healthcare).

4.4.2.2.1.2. Cromatografía de afinidad por proteína A

Este método cromatográfico permite purificar y concentrar IgG de sueros, utilizando un sistema de altas presiones y una resina de sefarosa-proteína A. Se basa en la elevada afinidad de la proteína A por la región Fc de las IgGs. La proteína A es un polipéptido de 42000 Daltons, constituyente habitual de la pared celular de *Staphylococcus aureus* que contiene cinco regiones que se unen a la región Fc de las IgGs. Como ligando de afinidad, la proteína A es inmovilizada a la sefarosa, por lo que sus regiones quedan libres para unirse al anticuerpo. Una molécula de proteína A inmovilizada puede unirse al menos a dos moléculas de IgG. La utilización de resina acoplada a proteína A es un método común para llevar a cabo la purificación de sueros policlonales, tanto de humanos como de conejos.

Para llevar a cabo esta técnica, en primer lugar se filtró el suero con filtros de 0.22 µm y se equilibró la columna de sefarosa con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón de equilibrado (Tabla 3.3.). Posteriormente, se pasaron los sueros por la columna a un flujo de 0,5 ml/min y se lavó con 10 CV de tampón de lavado (Tabla 3.3.), para eliminar el resto

de componentes del suero no unidos a la resina. Por último, se procedió a la elución de los anticuerpos con 10 CV de tampón de elución. (Tabla 3.3.), en alícuotas de 0,5 ml. Para neutralizar la acidez del tampón de elución, se añadió tampón de neutralización (Tabla 3.3.) a dilución 1/10.

4.4.2.2.2. Cromatografía de intercambio iónico

La separación en la cromatografía de intercambio iónico depende de la adsorción reversible de moléculas de soluto cargadas a grupos de intercambio iónico de carga opuesta. Un intercambiador iónico consiste en una matriz insoluble en la que los grupos cargados se han unido por enlaces covalentes. Los iones del soluto pueden ser reversiblemente intercambiados con otros iones de la misma carga sin alterar la matriz.

Los intercambiadores cargados positivamente adsorben iones de soluto cargados negativamente (aniones) disponible para ser cambiados y se llaman intercambiadores aniónicos. Los intercambiadores cargados negativamente adsorben iones de soluto cargados positivamente (cationes) y se llaman intercambiadores catiónicos.

4.4.2.2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico Q

Capto™ Q (GE Healthcare) posee un fuerte intercambiador de aniones que contiene grupos funcionales de amino cuaternario acoplado a una agarosa modificada químicamente. La elución se realiza utilizando condiciones desfavorables para la unión iónica de las moléculas de soluto. Esto se realizó incrementando la fuerza iónica del tampón de elución con NaCl 1 M.

El proceso de purificación por este método cromatográfico fue realizado de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante.

4.4.2.2.2.2. Cromatografía de intercambio iónico S

Macro-Prep® High S Support (Bio-Rad) posee un fuerte intercambiador de cationes que contiene grupos funcionales de sulfonato acoplado a una agarosa modificada químicamente. La elución se realiza incrementando la fuerza iónica del tampón de elución

con NaCl 1 M, donde los iones Na⁺ reemplazarán a los iones del soluto.

El proceso de purificación por este método cromatográfico fue realizado de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante.

4.5. Inmunoabsorción de anticuerpos primarios

Los anticuerpos policlonales, frecuentemente, contienen anticuerpos que reaccionan con proteínas de *E. coli*. Estos anticuerpos contaminantes incrementaran los fondos y crean falsos positivos, disminuyendo la sensibilidad y fiabilidad del ensayo. Para eliminar estos anticuerpos problemas se realizo el siguiente protocolo proporcionado por Stratagene.

Se preparó un lisado de *E. coli* (ver sección 4.1.3.3.) a una dilución ½ en tampón TNT (Tabla 3.3.). En este lisado diluido se sumergieron 4 membranas de nitrocelulosa (NC) autoclavadas y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, con agitación ocasional, quedando unidas las proteínas de *E. coli* a la membrana. Se secaron, se lavaron y seguidamente se sumergieron en solución de bloqueo con TNT (Tabla3.3.) durante 30 min a temperatura ambiente en agitación. Las membranas se aclararon con tampón TNT. Finalmente, el anticuerpo primario se diluyo en relación 1/10 en solución de bloqueo con TNT y una a una se incubaron las membranas en esta solución, con agitación durante 10 min a 37° C. Las membranas se descartaron y se recogió la solución del anticuerpo primario. Este ciclo de repitió dos vez con cada suero que se preabsorbió.

Esta preabsorción de anticuerpos primarios se realizó de igual forma para eliminar anticuerpos anti-humanos del suero de conejo. Para lo que se preparó un lisado de células HEp-2 (ver sección 4.1.2.2.).

4.6. Western-blot (Burnette, 1981)

4.6.1. Transferencia

Para las transferencias desde geles SDS-PAGE se utilizaron las membranas de PVDF, con un tamaño de poro de 0,45 µm, útil para retener proteínas de más de 10 kDa. La membrana se sumergió en metanol absoluto durante 1 min, seguidamente se introdujo

en solución de transferencia (Tabla 3.3.) junto con el gel durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se colocó la membrana en contacto con el gel en un sistema de transferencia semiseco (Bjerrum y Schafer-Nielsen, 1986). La transferencia se realizó aplicando un voltaje constante de 100 V y 200 mA durante 2 h o de 30 V y 90 mA durante toda la noche. Terminada la transferencia, las membranas se sumergieron en solución de bloqueo (Tabla 3.3.) durante 2 h, en agitación, a temperatura ambiente. De esta manera, las membranas quedaron preparadas para llevar a cabo la inmunodetección.

4.6.2. Inmunodetección

Las proteínas transferidas fueron inmunodetectadas de acuerdo con el siguiente protocolo. Se bloquean las membranas con solución de bloqueo (Tabla 3.3.) durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación. Seguidamente, se incubaron con anticuerpos primarios, a diferentes diluciones en solución de bloqueo durante 2 h y 30 min a temperatura ambiente y en agitación. Trascurrido ese tiempo, las membranas se lavaron 3 veces en solución de lavado (Tabla 3.3.). Posteriormente, se incubaron con anticuerpos secundarios (anti-IgG humanos, anticuerpos anti-IgG de conejo, anti-IgG de ratón) marcados con peroxidasa, a diferentes diluciones en PBS durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación, a continuación se realizó otro ciclo de lavado igual al anterior. El revelado se realizó mediante una reacción de quimioluminiscencia con TMB/ H_2O_2 , siguiendo las instrucciones del fabricante. El H_2O_2 actúa como sustrato de la peroxidasa ligada a los anticuerpos anti-IgG, que a su vez están interaccionando con los anticuerpos primarios y estos a las proteínas, finalmente se produce un precipitado azul, producido por el TMB al reaccionar con radicales libres del O_2 , que aparecerá en las zonas donde se localicen las proteínas que reaccionan con los anticuerpos primarios. Finalmente, las membranas se fijaron en una solución de sacarosa al 10% en PBS.

4.7. Técnicas serológicas

4.7.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La técnica de IFI está basada en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie del portaobjetos. Los anticuerpos específicos presentes en la muestra reaccionan con el antígeno, y las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el

antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior, el complejo antígeno-anticuerpo es revelado mediante globulina antihumana marcada con fluoresceína, resultando visualizable mediante microscopio de fluorescencia.

La reacción de la técnica de IFI IgG fue llevada a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Vircell S.L). En la figura 4.4. se muestra un resumen del procedimiento.

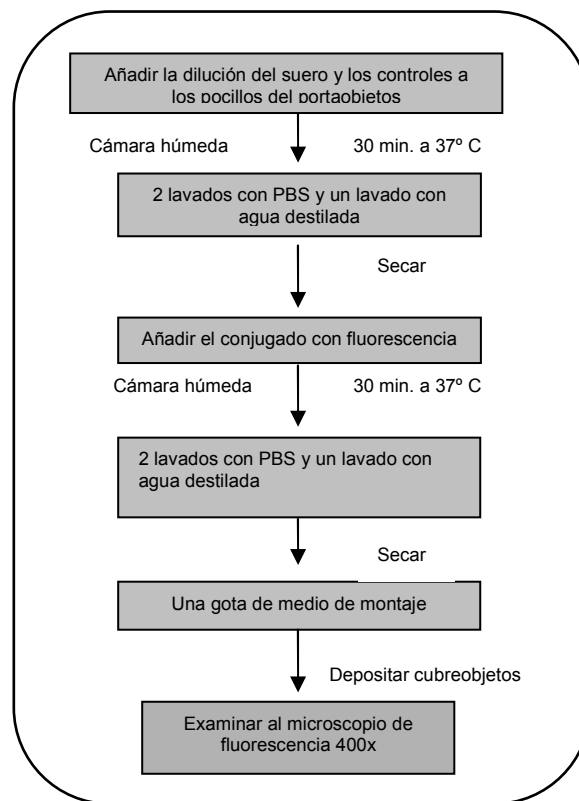


Figura 4.4. Resumen de la técnica de IFI IgG (Vircell S.L.).

4.7.2. Prueba inmunoenzimática para determinación de anticuerpos (ELISA)

La técnica de ELISA está basada en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie de poliestireno. Las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior la globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo y la que no se une es eliminada en los lavados. El anticuerpo unido reacciona con el sustrato (TMB) para dar una reacción coloreada azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada.

La realización de la técnica de ELISA IgG fue llevada a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Vircell S.L). En la figura 4.5. se muestra un resumen del procedimiento.

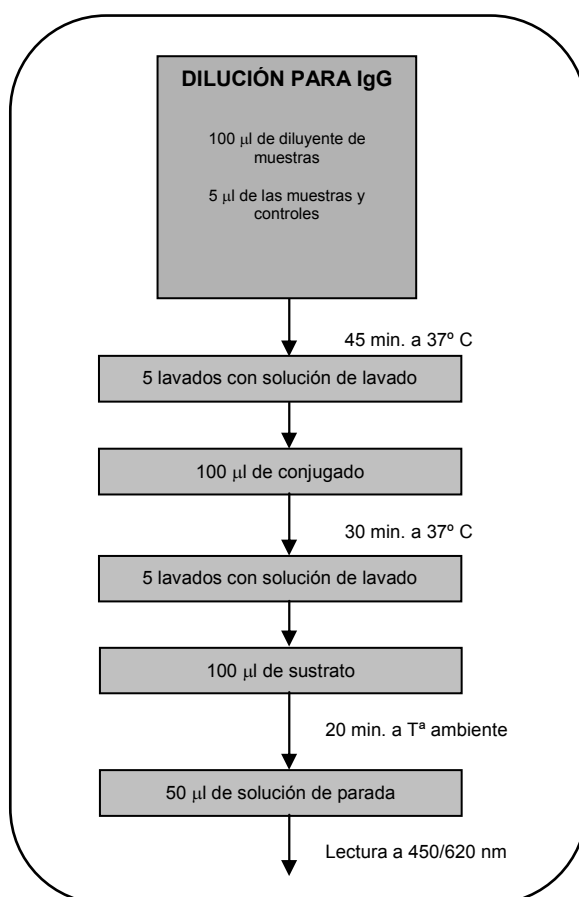


Figura 4.5. Resumen del procedimiento de ELISA IgG (Vircell S. L.)

4.7.3. Interpretación

Los sueros humanos empleados para evaluar la sensibilidad y especificidad de los ensayos de ELISA fueron previamente validados mediante un equipo de IFI (Vircell S.L.), considerada como la técnica de referencia o *gold standard* para el diagnóstico de la infección por *C. pneumoniae*. El criterio utilizado para interpretar los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA con los recombinates sometidos a estudio viene expresado en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Interpretación de resultados de los ensayos de ELISA, considerando la IFI como técnica de referencia.

IFI/Ensayo ELISA	Interpretación
Positivo/Positivo	Verdadero positivo (VP)
Positivo/ Negativo	Falso negativo (FN)
Negativo/Positivo	Falso positivo (FP)
Negativo/Negativo	Verdadero negativo (VN)
Dudoso/Positivo o negativo	Dudoso
Positivo o negativo/Dudoso	Dudoso

A partir de la interpretación de los resultados, se determina los valores de sensibilidad (S) y especificidad (E) de los ensayos de ELISA con los recombinantes estudiados:

$$S (\%) = VP / (VP+FN) \times 100$$

$$E (\%) = VN / (VN+FP) \times 100$$

4.8. Inmunización del conejo

Se inmunizó un conejo New Zealand de 4 meses. Se realizaron 3 inmunizaciones por vía intramuscular de 1 ml. En la semana 0, se inmunizó al conejo con una dosis que contenía un 50% de una suspensión de CEs de *C. pneumoniae* CM-1, a una concentración de 1×10^7 cel/ml, y un 50% del adyuvante completo de Freund. A las 3 semanas, se volvió a inmunizar al conejo, esta vez con un 50% de la suspensión de CEs, a la misma concentración que la anterior y un 50% del adyuvante incompleto de Freund. A las 6 semanas, se repitió esta última dosis. Finalmente, 15 días después de la tercera inmunización se procedió a la sangría del conejo, manteniendo el suero almacenado a -20°C hasta su uso.

4.9. Inmunoscreening de la genoteca de expresión de *C. pneumoniae* en la cepa BL21

La construcción de la genoteca, que se explica en la sección 4.3., fue llevada a cabo con la cepa CM-1 de *C. pneumoniae*. Los fragmentos de ADNc obtenidos fueron introducidos primero en el vector pDONR222 (ver sección 3.4.1.), como vector de entrada y posteriormente en el vector pDEST17 (ver sección 3.4.3.), como vector de expresión. Estos ADNc obtenidos de la genoteca e insertados en este vector de expresión, producen altos niveles de proteínas de fusión una vez transformados por choque térmico en la cepa BL21-AI. Llegados a este punto, se realizó un inmunoscreening de los clones que expresan recombinantes usando sueros anti- *C. pneumoniae*.

Se llevó a cabo el método descrito por Sambrook y Russell, (1989), con algunas modificaciones. Se colocaron membranas de NC numeradas, sobre placas madre de 90 mm de LB, con ampicilina 100 µg/ml. Se incubaron a 37° C, hasta obtener pequeñas colonias. De cada membrana madre se obtuvo una membrana replica, poniéndolas en contacto, previamente numeradas y humedecidas. Con una aguja se marcó la posición y orientación de las membranas. Posteriormente, se transfirieron las membranas replica a las placas usadas para humedecerlas y las madres a nuevas placas. Se incubaron las placas, madre y replica, a 37° C hasta obtener colonias de 1-2 mm de diámetro. Las placas madre se almacenaron a 4° C hasta obtener los resultados del screening inmunológico.

Las membranas replica se indujeron en nuevas placas con 0,2% de L-Arabinosa y 1 mM de IPTG, además del antibiótico adecuado (ampicilina 100 µg/ml) y se incubaron a 37° C entre 3-4 h. Posteriormente, se expusieron las membranas a los vapores de cloroformo durante 15 minutos. Luego se trataron con tampón de lisis (Tabla 3.3.) durante 12-16 h a temperatura ambiente. Se lavaron en tampón TNT durante 30 min a temperatura ambiente, 2 veces y se eliminaron los restos de la superficie de las membranas. Finalmente, se volvieron a lavar en las mismas condiciones.

Se sumergieron individualmente en solución de bloqueo para el inmunoscreening (Tabla 3.3) durante 30 min en agitación a temperatura ambiente y se incubaron con suero anti-*C. pneumoniae* a diferentes diluciones en solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 3 h, en agitación. Después se realizó un ciclo de lavado individualmente durante 10 min en solución de lavado 1, seguida de la solución de lavado 2, y nuevamente solución de

lavado 1.

El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado usando anticuerpos anti-IgG marcados con peroxidasa a diferentes diluciones, estabilizado en PBS. Se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación. Las membranas se lavaron de nuevo en los mismos tampones anteriormente citados durante 10 min. El complejo antígeno-anticuerpo-anticuerpo peroxidasa fue detectado usando TMB/H₂O₂. Las membranas se revelaron en esta solución, ya que en presencia de peroxidasa, este sustrato produce un precipitado insoluble azul oscuro que permite la detección del complejo antígeno-anticuerpo. La reacción se detuvo lavando con agua y se fijaron las membranas con sacarosa al 10% en PBS.

Las colonias positivas se identificaron en las placas madre haciendo coincidir las señales realizadas. Se transfirieron las colonias positivas a un medio líquido de LB con el antibiótico apropiado y se incubaron durante 12-16 h en agitación a 37 ° C.

4.10. Cuantificación de macromoléculas

4.10.1. Espectrofotómetro

La concentración de los ácidos nucleicos se determinó por espectrofotometría aprovechando la capacidad cromófora que presentan los anillos aromáticos de las bases púricas y pirimidínicas a 260 nm. Se puede calcular la concentración aplicando la ley de Lambert-Beer, si se conoce el coeficiente de extinción molar de la sustancia. Para el ADN de doble hebra una DO₂₆₀ = 1, corresponde a 50 µg/ml y para el ARN, una DO₂₆₀ = 1 equivale a 40 µg/ml. Las diluciones se llevaron a cabo en tampón TE (Tabla 3.3.).

La concentración de proteínas también se determina por espectrofotometría. Se basa en la propiedad de que las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm, debido al contenido en aminoácidos aromáticos como la tirosina y el triptófano y en menor grado la fenilalanina. El cálculo de la concentración también se realiza aplicando la ley de Lambert-Beer e igualmente se requiere el coeficiente de extinción molar de una solución de esa proteína. En nuestro caso utilizamos el valor teórico calculado a partir de la secuencia de aminoácidos (Gill y von Hippel, 1989).

4.10.2. En placas de agarosa-EtBr

Es un procedimiento poco preciso, pero útil cuando se dispone de poco volumen de muestra. Consiste en visualizar bajo luz UV el ADN embebido en placas de agarosa teñidas con EtBr. Como controles para este ensayo se utilizan soluciones de ADN de concentración conocida.

Las placas de agarosa al 1% se prepararon con tampón TAE (Tabla 3.3.). Para ello se calentaron 100 ml de agarosa hasta su disolución y se le añadió EtBr (10 mg/ml) a una concentración de 1 µg/ml. Se añadieron 15 ml a cada placa de 90 mm de diámetro. Se dejaron solidificar y se incubaron las placas a 37° C para permitir que se secaran, luego se almacenaron a 4° C en oscuridad. El control de concentración conocida usado fue el control de ADN pEXP7-*tet* que se preparó con tampón TE, realizando diluciones en un rango entre 50 y 1 ng/µl. Se adicionó a la placa 1 µl de cada dilución control y 1 µl de cada muestra de ADN de concentración desconocida. Se dejó que las muestras de ADN se secasen durante 5-15 min y posteriormente, se compararon con las muestras control bajo luz UV.

4.10.3. Método Bradford

La concentración de proteínas se determinó usando el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976), el cual se basa en la cuantificación de la unión de un colorante, el Azul Coomassie Brillante, a los residuos básicos de una proteína desconocida, utilizando como referencia diferentes cantidades de una proteína patrón.

Para la obtención de la curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA), se representaron los valores de DO a 595 nm frente a distintas concentraciones de BSA (5, 10,15, 20 y 50 mg/ml). Para ello se partió de una solución de esta proteína cuya concentración había sido determinada previamente mediante absorción a 280 nm, sabiendo que una solución de 60 µg/ml de BSA tiene una $DO_{280} = 1$. En el caso de la proteína problema, se determinó la absorbancia a 595 nm y se utilizó la ecuación de la curva patrón para calcular su concentración. Cuanto más similar sea esta proteína problema a la BSA, tanto más acertada será la concentración calculada.

5.1. Construcción de una genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	79
5.2. Inmunoscreening de la genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	84
5.3. Identificación bioinformática de las secuencias de <i>C. pneumoniae</i>	96
5.4. Purificación de las proteínas/polipéptidos recombinantes inmunoreactivos	97
5.5. ELISA con inmunógenos de <i>C. pneumoniae</i> obtenidos de la genoteca	109

5. RESULTADOS

5.1. Construcción de una genoteca de expresión de *C. pneumoniae*

5.1.1. Construcción de una genoteca de entrada de *C. pneumoniae* utilizando tecnología Gateway® (Invitrogen)

Para la elaboración de la genoteca, se utilizó ARNm de *C. pneumoniae* CM-1 obtenido a partir de 15 ml de una suspensión de células HEp-2 infectadas con esta bacteria. Para ello, la bacteria fue aislada tal y como se indica en el apartado 4.1.1.2, obteniendo una concentración final de 5×10^7 bacterias/ml. De los 15 ml de suspensión, se obtuvieron 20 μ l de ARNm a una concentración de 0,25 μ g/ μ l (Figura 5.1.). Para la síntesis de ADNc se utilizaron 2,5 μ g de ARNm, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.3.1. de material y métodos. Obtenido el ADNc e insertado dentro del vector de entrada pDONR222, se transformó en células ElectroMAX™ DH10B™ T1 mediante electroporación, obteniendo un título de $1,17 \times 10^5$ ufc/ml. Completadas las electroporaciones, se obtuvieron 7,7 ml de volumen total, con un número total de clones primarios de 9×10^5 ufc. La genoteca de entrada fue almacenada a -80° C y conservada en medio de congelación, cuya composición se indica en la tabla 3.3.

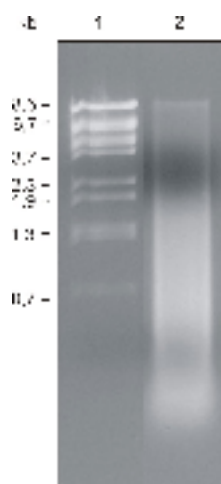


Figura 5.1. ARNm obtenido de *C. pneumoniae* CM-1. Análisis del ARNm de *C. pneumoniae* obtenido mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. Calle 1: Marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco91I*. Calle 2: ARNm de *C. pneumoniae* utilizado para la obtención de la genoteca de ADNc.

Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de los fragmentos presentes en la genoteca de entrada para determinar su calidad. Para ello, se realizó un aislamiento de ADN plasmídico de 10 clones diferentes y un análisis de restricción de los mismos con la enzima *Bsp1407I*, cuya diana se localiza en las secuencias *attL* del vector de entrada (pDONR222). Este análisis fue realizado con el fin de determinar el tamaño medio de los

insertos y el porcentaje de recombinantes. Los resultados se muestran en la figura 5.2. y en la tabla 5.1.

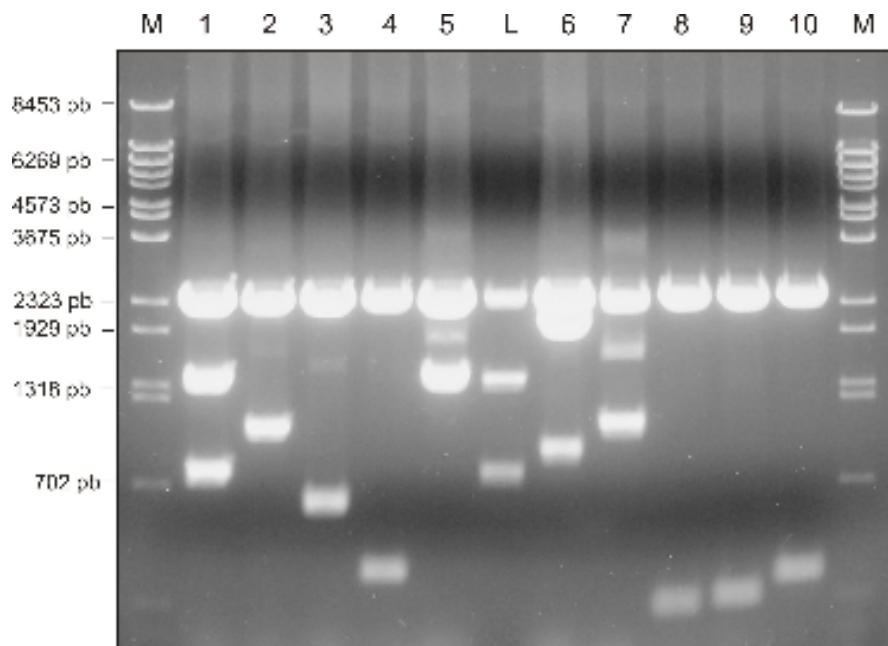


Figura 5.2. Análisis de restricción de clones de la genoteca de entrada. Los números corresponden a los clones analizados procedentes de la genoteca de entrada, digeridos todos con la enzima de restricción *Bsp1407I*. Como control se utilizó el vector pDONR222. Electroforesis realizada con 5 μ l de ADN plasmídico de cada clon y desarrollada en un gel de agarosa del 0,8%, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco911* para estimar el tamaño de los insertos. L: digestión del vector pDONR222.

Tabla 5.1.

A. Tamaño de los insertos de *C. pneumoniae* introducidos por recombinación en pDONR222 y digeridos con *Bsp1407I*. B. Porcentaje de recombinantes obtenidos y tamaño medio de los insertos.

A

Clon	Tamaño banda (kb)	Tamaño inserto (kb)
1	0.8 + 1.45	2.25
2	1.1	1.1
3	0.6	0.6
4	0.4	0.4
5	1.4 + 1.8 (nd)	1.4
6	0.9	0.9
7	1 + 1.7 (nd)	1.0
8	0.2	0.2
9	0,25	0,25
10	0.35	0.35

nd: no digerido

B

Número de clones analizados	10
Números de clones que contienen inserto	10
Porcentaje de recombinantes	100 %
Tamaño medio del inserto	0.85
Rango del tamaño del inserto	0.2 – 2.25

5.1.2. Transferencia de la genoteca a un vector de expresión de *C. pneumoniae* utilizando la tecnología Gateway® (Invitrogen)

El ADNc aislado a partir de 9×10^5 ufc, se transfirió a un vector de expresión, tal y como se indica en el apartado 4.3.3. El cultivo se creció hasta una $DO_{600} = 1,07$. El volumen obtenido de ADN plasmídico fue de 30 μ l a una concentración de 2,4 μ g/ μ l. Para la reacción de recombinación entre la genoteca contenida en el vector pDONR222 y el vector de expresión, pDEST17, se utilizaron 240 ng y 450 ng respectivamente.

Realizada la recombinación, el vector fue propagado en células ElectroMAX™ DH10B™ T1. 100 ng de la genoteca en pDEST17 se usaron para transformar por electroporación esta cepa, obteniéndose de esta forma la genoteca de expresión en una cepa que puede almacenarse de forma estable. El título de la genoteca de expresión obtenido fue de $1,07 \times 10^5$ ufc/ml. Esta se mantuvo almacenada a -80° C con glicerol al 20% en la cepa ElectroMAX™ DH10B™ T1.

La construcción fue posteriormente verificada mediante análisis de restricción de 10 clones, usando para ello la misma enzima de restricción utilizada anteriormente para calcular el tamaño medio de los insertos y el porcentaje de recombinantes. Se digirieron 5 μ l de ADN plasmídico, aislado mediante maxiprep, de cada clon y 0,6 μ l del vector pDEST17 como control. Las digestiones realizadas se muestran en la figura 5.3. y en la tabla 5.2.

Para la genoteca de entrada, los clones analizados resultaron contener inserto en un 100%, con un tamaño medio de inserto de 0,85 kb, mientras que para la genoteca de expresión también se mantuvo un 100% de inserciones, pero con un tamaño medio de inserto menor, de 0,65 kb.

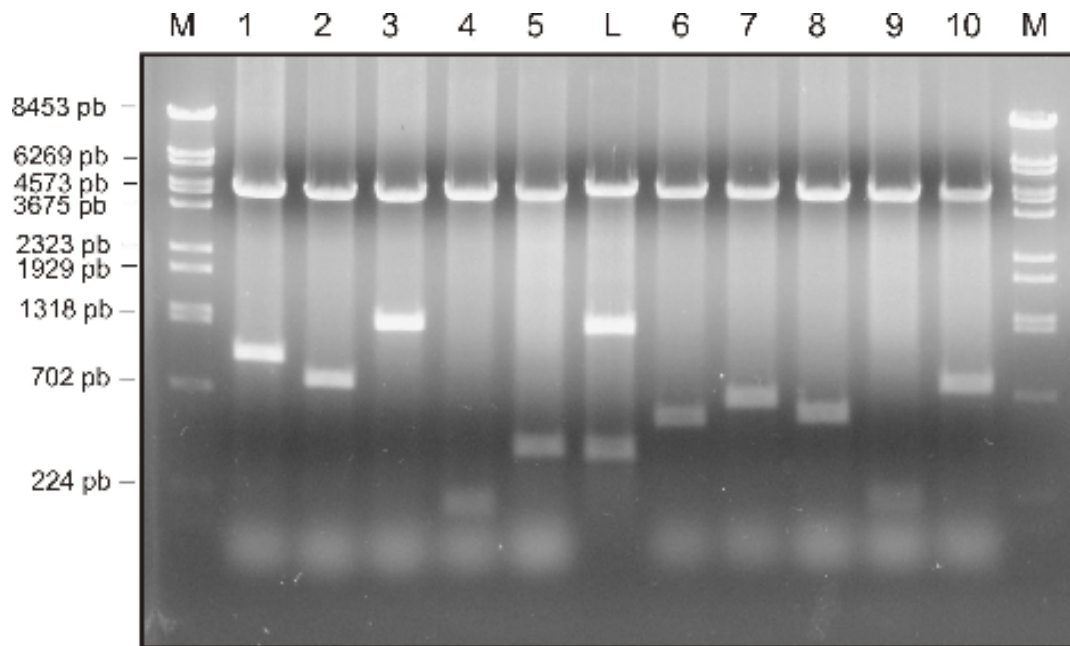


Figura 5.3. Análisis de restricción de clones de la genoteca de expresión. Los números corresponden a los clones analizados procedentes de la genoteca de expresión, digeridos todos con la enzima de restricción *Bsp1407I*. Como control se utilizó el vector pDEST17. Electroforesis realizada con 5 μ l de ADN plasmídico de cada clon y desarrollada en un gel de agarosa del 0,8%, teñido con bromuro de etidio. M: marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco91I* para estimar el tamaño de los insertos. L: digestión del vector pDEST17.

Tabla 5.2.

A. Tamaño de los insertos de *C. pneumoniae* introducidos por recombinación en pDEST17 y digeridos con *Bsp1407I*. B. Porcentaje de recombinantes obtenidos y tamaño medio de los insertos.

A

Clon	Tamaño banda (kb)	Tamaño inserto (kb)
1	1.1	1.1
2	0.85	0.85
3	1.4	1.4
4	0.18	0.18
5	0.4	0.4
6	0.5	0.5
7	0.6	0.6
8	0.55	0.55
9	0.2	0.2
10	0.75	0.75

nd: no digerido

B

Número de clones analizados	10
Números de clones que contienen inserto	10
Porcentaje de recombinantes	100 %
Tamaño medio del inserto	0.65
Rango del tamaño del inserto	0.2 – 1.4

5.1.3. Análisis de la genoteca de expresión de *C. pneumoniae*

Para llevar a cabo el análisis de la genoteca de expresión, 2 ml de la misma se incubaron toda la noche en un medio con selección (ampicilina 100 μ g/ml). Del cultivo

obtenido, se llevó a cabo una extracción de ADN plasmídico, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.1.3.5.2. de material y métodos.

El ARNm inicialmente obtenido para generar la genoteca de expresión, fue aislado de cuerpos elementales, sin embargo, se llevó a cabo un experimento para corroborar la presencia de ADN específico de *C. pneumoniae* en la genoteca obtenida, puesto que inicialmente es común que haya contaminación con células HEP-2 en la muestra de partida. El ADNc obtenido tras la reacción de la transcriptasa inversa es por tanto una mezcla de ADN de HEP-2 y *C. pneumoniae*. Para asegurar la presencia de ADN de *C. pneumoniae* en la genoteca, se llevó a cabo una PCR específica por amplificación de los genes correspondientes a las proteínas OmcB y MOMP. Bandas de 1671 pb y 1170 pb fueron amplificadas, las cuales se ajustaban al tamaño esperado y correspondiente a los genes codificantes de OmcB y MOMP, respectivamente (Figura 5.4.).

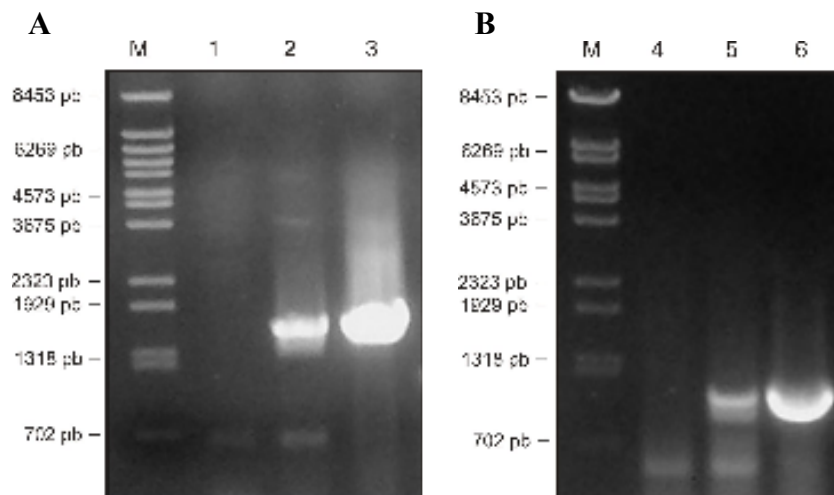


Figura 5.4. Amplificación y detección de ADNc de *C. pneumoniae*. Análisis de los fragmentos amplificados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8%. A. PCR realizada sobre la genoteca de expresión de *C. pneumoniae*, utilizando oligonucleótidos específicos del gen codificante de OmcB de *C. pneumoniae*; calle 1: control negativo para OmcB; calle 2: banda correspondiente a la amplificación del gen codificante de la proteína OmcB; calle 3: control positivo de OmcB. B. PCR realizada sobre la genoteca de expresión de *C. pneumoniae*, utilizando oligonucleótidos específicos del gen codificante de MOMP de *C. pneumoniae*; calle 4: control negativo para MOMP; calle 5: banda correspondiente a la amplificación del gen codificante de la proteína MOMP; calle 6: control positivo de MOMP. M: Marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco911*.

5.1.4. Expresión de la genoteca transferida a pDEST17

La genoteca de expresión fue transformada en la cepa BL21-AI de *E. coli*, la cual contiene una copia lisogénica de la T7 ARN polimerasa bajo el control del promotor *araBAD*, que permite la expresión de la T7 ARN polimerasa cuando se induce con L-

arabinosa. En esta cepa por tanto, se llevó a cabo la expresión de los genes de *C. pneumoniae*, para posteriormente realizar los experimentos de inmunoscreening.

5.2. Inmunoscreening de la genoteca de expresión de *C. pneumoniae*

5.2.1. Estudios preliminares

Para verificar la validez de nuestro sistema de *blotting*, se realizó un inmunoscreening con un monoclonal anti-histidinas. Como control negativo se utilizó BL21-AI transformada con 0,7 µg del plásmido pUC18, el cual no expresa cola de polihistidinas (Figura 5.5.A). Como control positivo se preparó de forma artificial una mezcla de bacterias de expresión, transformadas con una mezcla de pUC18 (0,4 µg) y una construcción plasmídica que contiene insertada una secuencia que codifica 6 histidinas y que expresa la proteína p23 del virus Epstein-Barr (0,2 µg). Esta segunda condición se ajustó para que la representación de las colonias en el inmunoscreening fuese de 1/3 para la construcción p23pET y de 2/3 para el vector pUC18 (Figura 5.5.B).

Igualmente, para determinar expresión de los polipéptidos y/o proteínas recombinantes procedentes de la genoteca de expresión, se incorporó en el experimento una muestra de la genoteca contenida (Figura 5.5.C), puesto que el vector pDEST17 presenta insertada una secuencia que codifica 6 histidinas, localizadas en la región anterior al *polylinker* y que permitirá la fusión de una cola de 6 histidinas al extremo N-terminal de las proteínas producidas. Esto permitirá posteriormente, la purificación de las proteínas de fusión recombinantes mediante el uso de una resina de agarosa cargada con níquel. Por tanto, para llevar a cabo este estudio se transformaron las bacterias BL21-AI con 0,85 µg de ADNc de la genoteca de expresión.

Los ensayos de inmunoscreening se realizaron sobre membranas de nitrocelulosa (NC), tal y como se describe en el apartado 4.9. de material y métodos. Para la inmunodetección se usó como anticuerpo primario un monoclonal anti-histidinas (Roche) a una dilución 1/1500 en solución de bloqueo (Tabla 3.3.). Previamente, se habían realizado experimentos de titulación del monoclonal, donde se estableció esta dilución como la adecuada. Las membranas de NC se incubaron durante 3 h en agitación y posteriormente se pusieron en contacto con el segundo anticuerpo, un anti-IgG de ratón marcado con

peroxidasa (Dako Denmark), durante 1 h, a una dilución 1/2000. Finalmente, se revelaron con TMB. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.5.

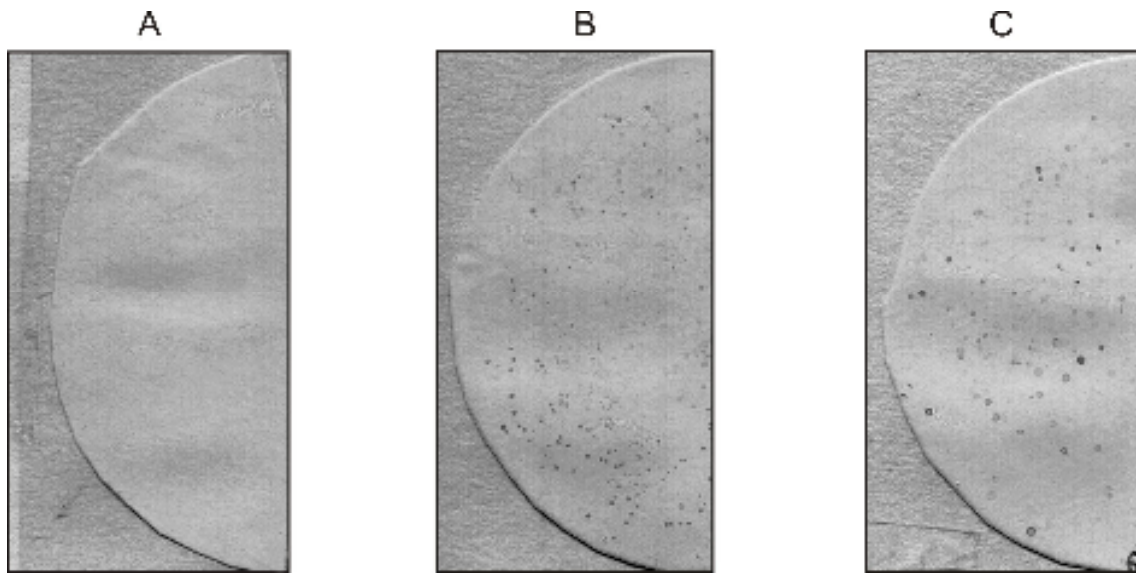


Figura 5.5. Inmunoscreening usando un monoclonal anti-His. A. Clones transformados con pUC18, como control negativo. B. Clones transformados con pUC18 y p23pET, como control positivo. C. Clones de la genoteca que expresan polihistidinas. Las marcas oscuras indican reacción con el monoclonal.

Los resultados fueron los siguientes:

- A) ninguna señal, como se esperaría de pUC18, ya que no expresa ninguna cola de polihistidinas.
- B) Señal en aproximadamente un 63% de las colonias transferidas a la membrana de NC, que correspondería a la expresión de p23pET.
- C) Señal en aproximadamente un 50% de las colonias, en general se obtuvieron marcas de distinta intensidad. Aproximadamente se obtuvieron 221 marcas de un total de 435 colonias analizadas.

Posteriormente, para corroborar que las marcas obtenidas en el control positivo eran específicas para la cola de histidinas, es decir, correspondían al plásmido p23pET (B), se llevó a cabo un análisis de restricción con la enzima *EcoRI* de 3 colonias positivas, 3 colonias negativas (que no mostraban ninguna señal) y 2 controles. Tanto p23pET como pUC18, poseen una diana para *EcoRI*, pero tienen distinto tamaño, por lo que se debe observar los plásmidos linealizados con un tamaño de 2686 pb para pUC18 y de 6189 pb para p23pET. Los resultados se muestran en la figura 5.6.

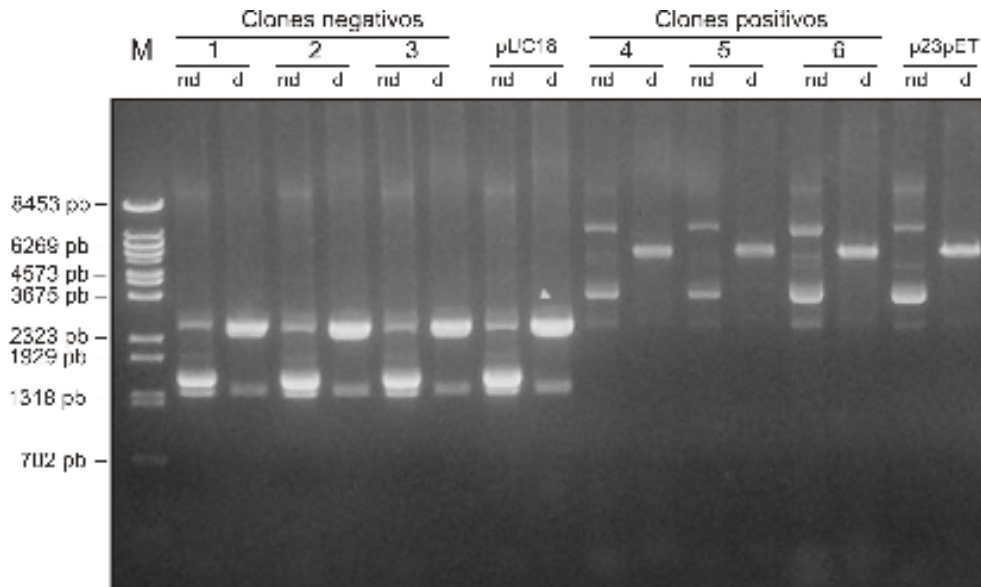


Figura 5.6. Análisis de restricción de clones aislados del control positivo (B) del inmunoscreening anti-His. 1-3: ADN de 3 clones negativos aislados del control positivo del inmunoscreening digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*; 4-6: ADN de 3 clones positivos aislados del control positivo del inmunoscreening digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*; pUC18 y p23PET: Controles digeridos con la enzima de restricción *EcoRI*. Electroforesis realizada con 2 μ l de ADN plasmídico de cada clon y 1 μ l de los controles. Desarrollada en un gel de agarosa del 0,8% teñido con bromuro de etidio. M: marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco91I* para estimar el tamaño de los insertos.

De igual forma se actuó con las colonias positivas obtenidas en el experimento C. Se seleccionaron 8 clones positivos a los que se les realizó un aislamiento de ADN plasmídico para verificar mediante análisis de restricción, con la enzima *Bsp1407I*, que los clones positivos digerían y llevaban inserto (Figura 5.7.). Se digirieron 5 μ l de ADN plasmídico de cada clon y 0,6 μ l del vector pDEST17 como control.

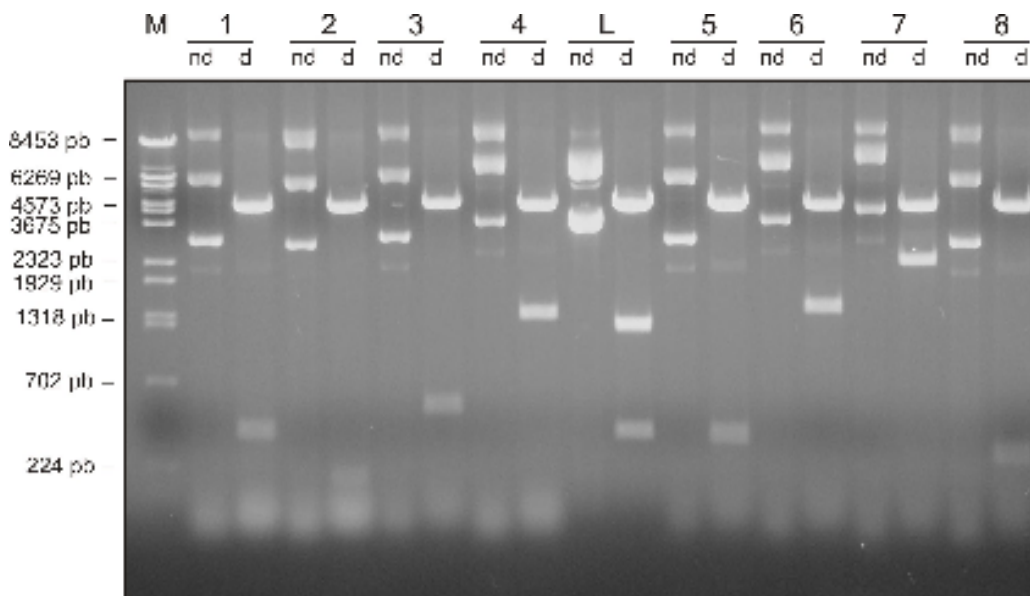


Figura 5.7. Análisis de restricción de clones aislados de la genoteca de *C. pneumoniae* del inmunoscreening anti-His. 1-8: ADN de 8 clones aislados del inmunoscreening anti-His de la genoteca. L: vector pDEST17. Todos los ADN fueron digeridos con la enzima de restricción *Bsp1407I*. Electroforesis realizada con 5 μ l de ADN plasmídico de cada clon y desarrollada en un gel de agarosa del 0,8% teñido con bromuro de etidio. nd: ADN no digerido; d: ADN digerido con la enzima de restricción *Bsp1407I*; M: marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco91I* para estimar el tamaño de los insertos.

Verificada la validez del sistema de *blotting*, el resultado obtenido fue que aproximadamente un 50% de las clones analizados de la genoteca de *C. pneumoniae* estaban expresando proteínas fusionadas a una cola de polihistidinas. Además, el 100% de los clones analizados mediante restricción presentaron inserto (Tabla 5.3.).

Tabla 5.3.

A. Tamaño de los insertos de *C. pneumoniae* procedentes de la genoteca de expresión y digeridos con *Bsp1407I*. B. Porcentaje de recombinantes obtenidos y tamaño medio de los insertos.

A

Clon	Tamaño banda (kb)	Tamaño inserto (kb)
1	0.45	0.45
2	0.2	0.2
3	0.6	0.6
4	1.4	1.4
5	0.45	0.45
6	1.45	1.45
7	2.3	2.3
10	0.3	0.3

B

Número de clones analizados	8
Números de clones que contienen inserto	8
Porcentaje de recombinantes	100 %
Tamaño medio del inserto	0.89
Rango del tamaño del inserto	0.2 – 2.3

nd: no digerido

5.2.2. Inmunoscreening propiamente dicho de la genoteca de expresión

A) Sueros de pacientes

Con la finalidad de encontrar recombinantes inmunogénicos de *C. pneumoniae*, se procedió a la búsqueda de sueros de pacientes con un elevado título en anticuerpos anti-*C. pneumoniae*. Tal y como describe Sambrook y Russell (1989), idealmente, un anticuerpo usado para el inmunoscreening debería tener las siguientes características:

- ser policlonal.
- ser absolutamente específico para epítopos lineales, es decir, que estén presentes tanto en las formas nativas como desnaturalizadas de la proteína.
- tener un elevado título.
- ser de la clase IgG.

5.2.2.1. Selección y ajustes de los sueros

Para esta selección, dispusimos de 270 sueros de una población hospitalaria de Zaragoza. Los sueros fueron previamente evaluados y titulados por las técnicas de ELISA e IFI, tal y como se describe posteriormente, en el capítulo 5.5.1. De estos 270 sueros, solo 2 resultaron tener un título ≥ 1024 (sueros: 18.66 y 13.8). Estos 2 sueros fueron por tanto, los seleccionados para realizar el inmunoscreening de la genoteca.

Además, como control negativo, se seleccionó un suero que por ambas técnicas resultó negativo (suero 13.79).

Antes de realizar el screening de la genoteca de expresión, se llevaron a cabo una serie de experimentos para optimizar las condiciones de unión del anticuerpo a las proteínas diana.

El objetivo fue establecer los siguientes puntos:

1. Ausencia de reacciones inespecíficas con otras proteínas expresadas a partir de la genoteca y no pertenecientes a *C. pneumoniae*.
2. Ajustar los tiempos óptimos de inducción e incubación tanto para el anticuerpo primario como secundario.
3. Establecer las soluciones y condiciones de lavado para evitar fondos en las membranas de NC debido a interacciones inespecíficas de los sueros y el anticuerpo secundario utilizados.

Tras realizar una serie de experimentos ajustando todos estos parámetros, se concluyó que:

- 1) La dilución adecuada de los sueros debería estar entre 1/200 y 1/1500.
- 2) Los tiempos de incubación mayores de 3 h, y las inducciones superiores a 4 h, no aportaban mejoras.

- 3) No se conseguían cambios significativos al modificar la solución de lavado, consiguiendo la mejor señal/ruido con la solución de lavado TNT+ 5% de leche en polvo.

A pesar de estos experimentos previos, no se pudo encontrar una dilución que manifestase un alto nivel de reactividad específica con el antígeno, puesto que los sueros reaccionaban fuertemente con antígenos producidos por *E. coli*, para lo que se procedió a la purificación y preabsorción de los sueros.

5.2.2.2. Purificación y preabsorción de los sueros

a) Purificación

Los sueros se purificaron y concentraron mediante cromatografía de afinidad, utilizando un sistema de altas presiones y una resina de Sefarosa-proteína A (Goudswaard y cols., 1978). 2 ml de cada suero (suero 18.66, suero 13.8 y el control negativo suero 13.79) se hicieron pasar a través de una columna de 1 ml de proteína A, a un flujo de 0,5 ml/min, tal y como se describe en el apartado 4.4.2.2.1.2. Se recogieron fracciones de 0,5 ml, las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE y posteriormente, se unieron las que mostraron una mayor concentración de anticuerpo. La figura 5.8. muestra el perfil de uno de los cromatogramas obtenidos y de las fracciones de IgG obtenidas.

b) Preabsorción

Puesto que en la mezcla de anticuerpos policlonales purificada probablemente estábamos aislando también anticuerpos policlonales reactivos frente a antígenos de *E. coli*, y responsables de los falsos positivos, se decidió eliminarlos mediante inmunoabsorción. Para ello, se incubaron los anticuerpos diluidos (1/10) en TNT con membranas de NC cargados con un clarificado de *E. coli*, tal y como se describe en el apartado 4.5. Este proceso se repitió 2 veces para eliminar los anticuerpos anti-*E. coli*.

Tras nuevos screenings, se determinó que un anticuerpo policlonal humano purificado y preabsorbido generaba menos reacciones inespecíficas que uno no purificado

ni preabsorbido, por lo que se utilizaron los anticuerpos así tratados para el inmunoscreening de la genoteca de expresión.

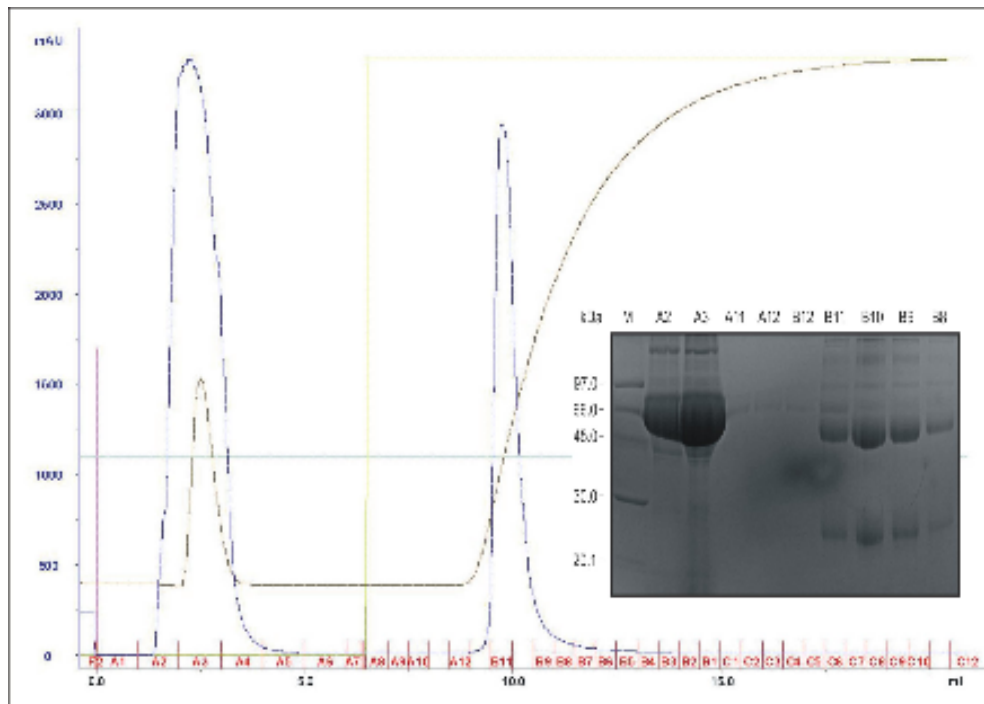


Figura 5.8. Purificación de sueros humanos por cromatografía de afinidad con proteína A. El + columna muestra un pico en las posiciones A2, A3 y A4 que corresponde a la albúmina de suero bovino procedente del suero humano 13.8 y un pico que aparece en las posiciones B12, B11, B10 y B9 que corresponde con las IgGs. La figura incluida muestra las eluciones analizadas en un SDS-PAGE. Línea azul: UV 280 nm; línea verde oscura: flujo; línea marrón: conductividad (mS/cm); línea verde: concentración (% tampón elución); numeración roja: fracciones;

5.2.2.3. Inmunoscreening

Tras sufrir el mismo tratamiento los 3 sueros (2 positivos y 1 negativo), se volvieron a realizar nuevos experimentos para ajustar la dilución adecuada de todos ellos. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados deseados. Gran parte de los clones positivos que se obtuvieron al realizar una dilución 1/500 del anticuerpo policlonal primario, al realizarles el análisis de restricción con la enzima *Bsp1407I*, no presentaron las secuencias dianas que reconoce la enzima, y al realizar Western-blot de estos clones inducidos con el monoclonal anti-histidinas, no mostraron expresión de la cola de polihistidinas, tratándose por tanto de falsos positivos (Figura 5.9.A).

Al utilizar el control negativo a la misma dilución, se observaron clones que también generaban señales intensas (aunque más débiles) y que coincidieron con los falsos positivos de los policlonales anti-*C. pneumoniae* (Figura 5.9.B).

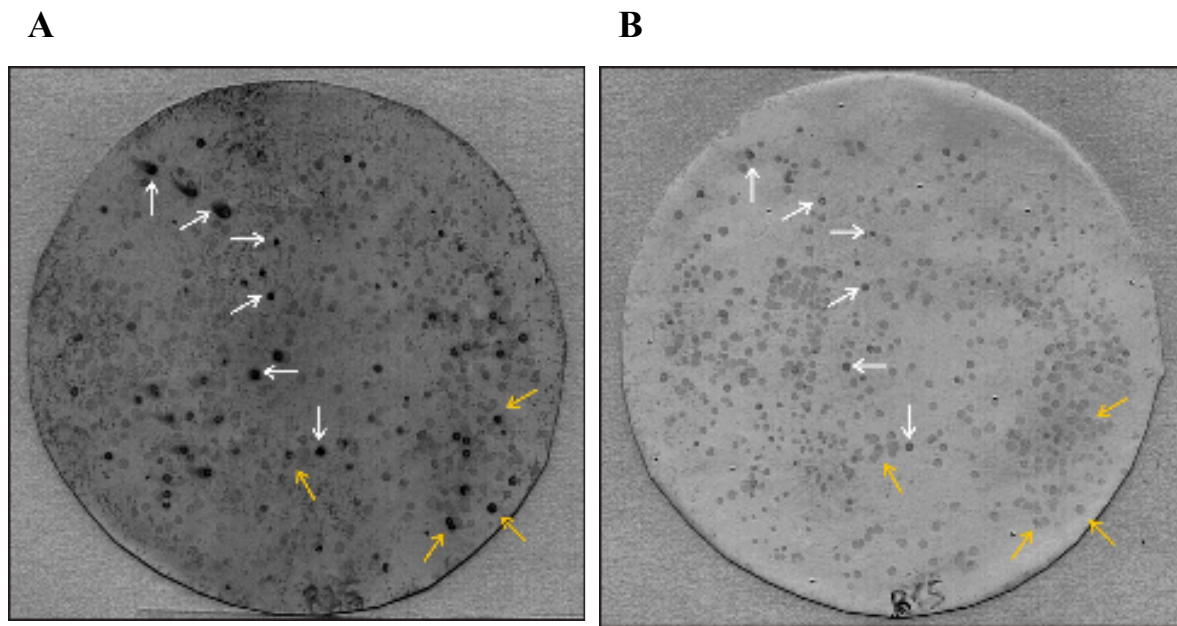


Figura 5.9. Inmunoscreening de BL21-AI transformadas con fragmentos de ADNc procedentes de la genoteca de *C. pneumoniae* en membrana de NC. A. Primera réplica de un inmunoscreening realizado con un anticuerpo policlonal humano anti-*C. pneumoniae*, purificado y preabsorbido. B. Segunda réplica de un inmunoscreening realizado con un anticuerpo policlonal humano sin anticuerpos de *C. pneumoniae*, purificado y preabsorbido. Flechas blancas: falsos positivos; Flechas amarillas: posibles verdaderos positivos.

En este experimento también se obtuvieron clones que generaron una señal intensa al usar los policlonales purificados anti-*C. pneumoniae* y no dieron señales en el control negativo. Estos mismos llevaban inserto al hacer al análisis de restricción (Figura 5.10) e incluso al realizar Western-blot mostraron expresión de las colas de polihistidinas (no se muestran las imágenes), pero se concluyó que estas condiciones no eran las adecuadas para considerar un método fiable de obtención de clones inmunoreactivos.

Se optó por probar cambios en el anticuerpo secundario, un policlonal IgG anti-humano (Sigma). Se hicieron experimentos de screening sin usar el anticuerpo primario y usando diferentes diluciones del anticuerpo secundario para ver los fondos que se generaban. También se probaron diferentes diluyentes del anticuerpo secundario (leche en polvo al 5% y conjugado con BSA al 5%), incluso se preabsorbió el anticuerpo secundario con clarificado de *E. coli*, y con células de *E. coli*. Sin embargo, nuevamente no se pudieron obtener resultados fiables. Para solventar este contratiempo se optó por utilizar un suero de conejo anti-*C. pneumoniae* para llevar a cabo el inmunoscreening de la genoteca de expresión.

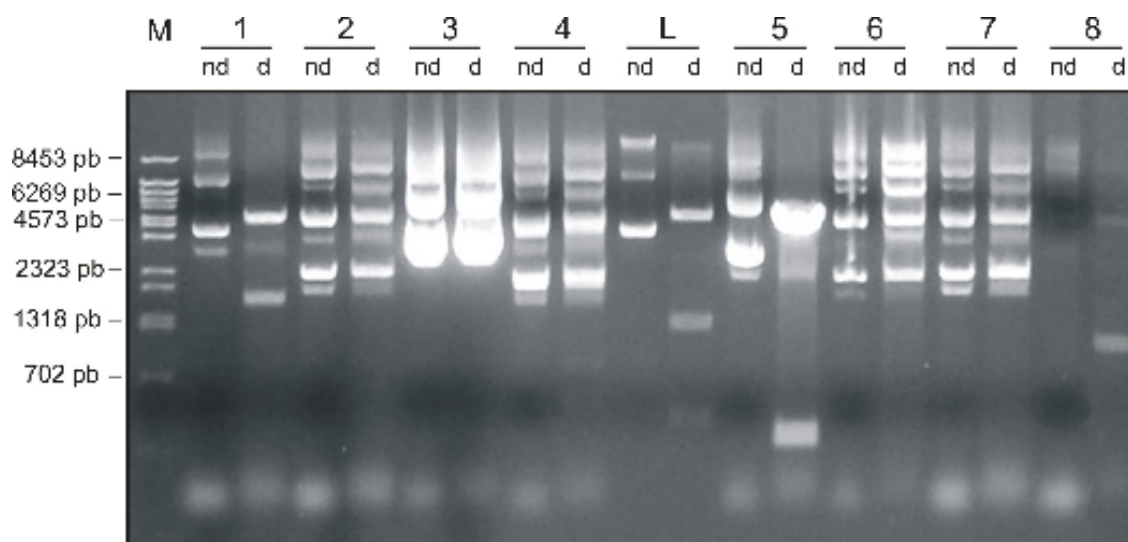


Figura 5.10. Análisis de restricción de clones aislados de la genoteca de *C. pneumoniae* del inmunoscreening con un anticuerpo policlonal humano anti-*C. pneumoniae*. 1-8: ADN de 8 clones aislados. L: vector pDEST17. Digeridos todos con la enzima de restricción *Bsp1407I*. Electroforesis realizada con 5 μ l de ADN plasmídico de cada clon y desarrollada en un gel de agarosa del 0,8% teñido con bromuro de etidio. nd: ADN no digerido; d: ADN digerido con la enzima de restricción *Bsp1407I*; M: marcador de masa molecular obtenido del fago λ digerido con *Eco91I* para estimar el tamaño de los insertos. Los clones 1,5 y 8 contenían las secuencias dianas de la enzima y consecuentemente fueron digeridos.

B) Suero de conejo inmunizado con cuerpos elementales

El suero utilizado procede de un conejo inmunizado con $7,5 \times 10^7$ CEs de *C. pneumoniae*. Experimentos previos fueron realizados para ajustar la dilución adecuada del suero de conejo a usar. Igualmente, se observó que se generaban fondos por interacciones inespecíficas entre los anticuerpos y proteínas de *E. coli*, que impidieron distinguir entre clones positivos y clones negativos (no se muestran las imágenes). Para eliminar los fondos obtenidos, el suero fue purificado y preabsorbido.

5.2.2.4. Purificación y preabsorción del suero de conejo

a) Purificación

El suero de conejo se purificó mediante cromatografía de afinidad, utilizando un sistema de altas presiones con una resina de Sefarosa-proteína A (Goudswaard y cols., 1978). 2 ml del suero se hicieron pasar a través de 1 ml de proteína A, a un flujo de 0,5 ml/min, tal y como se describe en el apartado 4.4.2.2.1.2. y se recogieron fracciones de 0,5 ml.

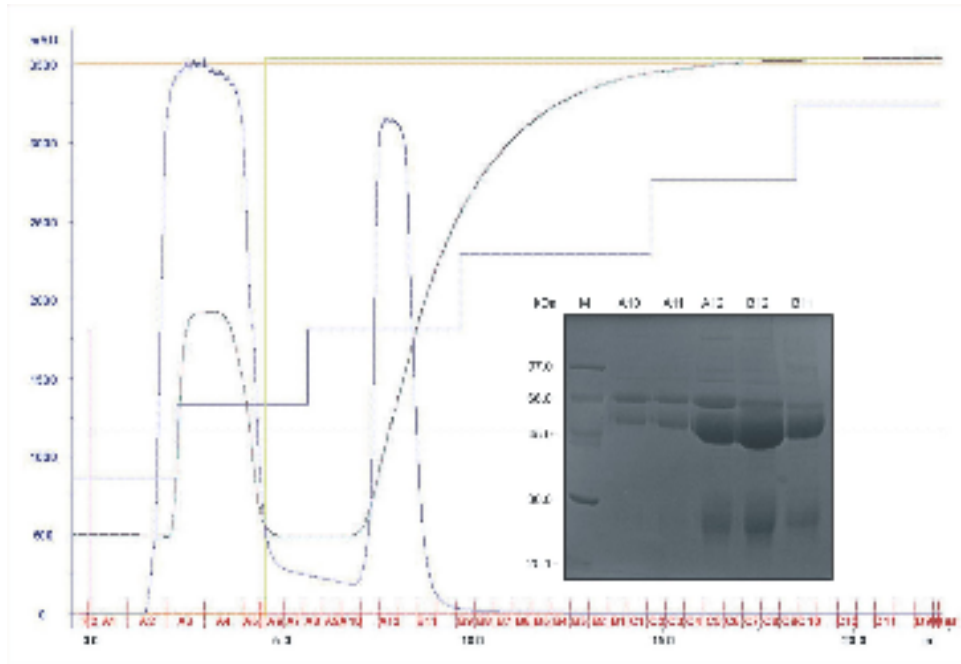


Figura 5.11. Purificación del suero de conejo por cromatografía de afinidad con proteína A. El + columna muestra un pico en las posiciones A2, A3, A4 y A5 que corresponde a la albúmina de suero bovino procedente del suero de conejo y un pico que aparece en las posiciones A12, B12 y B11 que corresponde con las IgGs. La figura incluida muestra las eluciones analizadas en un SDS-PAGE. Línea azul: UV 280 nm; línea azul oscura: conductividad (mS/cm); línea verde: concentración (% tampón elución); línea roja: flujo; numeración roja: fracciones;

La figura 5.11. muestra el perfil del cromatograma obtenido y las fracciones correspondientes a las inmunoglobulinas del suero de conejo. Posteriormente, las fracciones A12, B12 y B11 fueron unidas.

b) Preabsorción

Los anticuerpos policlonales de conejo fueron preabsorbidos con un clarificado de *E. coli* fijado nuevamente a membranas de NC, tal y como se describe en el apartado 4.5. para eliminar anticuerpos inespecíficos. Este proceso se repitió 2 veces.

Además, se realizó una preabsorción adicional con un clarificado de HEp-2 fijado a membranas de NC, puesto que probablemente el policlonal de conejo también debía llevar anticuerpos anti-humanos debido a la inmunización del conejo con CEs contaminados con células HEp-2.

5.2.2.5 Inmunoscreening

Tras nuevos experimentos de dilución del anticuerpo policlonal de conejo, se concluyó que la dilución adecuada para el policlonal de conejo purificado y preabsorbido era de una dilución 1/5000 y una dilución de 1/2000 para el anticuerpo secundario, un policlonal anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Roche), que fueron visualizadas por una reacción con la peroxidasa usando una solución de peróxido de hidrógeno/TMB como sustrato (Neogen Corporation).

Finalmente, se realizó el inmunoscreening tal y como se describe en el apartado 4.9. Se transformaron un total de 8 µg de ADNc en la cepa de expresión BL21-AI. Estos clones fueron plaqueados en 20 membranas de NC, aproximadamente a razón de 200 ufc/ml, obteniendo un total de 4000 colonias. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.12.

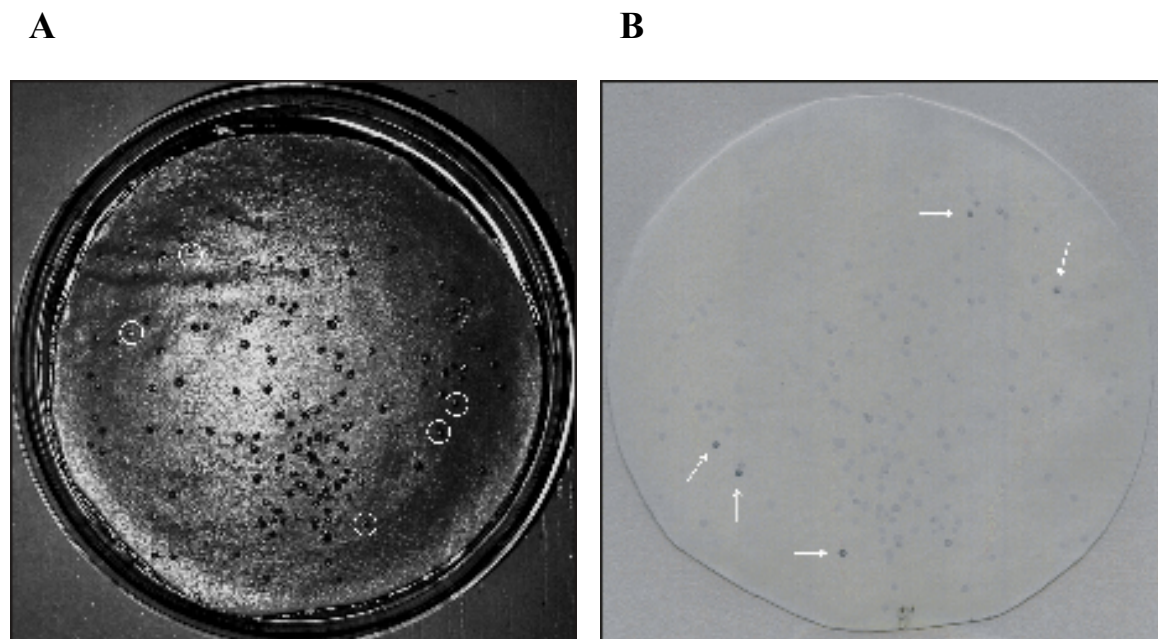


Figura 5.12. Inmunoscreening de BL21-AI transformadas con fragmentos de ADNc procedentes de la genoteca de *C. pneumoniae*. Inmunoscreening realizado con un anticuerpo policlonal de conejo anti-*C. pneumoniae* realizado sobre aproximadamente 4000 clones repartidos en 20 membranas de NC. A: colonias crecidas sobre una membrana de NC dispuesta sobre una placa de LB-Agar, constituye la membrana madre; B: membrana replica.

Tras el screening, se obtuvieron 54 clones inmunopositivos con diferentes señales de intensidad y fueron analizados por Western-blot con un monoclonal frente a la cola de polihistidinas para analizar la producción de proteínas fusionadas a la cola de histidinas en

5. RESULTADOS

su extremo N-terminal. El 83% mostraron una interacción específica con el monoclonal frente a histidinas (Figura 5.13.).

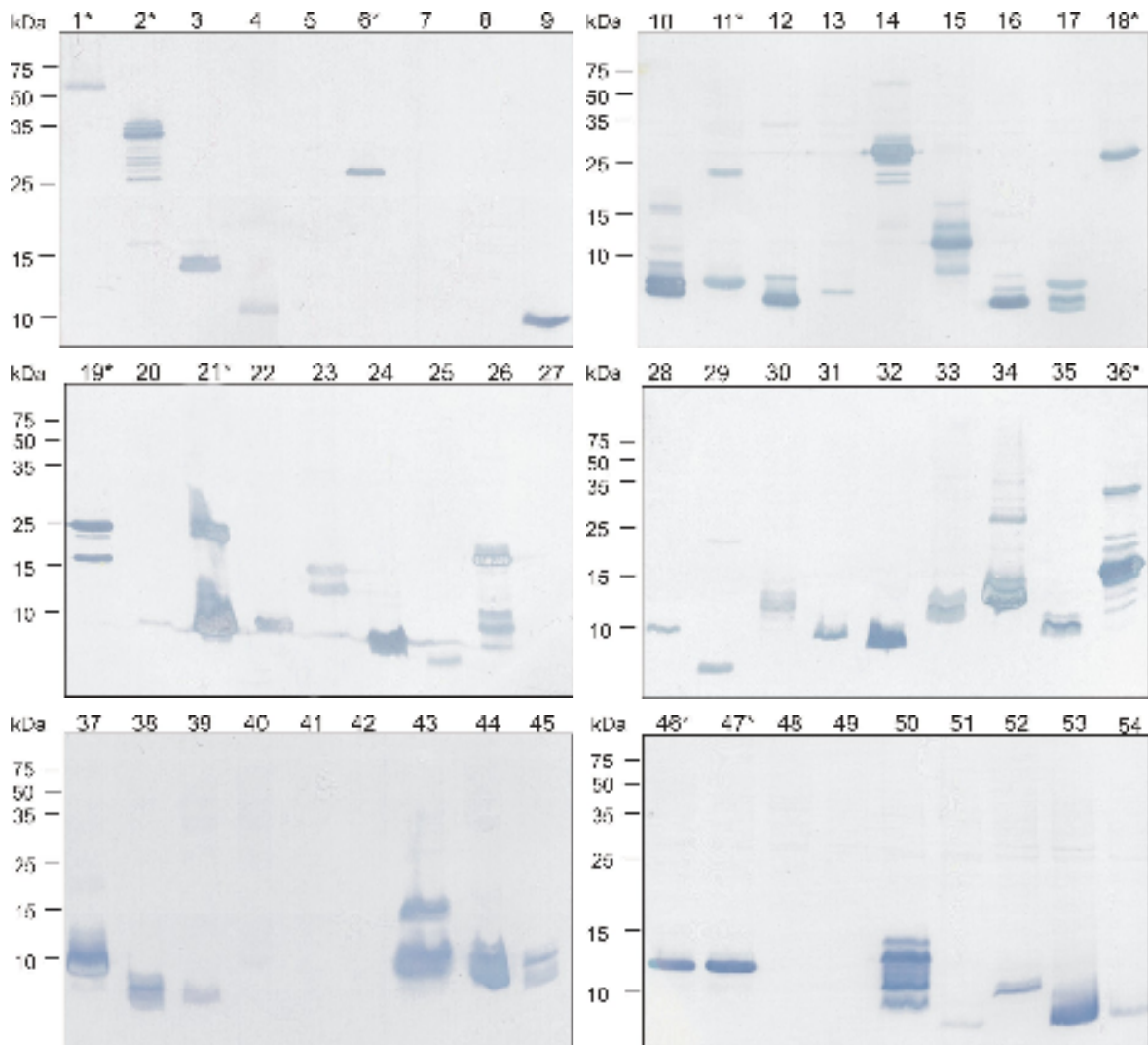


Figura 5.13. Western-blot correspondiente a los clones obtenidos tras realizar el inmunoscreening de la genoteca con el anticuerpo policlonal. 1-54: Clones inmunoreactivos aislados del inmunoscreening realizado con el anticuerpo policlonal de conejo anti-*C. pneumoniae*. Para analizar los clones, se utilizó un anticuerpo monoclonal frente a la cola de polihistidinas. *: Clones secuenciados que contienen una secuencia de nucleótidos perteneciente a *C. pneumoniae*.

Se realizó un análisis de restricción de cada uno de los clones que expresaban la cola de polihistidinas con la enzima *Bsp1407I* para obtener el tamaño de los insertos. Una parte representativa se muestra en la figura 5.14.

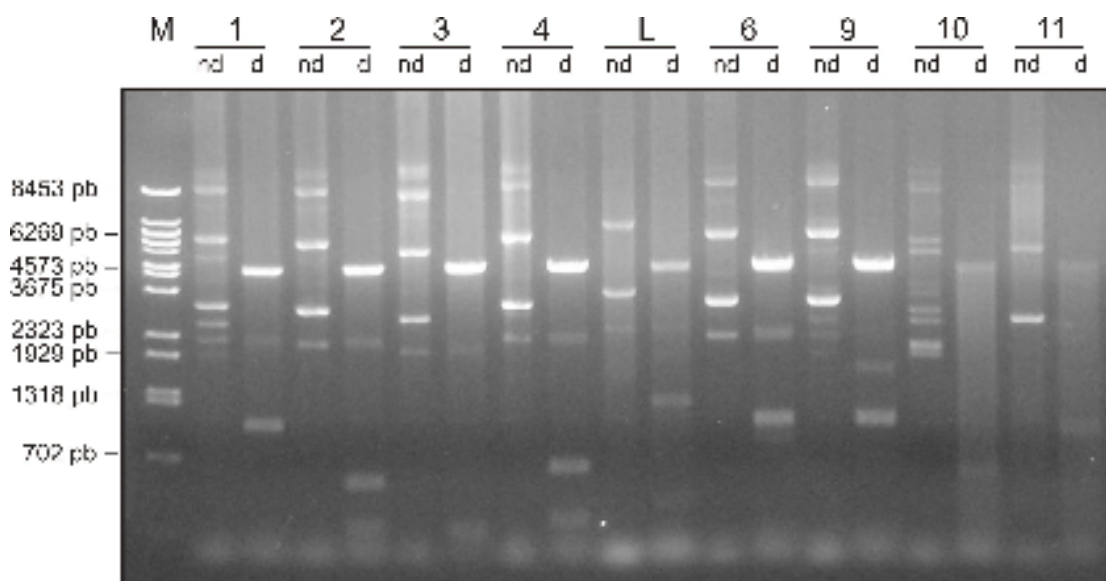


Figura 5.14. Análisis de restricción de clones aislados de la genoteca de *C. pneumoniae* del inmunoscreening con el anticuerpo policlonal de conejo anti-*C. pneumoniae*. 1-11: ADN de 8 clones aislados. L: vector pDEST17. Digeridos todos con la enzima de restricción *Bsp*1407I. Electroforesis realizada con 5 μ l de ADN plasmídico de cada clon y desarrollada en un gel de agarosa del 0,8% teñido con bromuro de etidio. nd: ADN no digerido; d: ADN digerido con la enzima de restricción *Bsp*1407I; M: marcador de masas moleculares obtenido del fago λ digerido con *Eco*91I para estimar el tamaño de los insertos. Todos los clones contenían las secuencias dianas de la enzima y son digeridos.

Los clones que presentaron un tamaño muy pequeño tanto en el inserto clonado de ADN como en la expresión de la proteína recombinante se descartaron del estudio. El resto de los clones fueron secuenciados.

5.3. Identificación bioinformática de las secuencias de *C. pneumoniae*

Los insertos de ADNc contenidos en 23 clones inmunoreactivos que expresaban la cola de histidinas fueron secuenciados utilizando los cebadores de la T7 ARN polimerasa “promotor” y “terminador”, en el Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC). Las secuencias obtenidas fueron analizadas en las bases de datos GenBank, mediante el programa BLAST, analizando la localización de las secuencias y las posibles homologías en secuencias previamente descritas.

La búsqueda de las secuencias de los clones recombinantes inmunoreactivos dio como resultado la identificación de 13 clones positivos de *C. pneumoniae*. Otros 10 clones resultaron ser falsos positivos, por expresar proteínas humanas y fueron descartados. De estos 13 clones: 3 resultaron no tener la secuencia de *C. pneumoniae* en fase con la cola de polihistidinas, por lo que también se descartaron. El resto se encontraba en fase y eran

secuencias específicas de *C. pneumoniae*. Los resultados obtenidos para estos 10 clones positivos se muestran en la tabla 5.4.

5.4. Purificación de las proteínas/polipéptidos recombinantes inmunoreactivos

De los 10 clones positivos se seleccionaron 6 para sobreexpresar y purificar las proteínas o los polipéptidos recombinantes resultantes. Posteriormente, estos fueron utilizados como antígenos en ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos de *C. pneumoniae* en las muestras de sueros humanos disponibles. Estos fueron los clones: 1, 2, 18, 19, 21 y 36.

Tabla 5.4. Resultados obtenidos mediante el análisis con el programa BLAST de los clones de *C. pneumoniae* secuenciados que expresan proteínas recombinantes inmunoreactivas con secuencias obtenidas de la base de datos de secuencias nucleotídicas de Genbank. Descripción de los clones basados en la cepa CLW029 de *C. pneumoniae*

Clon (Fig.5.13)	Masa molecular proteína (kDa)	Proteína identificada (desde base de datos)	Región clonada	Gen	pI teórico	Numero de acceso
1	52	DNA topoisomerase I	431-769 aa	<i>topA</i>	8,09	AAD18907.1
2	30	Excinuclease ABC subunit C	226-488 aa	<i>uvrC</i>	9,12	AAD19078.1
6	25	L16 ribosomal protein	ORF completo	<i>r16</i>	10,52	AAD18779.1
11	11,9	Glucosa-1-P- Adenyltransferase	357-441 aa	<i>glgC</i>	8,43	AAD18746.1
18	27,8	GTPase/GTP- binding protein	272-482 aa	<i>yphC</i>	9,81	AAD18982.1
19	24,1	ABC ATPase dipeptide transporter	62-245 aa	<i>dppF2</i>	9,49	AAD18822.1
21	10,2	Small protein B	86-151 aa	<i>smpB</i>	10,22	AAD18486.1
36	18,1	LtuB protein	ORF completo	<i>ltuB</i>	10,13	AAD18482.1
46	12,7	L27 ribosomal protein	ORF completo	<i>r127</i>	10,67	AAD.18685.1
47	12,7	L27 ribosomal protein	ORF completo	<i>r127</i>	10,67	AAD.18685.1

pI:punto isoeléctrico.

El ADN plasmídico de estos 6 recombinantes se utilizó para transformar en BL21-AI. Estos clones fueron crecidos e inducidos tal y como se describe en el apartado 4.1.3.2. de material y métodos. Un análisis SDS-PAGE de los cultivos inducidos con IPTG mostró la producción de proteínas heterólogas, las cuales no estaban presentes en los cultivos no inducidos (Figura 5.15).

En la figura 5.15. se muestra que todos los clones con excepción del correspondiente a la topoisomerasa presentaban una clara expresión en presencia del inductor. Para asegurarnos de la expresión del clon 1, se llevó a cabo un Western-blot de cultivos en presencia y ausencia de inductor, utilizando un monoclonal frente a la cola de histidinas (Figura 5.16).

Los pellets resuspendidos fueron lisados a través de la prensa de French y centrifugados a 40.695 g/30 min/4° C. Los extractos así clarificados, fueron filtrados a través de filtros de 0,22 μ m y caracterizados en función de pH y conductividad. Los puntos isoeléctricos teóricos de los recombinantes, se calcularon con el programa ProtParam (www.expasy.ch/tools/protparam.html).

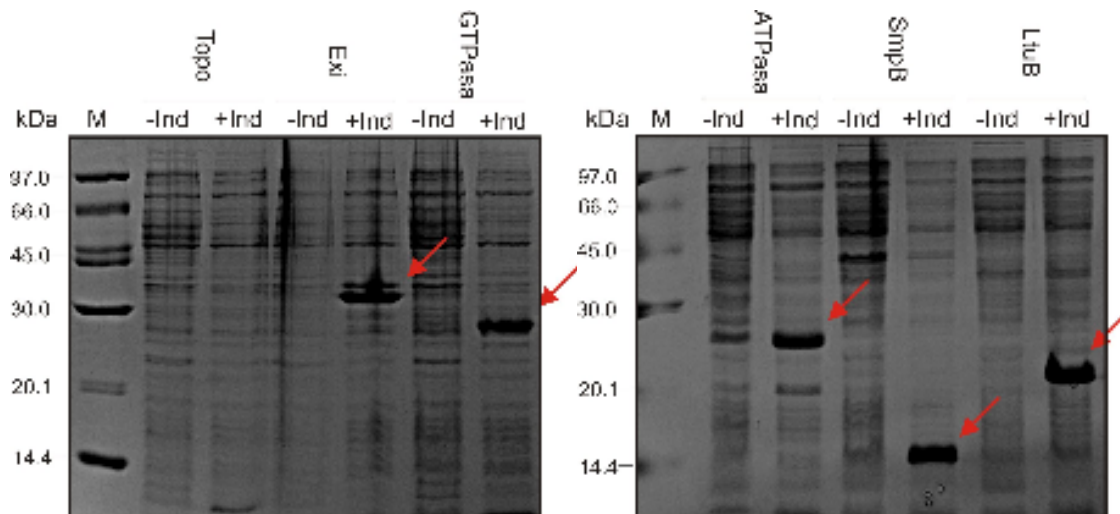


Figura 5.15. Análisis de la expresión de los 6 clones escogidos mediante inmunoscreening por SDS-PAGE. Electroforesis desarrollada en un gel de acrilamida al 15%, realizada con 15 μ l de extractos lisados de los clones: no inducidos (-Ind) e inducidos con IPTG 1 mM y L-arabinosa 0,2 % (+Ind).

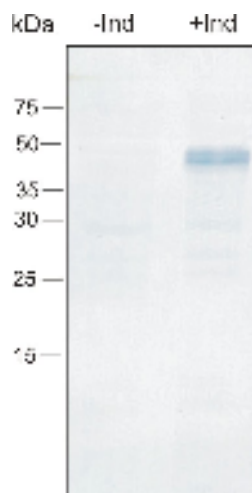


Figura 5.16. Análisis de la expresión por Western-blot del recombinante topoisomerasa (clon 1) obtenido mediante inmunoscreening. Electroforesis en un gel de acrilamida al 15%, realizada con 15 μ l del extracto lisado del clon 1: no inducido (-Ind) e inducido con IPTG 1 mM y L-arabinosa 0,2 % (+Ind). El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa e inmunodetectado usando un monoclonal anti-histidinas.

En los experimentos preliminares realizados para llevar a cabo la purificación de algunos de estos polipéptidos recombinantes, se encontró que todos los polipéptidos mostraron un carácter muy insoluble, por lo que se tuvieron que purificar en condiciones desnaturalizantes, en presencia de urea 8 M.

5.4.1. Exinucleasa ABC subunidad C

Este proceso de purificación constó de dos pasos:

- 1- Preparación del extracto clarificado.
- 2- Cromatografía de afinidad mediante resina de Ni²⁺.

1- Obtenido el pellet bacteriano de este recombinante, se resuspendió a razón de 4 ml/g con el tampón de lisis y equilibrado de la resina a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1% y NaCl 10 mM) y se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Se homogeneizó, se lisó mediante la prensa de French a 1000 PSI y finalmente se centrifugó a 40.695 g/30 min/4° C. El sobrenadante clarificado se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 µm.

2- La resina Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE HealthCare) fue lavada con 1 volumen de columna (CV) de agua estéril para eliminar el tampón de almacenamiento de la resina y se equilibró con 20 CV del tampón de lisis.

La purificación fue desarrollada en *batch*, es decir, sin empaquetar la resina. El sobrenadante clarificado y filtrado se puso en contacto con 200 µl de resina de Ni²⁺. Tras la absorción de la proteína, la resina fue lavada con 10 CV del tampón de equilibrado a pH 8,4. Se volvió a lavar con 10 CV de tampón de lavado (tampón de equilibrado + imidazol 10 mM). La proteína recombinante fue eluida, tras dejar ½ hora la resina con el tampón de elución. El volumen usado fue el correspondiente a 1 CV de tampón de elución a pH 8,5 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, imidazol 250 mM). Tras eluir la primera alícuota, se obtuvieron 4 CV adicionales separados en alícuotas de 1 CV y se unieron las fracciones donde se obtuvo mayor concentración de la proteína sobreproducida (Figura 5.17).

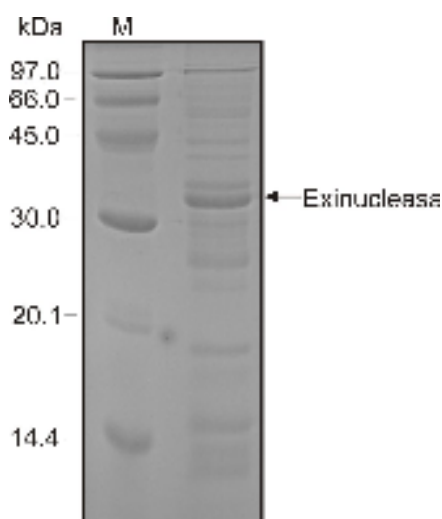


Figura 5.17. Recombinante exinucleasa purificado. Análisis en SDS-PAGE al 12% de la exinucleasa recombinante parcialmente purificada. Se cargaron en el gel 20 μ l de la solución proteica.

5.4.2. ADN Topoisomerasa I

Esta purificación se realizó en tres pasos:

- 1- Preparación del extracto clarificado.
- 2- Captura mediante cromatografía de intercambio iónico (IEX): capto Q.
- 3- Cromatografía de afinidad mediante resina de Ni^{2+} .

En este caso, la proteína resultó ser bastante insoluble, con lo cual de nuevo se procedió a la purificación de la misma en condiciones desnaturizantes. Tras la obtención del extracto clarificado se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico como captura y la purificación propiamente dicha se llevo a cabo mediante una cromatografía de afinidad por unión al Ni^{2+} .

1- El pellet bacteriano se resuspendió a razón de 4 ml/g con el tampón de lisis y equilibrado de la resina a pH 8,7 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1% y NaCl 10 mM), se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Se homogeneizó y se lisó usando la prensa de French. El extracto se pasó 2 veces a una presión de 1000 PSI y se centrifugó a 40.695 g/30 min/4° C. Se ajustó el pH del clarificado a 8,7 y se midió su conductividad (7,5 mS/cm). Finalmente, se hizo pasar por un filtro de 0,45 μ m.

2- La captura se realizó con 1 ml de resina Capto Q (GE HealthCare) en una columna de 5 x 1,5 cm (h x Ø) con un flujo de 6 ml/h. Previamente, la resina fue activada con 2 CV de NaCl 1 M, se lavó con 2 CV de agua estéril y por último se equilibró con 20 CV de tampón de equilibrado a pH 8,7 y conductividad < 10 mS/cm. La adsorción de la proteína en la resina se llevó a cabo en *batch*, durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente, fue empaquetada y lavada con 10 CV del mismo tampón. Para las eluciones, se utilizaron 5 CV del tampón de elución a pH 8,7 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%, NaCl 1 M) dejando ½ h la resina empaquetada con el tampón de elución. Tras analizar las eluciones mediante SDS-PAGE, se unieron las más concentradas.

Como se muestra en la figura 5.15, esta proteína no se visualizó claramente en un SDS-PAGE. Por esta razón, se realizó un Western-blot (Figura 5.16), usando un monoclonal frente a cola de histidinas, el cual permitió la monitorización del proceso de purificación como se muestra en la figura 5.18.A

El extracto clarificado se hizo pasar hasta 4 veces a través de la resina Capto Q, hasta capturar prácticamente toda la proteína recombinante. Cada uno de los ciclos obtenidos de la Capto Q, pasaron directamente y de forma independiente a la siguiente unidad operativa.

3- En el siguiente paso de purificación, se llevó a cabo una cromatografía de afinidad, usando una resina de Ni²⁺. Cada ciclo de la columna de Ni²⁺ se hizo a partir de un ciclo procedente del proceso previo de captura.

Se preparó una columna de 5 x 1,5 cm (h x Ø) con 1 ml de resina, que previamente se lavó y equilibró con 20 CV del tampón de equilibrado a pH 8,7 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%). Antes de poner en contacto la resina con las eluciones procedentes de los 4 ciclos de la captura, se ajustó el pH de las eluciones a 8,5. Una vez absorbida la proteína, lo cual se hizo en *batch*, durante 1 h a temperatura ambiente, se empaquetó y se realizó un lavado con 5 CV utilizando el tampón de lavado a pH 8,6 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%, imidazol 10 mM). Una vez lavada la resina, se volvió a cargar con otro ciclo de la capto Q. Finalmente, la desorción se realizó con el tampón de elución a pH 8,6 y en presencia de una concentración 250 mM de imidazol (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%, imidazol 250 mM).

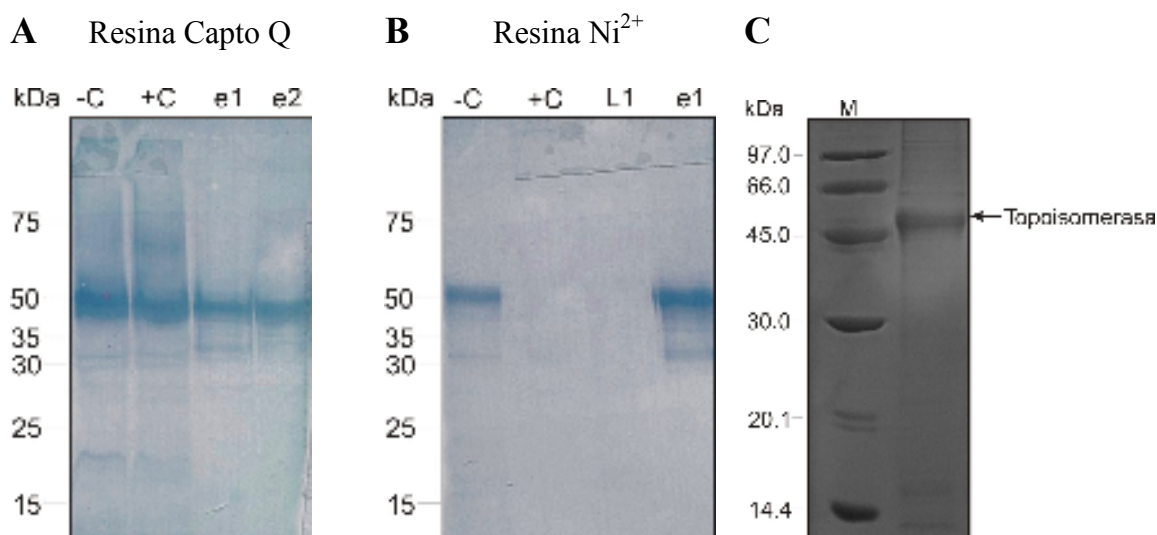


Figura 5.18. A. Western-blot del proceso de purificación con resina Captod Q. Western-blot realizado con un monoclonal de histidinas. -C: sobrenadante clarificado antes pasar por la columna con la resina Captod Q; +C: sobrenadante clarificado después de pasar por la columna con la resina Captod Q; e1: 1^a elución correspondiente al 1^{er} ciclo; e2: 2^a elución correspondiente al 1^{er} ciclo.

B. Western-blot del proceso de purificación con resina de Ni²⁺. Western-blot realizado con un monoclonal de histidinas. -C: sobrenadante clarificado antes pasar por la columna con la resina de Ni²⁺; +C: sobrenadante clarificado después de pasar por la columna con la resina de Ni²⁺; L5: 5^{to} lavado de la resina; e1: 1^a elución. Correspondiente al 4 ciclo.

C. Recombinante topoisomerasa purificado. Electroforesis realizada con 20 μ l de la solución proteica obtenida tras el proceso de purificación desarrollada en un SDS-PAGE al 12%. La proteína purificada presenta un tamaño de 52 kDa que coincide con la masa molecular deducida para la proteína producida por expresión del inserto del clon 1.

Este proceso permitió obtener la proteína altamente purificada. Se obtuvo una sola banda como se muestra en la Figura 5.18. C.

5.4.3. GTPasa

En este caso la purificación constó de dos pasos:

- 1- Preparación del extracto clarificado.
- 2- Cromatografía de afinidad mediante resina de Ni²⁺.

Nuevamente, la proteína a purificar resultó ser insoluble, por lo que se trató en condiciones desnaturalizantes.

1- El pellet bacteriano de este recombinante tras su lisis se resuspendió a razón de 4 ml/g con el tampón de lisis y equilibrado, también en condiciones desnaturalizantes, a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, imidazol 10 mM y NaCl 10 mM) y se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en agitación para favorecer la

solubilización del pellet obtenido. Se homogenizó, se lisó mediante la prensa de French a 1000 PSI y finalmente se centrifugó. El sobrenadante clarificado se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 μm .

2- Antes de poner en contacto la resina con el clarificado, ésta (Ni-Sepharose 6 Fast Flow, GE HealthCare) fue previamente preparada, para ello se lavó con 1 CV de agua estéril y posteriormente se equilibró con 20 CV del tampón de lisis a pH 8,4.

El sobrenadante clarificado filtrado se puso en contacto con 200 μl de resina de Ni^{2+} y la purificación se desarrolló en *batch*, durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Tras la adsorción de la proteína, la resina se empaquetó y fue lavada con 10 CV del tampón de equilibrado a pH 8,4. La desorción del recombinante se realizó con el tampón de elución a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%) e imidazol 250 mM dejando $\frac{1}{2}$ hora la resina en contacto con 1 CV del tampón de elución. Tras eluir la primera alícuota, se prosiguió con otros 4 CV adicionales, directamente separadas en alícuotas de 1 CV cada una. Este proceso se repitió en un 2º ciclo, uniéndose posteriormente las eluciones que mayor concentración mostraron de la proteína de interés, al analizarlas en SDS-PAGE. La proteína ya purificada se muestra en la figura 5.19.

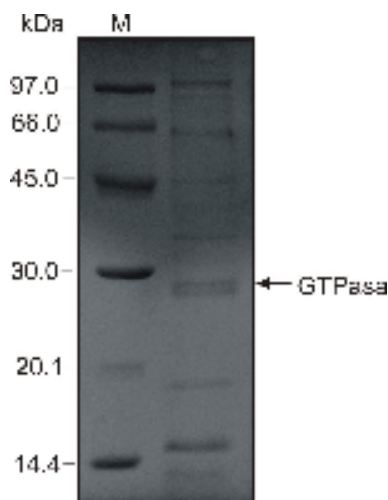


Figura 5.19. Recombinante GTPasa purificado. Análisis en SDS-PAGE al 12% de la GTPasa recombinante parcialmente purificada. Se cargaron en el gel 20 μl de la solución proteica.

5.4.4. Transportador de dipéptidos ABC de la ATPasa

El proceso de purificación de este recombinante se realizó en dos pasos y en condiciones desnaturizante por ser de nuevo una proteína insoluble:

- 1- Preparación del extracto clarificado.
- 2- Cromatografía de afinidad mediante resina de Ni²⁺.

1- Obtenido el pellet bacteriano de este recombinante se resuspendió a razón de 4 ml/g con el tampón de lisis y equilibrado a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, imidazol 10 mM) y se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Se homogenizó, se lisó mediante la prensa de French a 1000 PSI y finalmente se centrifugó a 40.695 g/30 min/4° C. Aunque gran parte del recombinante quedó en el pellet, una parte si se solubilizó, apareciendo en el sobrenadante. Se continuó trabajando con el sobrenadante que se hizo pasar a través de un filtro de 0,45 µm.

2- La cromatografía de afinidad se realizó con una resina de Ni²⁺ (Ni-Sepharose 6 Fast Flow, GE HealthCare) la cual se lavó con 1 CV de agua destilada y posteriormente fue equilibrada con 20 CV del tampón utilizado para la lisis del pellet.

La purificación fue desarrollada en *batch*, 1 h a temperatura ambiente en agitación. El sobrenadante clarificado filtrado se puso en contacto con 200 µl de resina de Ni²⁺. Realizada la adsorción de la proteína, la resina se empaquetó y lavó con 10 CV del tampón de equilibrado. Finalmente, la desorción se realizó aplicando el tampón de elución a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%) e imidazol 250 mM, dejando ½ hora la resina en contacto con 1 CV del tampón de elución. Tras eluir la primera alícuota, se obtuvieron las siguientes eluciones, haciendo salir 4 CV adicionales directamente separadas en fracciones de 1 CV cada una. Finalmente, se unieron las eluciones que mayor concentración mostraron tras analizar la proteína de interés en SDS-PAGE. La proteína así purificada se muestra en la figura 5.20.

Para la determinación de la concentración a partir de la absorbancia a 280 nm, se utilizó el coeficiente de extinción molar teórico para cada proteína recombinante.

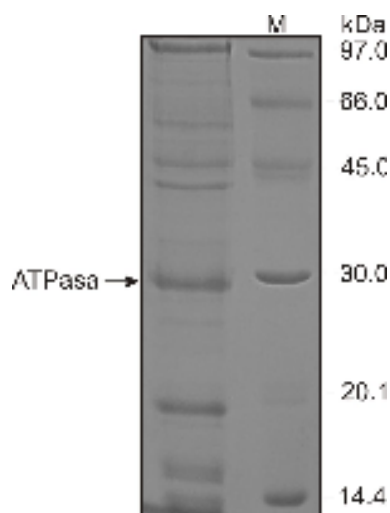


Figura 5.20. Recombinante ATPasa purificado. Análisis en SDS-PAGE al 12% de la ATPasa recombinante parcialmente purificada. Se cargaron en el gel 20 μ l de la solución proteica.

5.4.5. Small protein B

Teniendo en cuenta que el punto isoeléctrico teórico de este recombinante es de 10,22, se utilizó una estrategia de purificación diferente, con tres pasos:

- 1- Preparación del extracto clarificado.
- 2- Cromatografía de afinidad mediante resina de Ni^{2+} .
- 3- Refinado mediante cromatografía de intercambio catiónico.

Al igual que en los casos anteriores, la proteína que se purificó resultó ser bastante insoluble. Tras la solubilización del pellet, se utilizó primero una cromatografía de afinidad y posteriormente para la concentración y refinado de la purificación de la misma, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico.

1- El pellet bacteriano se resuspendió a razón de 4 ml/g con un tampón de lisis y equilibrado a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, NaCl 10 mM), el cual se solubilizó durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Seguidamente, se homogenizó, lisó mediante prensa de French a 1000 PSI y centrifugó a 40.695 g/30 min/4° C. Se corrigió el pH del sobrenadante a pH 8,3 y el sobrenadante ya clarificado se pasó por un filtro de diámetro de poro de 0,45 μ m.

2- La cromatografía de afinidad se realizó con una resina de Ni^{2+} (Ni-Sepharose 6 Fast Flow, GE HealthCare). Esta resina se lavó con 1 CV de agua destilada estéril y se

equilibró con 20 CV del tampón de equilibrado anteriormente utilizado, el cual se controló respecto al pH y la conductividad (<10 mS/cm). La adsorción se realizó en *batch*, durante 1 h a temperatura ambiente en agitación con 200 µl de la resina. La resina se empaquetó y se lavó con 10 CV del tampón de equilibrado a pH 8,4. Finalmente, la desorción se realizó con el tampón de elución a pH 8,4 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, NaCl 10 mM) e imidazol 250 mM, presentando una conductividad de 7,7 mS/cm. Para ello, se mantuvo 1 CV de tampón de elución ½ h en contacto con la resina. Seguidamente, se hicieron pasar a través de la resina 4 CV, recogiendo directamente las siguientes eluciones en alícuotas de 1 CV cada una. Las eluciones se analizaron en un SDS-PAGE (Figura 5.21.), uniéndose las eluciones que mayor concentración mostraron respecto a la proteína de interés.

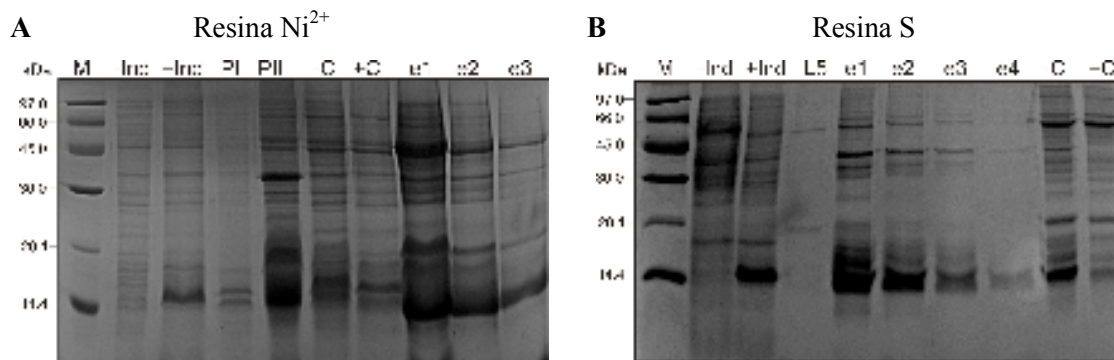


Figura 5.21. Purificación del recombinante Small protein B.

A. Electroforesis SDS-PAGE del proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad con resina de Ni^{2+} . M: marcador de masas moleculares; -Ind: extracto lisado no inducido; +Ind: extracto lisado inducido con IPTG 1 mM y L-arabinosa 0,2 %; PI: pellet I; PII: pellet II; -C: sobrenadante clarificado antes de pasar por la resina de Ni^{2+} ; +C: sobrenadante clarificado después de pasar por la resina de Ni^{2+} ; e1, e2 y e3: eluciones de la resina de Ni^{2+} .

B. Electroforesis SDS-PAGE del proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad con resina S. M: marcador de masas moleculares; -Ind: extracto lisado no inducido; +Ind: extracto lisado inducido con IPTG 1 mM y L-arabinosa 0,2 %; L5: lavado 5; e1, e2, e3 y e4: eluciones de la resina S; -C: sobrenadante clarificado antes de pasar por la resina S; +C: sobrenadante clarificado después de pasar por la resina S.

3- Para concentrar y refinar la purificación del recombinante, se utilizaron 200 µl de una resina S (Macro-Prep, High S Support, Bio-Rad). Esta resina antes de utilizarse fue activada, por lo tanto, tras lavar con 1 CV de agua estéril, se activó pasándole 2 CV de NaCl 1 M. Posteriormente, se volvió a lavar y se equilibró con 20 CV del tampón de equilibrado a pH 8,5 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, imidazol 250 mM). Antes de poner en contacto con la resina, se midió la conductividad del tampón, ya que este valor es absolutamente crítico para que se de interacción con la resina de intercambio catiónico. Su conductividad fue de 4,95 mS/cm.

Antes de incorporar el total de eluciones procedente de la cromatografía de afinidad, se ajustó el pH a 8,8, presentando entonces una conductividad de 5,49 mS/cm. Posteriormente, se mantuvo esta mezcla en contacto con la resina durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Una vez adsorbida la proteína, se realizaron 5 lavados de 1 CV cada uno con el tampón de equilibrado. Las fracciones de elución fueron de 1 CV con el tampón de elución a pH 8,9 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulgén 0,1%, NaCl 1 M) e imidazol 250 mM, dejando ½ hora la resina con 1 CV del tampón de elución. Tras esta elución, se obtuvieron las siguientes recogiendo 4 CV adicionales directamente en alícuotas de 1 CV cada una. Se unieron las eluciones que mayor concentración mostraron tras analizarlas en SDS-PAGE. La proteína así purificada se muestra en la figura 5.22.

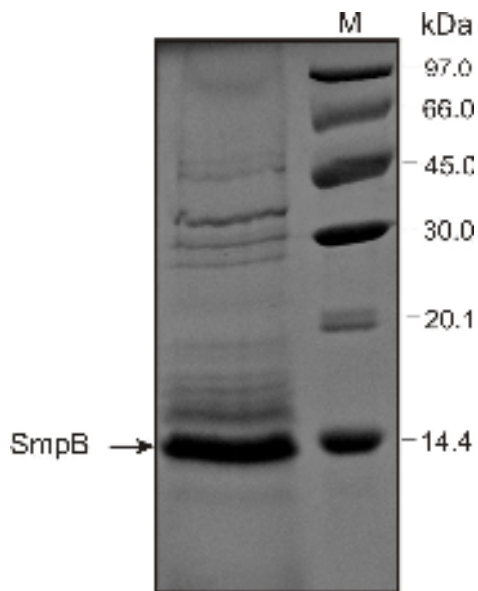


Figura 5.22. Recombinante Small protein B purificado. Análisis en SDS-PAGE al 20% de la Small protein B recombinante parcialmente purificada. Se cargaron en el gel 20 μ l de la solución proteica.

5.4.6. LtuB

Igual que en el caso anterior, la proteína presentó un elevado punto isoeléctrico teórico, 10,13, por lo que se utilizó una estrategia de purificación similar a la anterior, con una cromatografía de intercambio iónico. Los pasos realizados fueron los siguientes:

- 1- Preparación del extracto clarificado.
- 2- Captura mediante cromatografía de intercambio catiónico.
- 3- Cromatografía de afinidad mediante resina de Ni^{2+} .

1- Este recombinante se encontró en mayor concentración en los cuerpos de inclusión. El pellet bacteriano se resuspendió a razón de 4 ml/g con el tampón de lisis y equilibrado a pH 8,9 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%, NaCl 10 mM) y con una conductividad de 5,9 mS/cm. Se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en agitación, posteriormente se homogenizó, se lisó mediante prensa de French a 1000 PSI y centrifugó a 40.695 g/30 min/4° C. Se ajustó su pH a 9,0, se midió la conductividad, que fue de 6,37 mS/cm y finalmente se filtró con un diámetro de poro de 0,45 µm.

2- La captura se realizó con 200 µl de resina S (Macro-Prep, High S Support, Bio-Rad), que se activó con 2 CV de NaCl 1 M después de lavarla y se equilibró con 20 CV del tampón de equilibrado. La adsorción se realizó en *batch*, durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Se empaquetó posteriormente y se lavó con 5 CV del mismo tampón usado anteriormente. Finalmente, se eluyó con un tampón a pH 8,0 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%, NaCl 1 M). Las eluciones de mayor concentración, tras analizarlas en una electroforesis SDS-PAGE, se juntaron para pasarlas a la siguiente unidad operativa.

3- La resina de Ni²⁺ (Ni-Sepharose 6 Fast Flow, GE HealthCare) se lavó con 1 CV de agua estéril y posteriormente fue equilibrada con 20 CV del tampón de elución de la resina S. Las eluciones estuvieron en contacto con la resina durante 1 h a temperatura ambiente en agitación para favorecer la adsorción de la proteína. Los lavados se realizaron con 5 CV del tampón de elución de la resina S a pH 8,0. Las eluciones se realizaron con el tampón de elución a pH 8,0 (fosfato sódico 50 mM pH 8, urea 8 M, emulfogén 0,1%, NaCl 1 M) e imidazol 250 mM (Figura 5.23.), dejando ½ hora la resina con 1 CV del tampón de elución. Tras eluir la primera alícuota, se obtuvieron las siguientes eluciones, haciendo salir 4 CV adicionales directamente en alícuotas de 1 CV cada una. Finalmente, se unieron las eluciones que mayor concentración mostraron tras analizarlas en SDS-PAGE (Figura 5.24.)

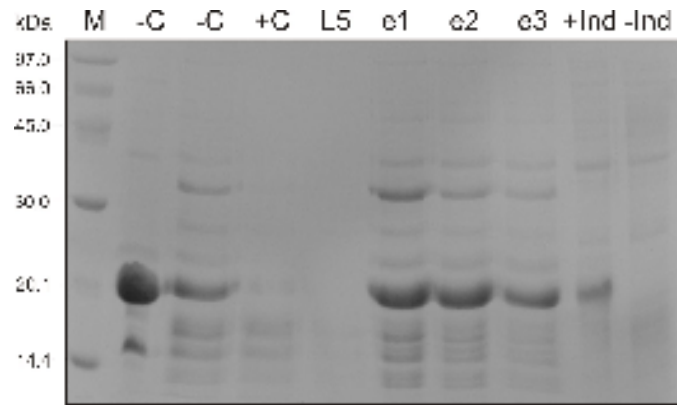


Figura 5.23. Análisis del proceso de purificación de LtuB mediante electroforesis SDS-PAGE con la resina de Ni^{2+} y la resina S. M: marcador de masas moleculares; -C: sobrenadante clarificado antes pasar por la resina S; -C: sobrenadante clarificado antes pasar por la resina de Ni^{2+} ; +C: sobrenadante clarificado después de pasar por la resina de Ni^{2+} ; L5: lavado 5; e1, e2 y e3: eluciones de la resina de Ni^{2+} ; +Ind: extracto lisado inducido con IPTG 1 mM y L-arabinosa 0,2 %; -Ind: extracto lisado no inducido.

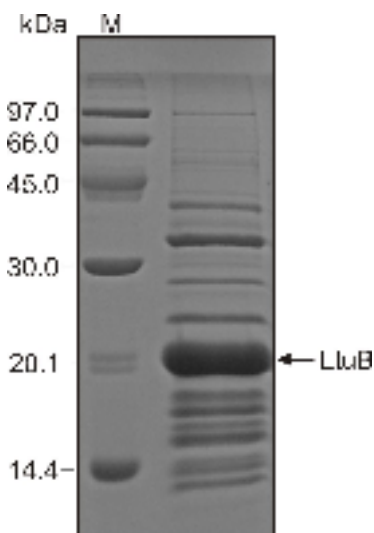


Figura 5.24. Recombinante LtuB purificado. Análisis en SDS-PAGE al 20% de la LtuB recombinante parcialmente purificada. Se cargaron en el gel 20 μl de la solución proteica.

5.5. ELISA con inmunógenos de *C. pneumoniae* obtenidos de la genoteca

Purificados los 6 recombinantes seleccionados, se llevó a cabo un estudio pormenorizado de su capacidad como inmunógenos para el diagnóstico de la enfermedad producida por *C. pneumoniae*.

Los recombinantes purificados se utilizaron como antígenos en ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos de *C. pneumoniae* en las muestras de sueros humanos disponibles.

5.5.1. Selección y validación de sueros humanos

5.5.1.1. Para el inmunoscreening humano

Para realizar esta selección, dispusimos de 270 sueros de una población hospitalaria de Zaragoza. Los sueros fueron evaluados mediante un ELISA comercial (*Chlamydophila pneumoniae* ELISA IgG, Vircell S.L.). Este equipo semicuantitativo permite la conversión de los resultados numéricos obtenidos a valores equivalentes a una titulación por inmunofluorescencia indirecta (IFI) mediante unos calibradores. De los 270 sueros sometidos por esta técnica, 89 resultaron tener unos valores equivalentes a un título de 1/512 por IFI. Posteriormente, se confirmaron estos 89 por la misma técnica y 69 de estos mostraron los mismos valores.

Además, estos 69 sueros fueron titulados por IFI, que es la técnica de referencia para el diagnóstico de una infección aguda por *C. pneumoniae*, con el equipo *Chlamydophila pneumoniae* IFA IgG. Trece resultaron tener un título de $\geq 1/512$, se confirmaron realizando una titulación seriada, obteniendo finalmente 8 sueros con un título de 1/256, 3 con un título de 1/512 y 2 con un título de 1/1024. Estos 2 últimos sueros fueron los seleccionados para realizar el inmunoscreening.

5.5.1.2. Para los ensayos en ELISA con los recombinantes obtenidos de la genoteca

El criterio que se siguió para considerar un suero como positivo frente a *C. pneumoniae*, fue tener un título \geq de 1/64 por IFI, mientras que un título $<$ de 1/64, se consideró como negativo.

Con la misma población de sueros evaluados anteriormente con el equipo *Chlamydophila pneumoniae* ELISA IgG, se seleccionaron 40 sueros que tuviesen anticuerpos anti-*C. pneumoniae*.

Por esta misma técnica se confirmaron los resultados y finalmente, se comprobó que tuviesen un título \geq de 1/64 por IFI con el equipo *Chlamydophila pneumoniae* IFA IgG. Con este mismo equipo se comprobó que no existiesen reacciones cruzadas en estos sueros

con *C. trachomatis* y/o *C. psittaci*. Estos 40 sueros formaron el grupo de sueros positivos frente a *C. pneumoniae*.

Para la selección de los sueros negativos, se partió de la misma población de sueros, se escogieron 40 sueros que no hubiesen presentado por ELISA anticuerpos frente a *C. pneumoniae*. Posteriormente, estos sueros fueron confirmados mediante IFI y aquellos que tuvieron un título < de 1/64 fueron considerados como negativos. Los sueros que no se ajustaron a estas condiciones fueron descartados.

Estos 80 sueros (40 positivos y 40 negativos) fueron utilizados en los ensayos de ELISA con los seis recombinantes purificados independientemente.

5.5.2. Medidas de ELISA usando los recombinantes de *C. pneumoniae* como antígenos

Se realizó un estudio serológico con la técnica ELISA con cada recombinante por separado, utilizando 40 sueros positivos, con los que se estudio la sensibilidad diagnóstica y 40 sueros negativos, con los que se estudio la especificidad diagnóstica.

Para ello, se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos para ELISA (Maxisorb Nunc) con cada uno de los recombinantes, a una concentración cada uno entre 1-5 µg/ml. Estas concentraciones se obtuvieron midiendo las absorbancia de los recombinantes purificados a 280 nm y posteriormente diluyendo en PBS como describe Gill y von Hippel (1989). Los coeficientes de extinción usados fueron los valores teóricos obtenidos mediante el programa ProtParam. Para obtener esta concentración, se realizaron las siguientes diluciones para cada uno de los recombinantes ensayados: 1/200 para la Exinucleasa, Topoisomerasa y LtuB; 1/400 para la ATPasa y GTPasa y 1/1000 para la Small protein B. Se incubaron toda la noche a temperatura ambiente, luego fueron lavadas y bloqueadas, durante 2 h, con suero fetal bovino al 25%. Finalmente se secaron a 37° C durante 4 h.

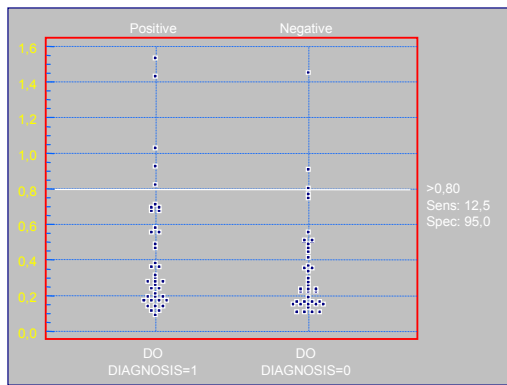
Preparadas las placas con los antígenos fijados, se incubaron las placas durante 45 min a 37° C, tanto con los sueros positivos como con los sueros negativos para *C. pneumoniae* a una dilución 1/20 en una solución de PBS con suero fetal bovino. Después de lavar, se añadió IgG anti-humana de cabra conjugado con peroxidasa (Jackson) a una

dilución 1/39000 en diluyente del conjugado con BSA al 5% (Vircell). Se incubó a 37° C durante 30 min. Finalmente, la reacción de la peroxidasa se visualizó usando TMB/solución de H₂O₂ como sustrato (Neogen Corporation). La lectura de los resultados para los experimentos de ELISA, se realizó con un espectrofotómetro a 450/620 nm.

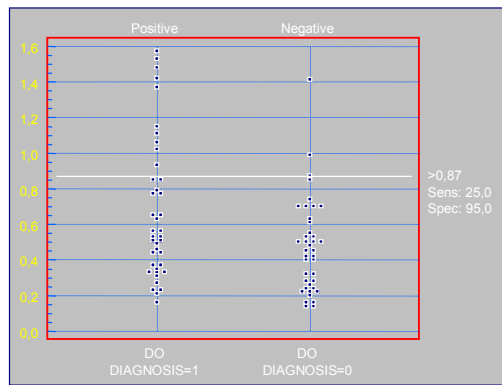
Con los resultados obtenidos se realizaron curvas de ROC para cada recombinante. Después de interpretar los resultados, se consideró que debía prevalecer la especificidad de los ensayos sobre la sensibilidad, por lo que los resultados que se muestran se ajustaron para una especificidad entre el 95-97,5% (Figura 5.25.).

Los valores obtenidos por encima y por debajo del *cut-off*, para cada suero, están representados en las tablas 5.5. y 5.6.

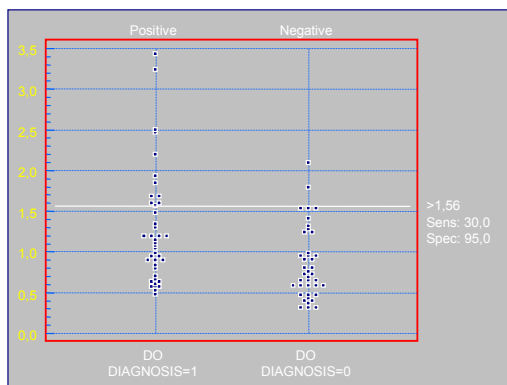
Exinucleasa



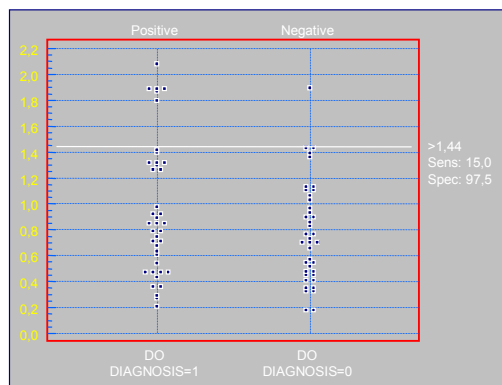
Topoisomerasa



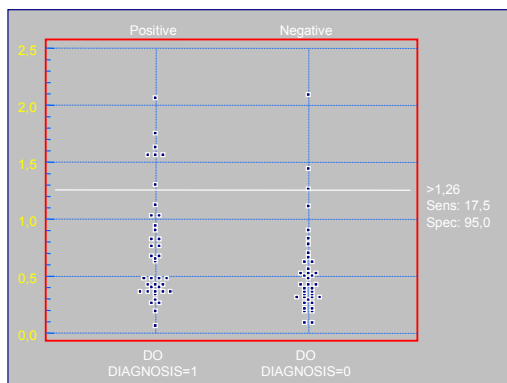
GTPasa



ABC ATPasa



Small protein B



LtuB

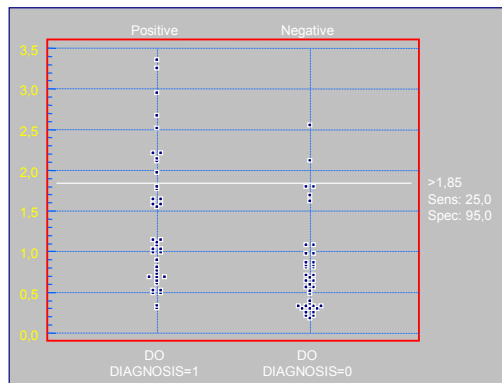


Figura 5.25. Respuesta por ELISA de cada suero frente a cada uno de los 6 recombinantes. Curvas de ROC de los 6 recombinantes sometidos a los ensayos de ELISA. Gráficas obtenidas para un 95-97,5% de especificidad con los sueros sometidos a estudio.

5. RESULTADOS

Tabla 5.5. Resultados obtenidos con los 40 sueros positivos frente a cada uno de los recombinantes ensayados.

Resultados con los sueros positivos de <i>C. pneumoniae</i>					
Exinucleasa	Topoisomerasa	Small protein B	LtuB	ATPasa	GTPasa
Sueros positivos (n=40)	Sueros positivos (n=40)	Sueros positivos (n=40)	Sueros positivos (n=40)	Sueros positivos (n=40)	Sueros positivos (n=40)
+	+	+	-	+	-
-	-	-	-	-	+
+	+	+	+	+	+
+	-	-	+	-	+
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+
-	-	+	+	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+
-	+	-	+	-	-
-	+	-	-	+	-
-	-	-	+	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	+	-	-	-	-
-	+	+	+	+	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+
-	-	-	+	-	-
-	-	+	+	-	+
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	Dudoso	-
-	+	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+
+	+	+	+	-	+
-	+	-	-	+	+
+	-	+	+	+	+
-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	+
-	-	-	-	-	-

+ : Resultados por encima del *cut-off*
 - : Resultados por debajo del *cut-off*

5. RESULTADOS

Tabla 5.7. Tabla resumen de los valores obtenidos en los ensayos de ELISA con los recombinante purificados. Valores de sensibilidad y especificidad para cada recombinante

Sueros		Exinucleasa	Topoisomerasa	Small protein B	LtuB	ABC ATPasa	GTPasa
Positivos (n=40)	Dudosos					1	
	Positivos (VP)	5	9	7	10	6	12
	Negativos (FN)	35	31	33	30	33	28
Negativos (n=40)	Dudosos	1	1	1	1	2	1
	Positivos (FP)	2	1	2	2	1	2
	Negativos (VN)	37	38	37	37	37	36
Sensibilidad (%)		12,5	22,5	17,5	25	15	30
Especificidad (%)		95	97,5	95	95	97,5	95

6.1. Análisis del ARN usado para la construcción de la genoteca de expresión	119
6.2. Genoteca de expresión de <i>C. pneumoniae</i>	121
6.3. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI	123
6.4. Identificación y análisis de los clones inmunoreactivos	128
6.5. Selección de sueros con anticuerpos anti-<i>C.pneumoniae</i> y sueros control para los ensayos ELISA	129
6.6. Estudio de la capacidad inmunogénica de los recombinantes en ELISA	130

6. DISCUSIÓN

6.1. Análisis del ARN usado para la construcción de la genoteca de expresión

En este trabajo se describe la construcción de una genoteca de *Chlamydophila pneumoniae* con el fin de obtener inmunógenos de la fase infectiva, los CEs, para su aplicación en el serodiagnóstico. Se realizó una genoteca de ADNc para conseguir que la colección de clones solo contuviese las regiones codificantes que se expresan en esta fase del desarrollo.

La característica biológica que define al género *Chlamydophila* es su obligado ciclo de desarrollo intracelular, caracterizado por un lado, por el pequeño CE infeccioso (0,3 μm) y por el otro, por el gran CR con división intracelular (1 μm). El CE es la forma adaptada para la supervivencia extracelular. La adaptación parece ser por 2 razones: resistencia a la presión química y física presentes en el mundo extracelular y a una desconexión del metabolismo. La resistencia es consumada por una inusual envuelta celular pobremente permeable y estable osmóticamente, y un área de superficie del CE mucho más reducida comparada con la del CR. La desconexión del metabolismo es presumiblemente necesaria para prevenir la accidental iniciación extracelular del ciclo de crecimiento, el cual puede ser correctamente regulado y exitosamente completado solo dentro de un medio intracelular (Stephens, 1999).

Tres problemas dificultan la caracterización de los eventos bioquímicos específicos de cada fase: la separación de los procesos bacterianos de los del hospedador, un ciclo asincrónico y la falta de referencias convenientes en las mediciones (Stephens, 1999).

Distinguir la bacteria del hospedador es un problema en todas las fases del ciclo de desarrollo pero es más crítico en las fases inicial e intermedia, cuando los CEs intracelulares están activándose lentamente y presentes dentro de un mar de actividades metabólicas del hospedador. Para nuestro propósito se requiere purificación del patógeno, la cual nunca es completa y está sujeta a la contaminación por células hospedadoras, particularmente en la fase inicial, cuando el número de clamidias es bajo. Por esta razón, el aislamiento de los CEs se realizó desde cultivos incubados durante 5 días para conseguir un gran número de células HEp-2 infectadas. La dificultad de distinguir entre la bacteria y el hospedador, durante el proceso de purificación, quedó materializada posteriormente en el inmunoscreening, al obtener clones de la genoteca con secuencias humanas.

La asincronía es un problema tanto de las fases iniciales como de las tardías. Una población de CEs no se fija y entra en las células hospedadoras exactamente al mismo tiempo. Por lo que no se puede conseguir una población completamente homogénea de CEs o CRs, ahora bien, extracelularmente sí se puede conseguir la purificación de los CEs, puesto que soportan la presión osmótica del medio extracelular a diferencia de lo que ocurre con los CRs.

El tercer problema asociado con los estudios del ciclo de desarrollo, es la falta de una referencia conveniente con la que las mediciones puedan ser comparadas. Uno podría conocer el número de microgramos de una proteína o transcritos por célula en diferentes momentos de la postinfección, pero la falta de infectividad de los CRs hace esta idea impracticable.

Una de las principales diferencias bioquímicas observadas entre CEs y CRs es el menor ratio ARN/ADN de los CEs. Los CRs, la forma replicativa, tiene una elevada síntesis de transcripción, un ratio de 3:1 de ARN/ADN, pero al ser osmóticamente inestables su purificación no se puede realizar. Mientras que los CEs, la forma no replicativa, si se pueden aislar, pero su síntesis de ARNm es baja, tienen un ratio 1:1 de ARN/ADN.

Tras el proceso de purificación descrito en el apartado 4.1.1.2., se procedió a la extracción de su ARNm.

La obtención de ARNm de los CEs de *C. pneumoniae* esta dificultada por la pequeña cantidad de patógeno que se puede obtener después de la purificación desde las células hospedadoras. Además, es lógico pensar que el ARNm de los CEs pueda estar contaminado con ARN humano procedente de las células HEp-2, aunque hay que tener en cuenta que la liberación de los ácidos nucleicos de las células HEp-2 se realiza en una fase anterior a la del patógeno. Junto con estos inconvenientes inherentes, está la dificultad de usar tecnología del ARN/ADN para realizar genotecas de expresión con muy poca cantidad de ARN (pocos µg de ARN).

La obtención de un ARNm de buena calidad es muy importante para asegurar el éxito de la genoteca y del proceso de screening realizado sobre ella. Un ARNm de buena calidad

está caracterizado por un “*smear*” entre 8,5 y 0,5 kb. (Sambrook y Russell, 1989) (Figura 5.1.).

6.2. Genoteca de expresión de *C. pneumoniae*

6.2.1. Proceso de construcción de la genoteca de expresión de *C. pneumoniae*

No todos las genotecas proporcionan idéntica información. Las genotecas de ADN genómico se realizan sobre todo el genoma, mientras que las de ADNc solo contienen las regiones codificantes que se expresan en ese tejido, tipo celular, etapa de desarrollo o de diferenciación (Luque y Herráez, 2001). El material genético del que queríamos disponer para la búsqueda de proteínas inmunogénicas es del que se expresa en la etapa de desarrollo del CE, la fase infectiva.

Por otra parte, en las genotecas de ADN genómico la preparación del ADN de partida se realiza por escisión del genoma con enzimas de restricción bajo condiciones de rotura parcial. La rotura se produce en cada molécula aleatoriamente sobre el conjunto de sitios de restricción, de forma que aparece un número menor de fragmentos, de mayor tamaño, respecto a lo teóricamente posible (Luque y Herráez, 2001). Al usar una genoteca de ADNc, se obtienen fragmentos de ADNc que proceden de ARNm que se están traduciendo, realmente, en esa fase o estadio de desarrollo.

6.2.2. Análisis de clones de la genoteca de entrada y de expresión de *C. pneumoniae*

Realizada la genoteca, se llevó a cabo un análisis de restricción de 10 clones, tanto de la genoteca de entrada como de la genoteca de expresión. Este análisis se realizó para determinar el porcentaje de recombinantes obtenidos y la calidad de la genoteca, analizando el tamaño medio de los insertos. La enzima de restricción utilizada, *Bsp1407I*, corta en secuencias próximas a ambos lados del inserto, concretamente, esta diana surge de la recombinación entre los adaptadores *att*, pudiendo saber así el tamaño de los fragmentos insertados.

Estos dos valores deberían de mantenerse con respecto a la genoteca de entrada.

En cuanto al tamaño medio de los insertos, 0,85 kb para los clones de entrada y 0,65 kb para los de expresión, son valores por debajo del tamaño medio teórico de un gen procarionta (Sambrook y Russell, 1989), que es de 1 kb. Estos valores, por debajo del valor medio, se deben principalmente a que muchos de insertos son fragmentos de genes, lo que se pudo comprobar al secuenciar los clones obtenidos del inmunoscreening. Estos fragmentos proceden por un lado, de que no todo el ARNm obtenido de la extracción fueron genes completos y por otro, de que durante la construcción de la genoteca el 60% de los recombinantes se fragmenta (Invitrogen).

Además es posible que el análisis de 10 clones no sea muy representativo de la genoteca puesto que no hay ninguna razón técnica para que el valor de los clones de entrada y de expresión sea diferente, sobretodo teniendo en cuenta que el título de clones obtenido, tanto en la genoteca de entrada como en la de expresión, es el mismo. Sin embargo, nos ha dado una idea del porcentaje de inserciones. Además, nuestro principal objetivo es la búsqueda de inmunógenos, se trate de proteínas completas o de fragmentos.

La obtención de un 100% de recombinantes con inserto nos indica que tenemos una genoteca de $1,3 \times 10^6$ clones con inserto y que aunque el valor medio esta un poco por debajo del óptimo, hemos encontrado, en los clones analizados, insertos de hasta 2,3 kb. Por otra parte, si en el inmunoscreening se encuentra un gen interesante para el diagnóstico y este no estuviera completo, siempre puede usarse su secuencia para diseñar unos oligonucleótidos que puedan ser usados en una reacción de PCR para la obtención del gen completo. Además, habría que resaltar que, en la mayoría de los casos, un buen antígeno no necesita ser un gen completo sino la secuencia que contenga el epítipo inmunodominante.

6.2.3. Demostración de la presencia de ADN específico de *C. pneumoniae* insertado en la genoteca

Para asegurarnos de la existencia de genes de *C. pneumoniae* en el ADNc obtenido tras la reverso transcripción, se realizó una PCR para amplificar la secuencia completa de los genes que codifican MOMP y OmcB, dos de las proteínas más abundantes en *C. pneumoniae*. La secuencia de los oligonucleótidos utilizados para cada gen se representa en la figura 6.1.

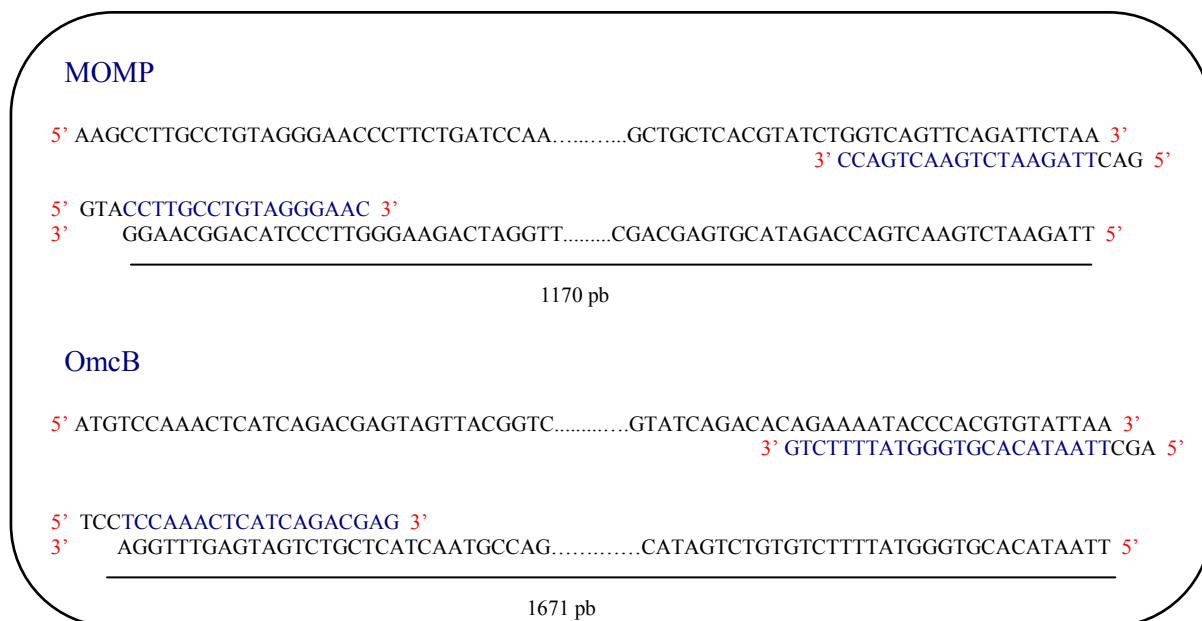


Figura 6.1. Detalle de los oligonucleótidos usados en la PCR y producto resultante. En azul se indica la secuencia de los oligonucleótidos usados.

Ambos genes fueron amplificados sin dificultad (Figura 5.4.), lo que indica la presencia de ADN procedente de esta bacteria. Los genes que codifican MOMP y OmcB son de 1170 pb y 1671 pb, respectivamente y las bandas de amplificación que se obtuvieron de la PCR tenían el mismo tamaño, lo que demuestra que la genoteca contiene también ADN de *C. pneumoniae* de genes completos.

Hay que destacar, que OmcB (al igual que OmcA) son proteínas que no están presentes en los CRs, solo se expresa en la fase del desarrollo de los CE (Stephens y cols., 2001), lo que parece indicar la expresión de genes que se traducen específicamente en la fase de CE.

6.3. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI

Antes de comenzar nuestro estudio se realizó una búsqueda pormenorizada de los sistemas de *blotting* descritos en la bibliografía, sin embargo, no se encontró mucha variedad. Lo que si existen son pequeñas modificaciones de ellos. Uno de los sistemas utilizados para la selección y detección de bacterias que expresan antígenos mediante reacciones antígeno-anticuerpo fue el descrito por Dreher y cols. (1991) con algunas modificaciones. Este sistema consistía en colocar dos membranas sobre la placa madre, la exterior sobre la que crecían las bacterias y cuyas proteínas secretadas pueden atravesar

esta membrana por su mayor diámetro de poro y la interior, que captura estas proteínas secretadas y sobre la que se realiza la inmunodetección, separando de esta forma las proteínas secretadas del resto de la bacteria, evitando los fondos que producen las bacterias en la inmunodetección. Pero este sistema generaba señales dispersas y se descartó. Finalmente, se utilizó el sistema descrito por Sambrook y Russell (1989).

6.3.1. Análisis del sistema de inmunoscreening con un anticuerpo monoclonal

Para verificar que el método utilizado para la realización del inmunoscreening (Sambrook y Russell, 1989) era efectivo, se realizaron los experimentos descritos en el apartado 5.2.1.

Mientras que en el primer caso no se obtuvo ninguna señal (Figura 5.5.A.), debido a la ausencia de colas de histidina, en el segundo caso alrededor de un 63% de las colonias si generaron reacción antígeno-anticuerpo (Figura 5.5.B.). Posteriormente, el análisis de restricción de las colonias que indicaron señal (positivas) y de las que no (negativas), confirmó que se trataba de los plásmidos esperados (Figura 5.6.). Aunque por el tamaño de los ADNs aislados era suficiente para determinar su identidad, para asegurarnos, se digirieron con una enzima de restricción, que presentaba una diana interna, para linearizarlos.

Este experimento validó el sistema de *blotting* que estábamos usando para llevar a cabo el screening de la genoteca de expresión.

El tercer ensayo realizado consistió en transformar las bacterias (BL21-AI) con la genoteca de expresión y se observó que aproximadamente un 50% de la colonias transferidas generaban una señal debido a una inmunoreacción con el monoclonal (Figura 5.5.C.).

El hecho de que solo un 50% daba señal con el monoclonal de colas de histidinas, en lugar del 100% podría deberse a múltiples factores, entre ellos: mutaciones corrientes arriba de la secuencia de polihistidinas lo que impedirían su expresión, una reacción de recombinación defectuosa que elimine partes del vector de expresión pDEST17, o bien porque el polipéptido sea tóxico para la bacteria, se degrade rápidamente, porque sean

proteínas de alto peso molecular que son más difíciles de expresar o bien sean de naturaleza básica, puesto que en *E. coli*, la mayoría de las proteínas son ácidas. Incluso, podría deberse a una reacción LR clonasa defectuosa, donde no haya habido transformación de la genoteca donadora al pDEST17 y este mantenga por mutación del gen *ccdB*. Que la expresión de cada recombinante de la genoteca es distinta queda reflejado en las diferentes intensidades de las señales generadas por el monoclonal. Seguramente, muchos de los clones no detectados fue porque expresasen poco recombinante y no estuvieron el suficiente tiempo en contacto con el anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa.

Posteriormente, con el análisis de restricción realizado con la enzima *Bsp1407I*, se observó que el 100% de los clones analizados llevaban inserto (Figura 5.7.) y que el tamaño medio de los insertos era de 0,88 kb, lo que confirmó que el tamaño medio tanto de la genoteca de entrada como de la genoteca de expresión se mantenía. De esta forma, se verificaba la correcta construcción de la genoteca, que el vector pDEST17 con los insertos de ADN expresaba sus insertos en la cepa de expresión y que la expresión de estos insertos podía ser detectada por una reacción antígeno-anticuerpo.

6.3.2. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI con sueros de pacientes

En los experimentos previos de inmunoscreening realizados con sueros de pacientes (5.2.2.A) quedó patente que los anticuerpos de un suero generan tantas reacciones inespecíficas con las proteínas presentes en el sistema de expresión (*E. coli*), que impiden la detección de las reacciones antígeno-anticuerpo específicas.

Por esta razón, se procedió a la purificación y preabsorción de los sueros positivos anti-*C. pneumoniae* (sueros 18.66 y 13.8) y del control negativo (suero 13.79). Con la purificación se eliminó la mayor parte de los constituyentes del suero, obteniendo un policlonal con las diferentes IgGs. Y con la posterior preabsorción de las IgGs que reaccionaban con las proteínas de *E. coli*, sometiendo al anticuerpo policlonal a una inmunoabsorción con un clarificado de *E. coli*, nos quedó un policlonal con muchas menos IgGs inespecíficas, manteniendo las IgGs específicas anti-*C. pneumoniae*.

Tras realizar nuevos ensayos para ajustar la dilución adecuada, tanto de los 2 policlonales humanos anti-*C. pneumoniae* y del control negativo, como del anticuerpo secundario (anti-human IgG), no se pudo establecer una dilución fiable para la obtención de clones inmunoreactivos. A pesar de utilizar un rango de diluciones para el anticuerpo primario entre 1/10 y 1/15000 y para el anticuerpo secundario entre 1/500 y 1/105000, no se encontró una forma de eliminar los falsos positivos que aparecían tanto en el control negativo como en los sueros positivos.

Aunque se obtuvieron clones que generaban una señal intensa con los sueros positivos y no con el control negativo (Figura 5.9. en amarillo), también se obtuvieron clones que generaban una señal intensa tanto con los sueros positivos como con el control negativo, si bien en este último caso de forma más débil (Figura 5.9. en blanco), tratándose de falsos positivos. Esto se comprobó al aislar esos clones y realizarles el análisis de restricción con la enzima *Bsp1407I*, los clones que presentaban señal intensa tanto en A como en B (en blanco) no fueron digeridos por la enzima mientras que los clones que presentaban señal intensa solo en A (en amarillo) si digirieron, presentado inserto.

Junto con el análisis de restricción, se comprobó, mediante la realización de Western-blot, que los falsos positivos al inducir la expresión de su plásmido (Figura 5.9. en blanco) e incubarlos con el monoclonal de histidinas no expresaron la cola de histidinas mientras que los posibles clones positivos si mostraron expresión (Figura 5.9. en amarillo).

Se concluyó que estas condiciones no eran las adecuadas para considerar un método fiable de obtención de clones inmunoreactivos, porque aunque se detectaba la presencia de clones que generaban una señal intensa (Figura 5.9. en blanco), no poseían las dianas para la enzima *Bsp1407I* y por lo tanto no mostraban inserto.

6.3.3. Inmunoscreening de la genoteca de expresión en células BL21-AI con suero de conejo

Para generar una mayor respuesta inmunológica frente a *C. pneumoniae* y obtener un suero con mayor título de anticuerpos específicos anti-*C. pneumoniae* que el de los sueros usados hasta el momento, se decidió utilizar el suero de un conejo New Zealand inmunizado con CEs de *C. pneumoniae*.

Para la puesta a punto del inmunoscreening con el suero de conejo, se procedió de igual forma que con los sueros humanos. Debido a las interacciones inespecíficas que generan los anticuerpos con las proteínas de *E. coli*, se purificó y preabsorbió el suero.

La purificación se realizó igual que en el caso de los sueros humanos y en cuanto a la preabsorción se actuó de igual forma, se incubó el suero purificado con un clarificado de *E. coli* pero se realizó un paso adicional, que consistió en incubarlo con un clarificado de HEp-2. Este paso se hizo para eliminar los anticuerpos anti-humano que genera el conejo puesto que los CEs utilizados para llevar a cabo su inmunización estarían contaminados con proteínas de origen humano, presentes de forma prácticamente inherente en la suspensión de CEs.

Con el policlonal purificado y preabsorbido, y puesta a punto la técnica, se realizó el inmunoscreening obteniéndose 54 clones inmunopositivos, clones que mostraron una señal mas intensa con respecto al resto (Figura 5.12.).

El análisis por Western-blot de los 54 clones inmunoreactivos, con el monoclonal frente a colas de histidinas, mostró que el 83% de estos clones expresaban los recombinantes insertados (Figura 5.13.), mientras que, en el análisis de restricción con la enzima *Bsp1407I*, el 100% de los clones mostraron insertos (Figura 5.14.). El que hubiese 9 clones que, aun mostrando inserto, no expresasen las colas de polihistidinas puede deberse a que se tratase de falsos positivos y que realmente no expresasen ni la cola de histidinas ni la posterior secuencia o bien, a que el proceso de inducción de las histidinas y por tanto de la secuencias de esos clones no fuese detectado por Western-blot, puesto que el procesamiento de las muestras en el Western-blot difiere del inmunoscreening.

Tras analizar el tamaño de los recombinantes obtenidos en los Western-blots como el tamaño de los insertos de nucleótidos en el análisis de restricción, se decidió trabajar solo con los clones de mayor tamaño, en total se seleccionaron 23 clones, que fueron secuenciados.

6.4. Identificación y análisis de los clones inmunoreactivos

El ADNc de los clones inmunoreactivos seleccionados fue secuenciado utilizando los cebadores promotor y terminador de la T7 ARN polimerasa. Los resultados que mostró la base de datos GenBank fue que de los 23 clones secuenciados, 13 clones llevaban insertadas secuencias de *C. pneumoniae* y 10 clones, secuencias humanas. Estos 10 clones fueron descartados y su inmunodetección, aun siendo lógica, por la respuesta inmune que genera el conejo frente a antígenos de HEp-2, nos demuestra que no fue suficiente la inmunoabsorción que se realizó de los anticuerpos anti-humanos con el clarificado de células HEp-2. Lo que nos hace disminuir el tanto por ciento de posibles clones inmunoreactivos, pero sin interferir en los resultados finales.

De los 13 clones que llevaban insertadas secuencias de *C. pneumoniae*, 10 estaban en pauta con el promotor de la T7 ARN polimerasa del vector de expresión pDEST17, mientras que 3 de ellos no, por lo que fueron descartados. Los 10 clones inmunoreactivos que expresaban insertos de *C. pneumoniae* en fase se muestran en la tabla 5.3.

De estos 10 clones: 4 presentaban la pauta abierta de lectura (ORF) completa, tratándose de genes completos y 6 no presentaban su secuencia completa, obteniendo en todos los casos el extremo C-terminal.

Se escogieron 6 proteínas/polipéptidos para ser purificados y realizar con ellos un estudio pormenorizado de su capacidad como inmunógenos para el diagnóstico de la enfermedad.

Se descartaron las proteínas ribosomales obtenidas porque la mayoría de ellas están conservadas en todas las bacterias y probablemente, darían lugar a múltiples falsos positivos por reacciones cruzadas. También se descartó la glucosa 1-P-adeniltransferasa, que es una importante enzima reguladora de la biosíntesis del glucógeno en bacterias, porque al realizar un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal, fragmento que expresaba el clon 11, con *C. trachomatis* se observó que este dominio estaba altamente conservado en ambas especies, por lo que probablemente generaría reacciones cruzadas.

6.5. Selección de sueros con anticuerpos anti-*C. pneumoniae* y sueros control para los ensayos ELISA

Los estudios seroepidemiológicos indican que el 50% de la población adulta, llegando incluso hasta el 75% en la población anciana, posee anticuerpos frente a este microorganismo. Por lo que la detección de anticuerpos anti-*C. pneumoniae* IgG en sueros, a pesar de que los títulos de anticuerpos IgG decaen entre los 3-5 años siguientes a la infección inicial, es común debido a las frecuentes reinfecciones a lo largo de la vida (Kuo y cols., 1995).

La validación de los sueros positivos, con anticuerpos anti-*C. pneumoniae*, como de los sueros negativos, sin anticuerpos anti-*C. pneumoniae*, que se emplearon para evaluar la sensibilidad y especificidad de los recombinantes en los ensayos de ELISA se realizó por ELISA y por IFI. Por un lado, mediante ELISA, se seleccionaron entre los 270 sueros disponibles aquellos con anticuerpos anti-*C. pneumoniae*, que posteriormente, fueron confirmados con el mismo equipo. Los seleccionados se validaron mediante IFI, técnica de referencia en el diagnóstico serológico de la enfermedad aguda por *C. pneumoniae*. De acuerdo al criterio diagnóstico descrito por Dowell y cols. (2001) para la IFI, un título de IgG ≥ 512 indicaría infección aguda y un título de IgG ≥ 16 indicaría infección pasada o crónica persistente.

La idea fue probar si los recombinantes obtenidos eran de aplicación en el diagnóstico de la enfermedad por *C. pneumoniae*, lo que incluye la infección aguda y la crónica persistente. Para lo que se estableció un título \geq de 1/64 como suero positivo y un título $<$ de 1/64 como suero negativo. Aunque existan en los sueros negativos bajos títulos (1/8, 1/16, 1/32), que indicaría una infección pasada, nuestra intención era probar si los recombinantes eran reconocidos por sueros con medios y altos títulos, aquellos que indican una infección actual, la cual engloba la infección aguda (altos títulos) y la infección crónica persistente (medios títulos).

Teniendo en cuenta que la prevalencia de anticuerpos para este microorganismo es de un 50% en la edad adulta (Kuo y cols., 1995), se consideró adecuado ajustar este dato, por lo que se utilizaron 40 sueros positivos y 40 sueros negativos para los ensayos de ELISA con los recombinantes obtenidos.

6.6. Estudio de la capacidad inmunogénica de los recombinantes en ELISA

Antes de analizar los resultados obtenidos de la capacidad inmunogénica de los recombinantes mediante ELISA, se fijaron unos criterios en base a los objetivos que buscábamos.

Es importante tener en consideración la cinética de la respuesta de anticuerpos. La IgM, en la primoinfección, aparece a las 2-3 semanas después del comienzo de la enfermedad pero generalmente a los 2-6 meses es indetectable. Mientras que en las reinfecciones puede no aparecer. Por esta razón, la búsqueda de IgM en esta infección solo tendría utilidad en el diagnóstico en la primoinfección. Respecto a la IgG, en la primoinfección alcanza títulos altos entre las 6-8 semanas después del comienzo de la enfermedad y en la reinfección aparece un incremento muy rápido en 1-2 semanas. La búsqueda de IgG en la primoinfección tendría un diagnóstico retrospectivo y en las reinfecciones proporcionaría un diagnóstico rápido.

La colección de sueros de la que se dispuso procedía del Servicio de neumología de una población hospitalaria, por lo que la selección de sueros se enfocó a la búsqueda de títulos altos y medios de IgG, indicativos de enfermedad actual. Por otra parte, el número de sueros que se podría haber obtenido de esta población procedentes de una primoinfección por *C. pneumoniae* sería muy limitado.

Además, la serología de *C. pneumoniae* es muy conflictiva por su elevada prevalencia. De hecho, el diagnóstico de la infección aguda por IFI no está establecido por un título concreto sino que se basa en una seroconversión, es decir, un aumento de por lo menos cuatro veces entre el título de anticuerpos IgG de la fase aguda y de la convalecencia (Dowell y cols., 2001), lo que implica dos muestras del mismo paciente, lo cual no es fácil de conseguir. En los equipos comerciales de ELISA, la introducción del *cut-off* es complicada porque los sueros validados previamente por IFI como negativos suelen dar unos valores muy dispersos.

Para minimizar este hecho, se estableció fijar una elevada especificidad ($\geq 95\%$) para los ensayos de detección de anticuerpos IgG basados en equipos de ELISA preparados con nuestros recombinantes. Esta especificidad nos evita muchos los falsos positivos, que

aparecen con alta frecuencia debido a la elevada prevalencia de anticuerpos frente a *C. pneumoniae* en la población sana, sin tener una infección actual. Esta prevalencia puede ser debida a repetidas reinfecciones, estímulos antigénicos persistentes o memoria inmunológica de larga duración.

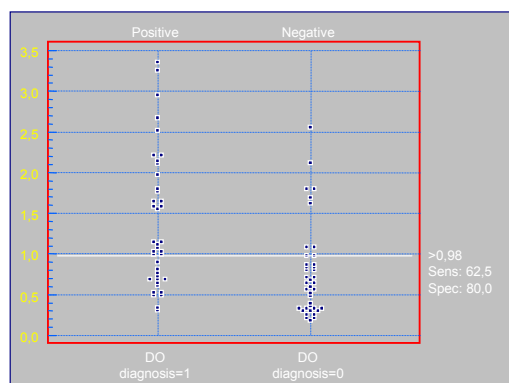
Debido a todo lo indicado anteriormente, se concluyó seleccionar sueros con títulos altos y medios de IgG para el diagnóstico de la enfermedad y se estableció una alta especificidad para evitar falsos positivos por la elevada prevalencia.

Con la especificidad establecida ($\geq 95\%$), las sensibilidades aportadas por cada recombinante, ensayado por separado, estuvieron comprendidas entre el 12,5%-30%. Es importante señalar que obtener una sola proteína/polipéptido que sea reconocido/a por todos los sueros positivos sería extremadamente raro, sobretodo en este patógeno por el carácter de su respuesta inmunológica. Tendría que tratarse de una proteína que generase una fuerte respuesta inmunológica, que fuese altamente inmunogénica y con epítomos inmunodominantes y esto no ha sido descrito hasta la fecha en *C. pneumoniae*. Además, la posibilidad de que exista una proteína de estas características en este patógeno es poco probable, puesto que no genera una respuesta inmunológica fuerte, de hecho, en la infección por *C. pneumoniae* la respuesta inmunológica es principalmente celular y no humoral. La respuesta humoral aunque contribuye no es suficiente para resolver la infección crónica, aunque si podría serlo en la infección aguda (Braun y cols., 1994). Esto se apoya en el hecho de que muchas reinfecciones cursan sin una gran elevación de los títulos. Junto con esto, el estudio inmunogénico de sus proteínas de membrana externa, principales candidatos para generar una respuesta inmunológica fuerte, no ha mostrado ninguna proteína/polipéptido con esas características y que sea específica de especie.

De los recombinantes sometidos a estudio, se obtuvieron algunos que pueden ser reconocidos por un gran número de sueros positivos como es el caso de LtuB y del fragmento aminoacídico 272-482 de la GTPasa (GTPasa 272-482), que corresponde con el extremo C-terminal de la proteína. LtuB, en los ensayos de inmunogenicidad, detectó por si sola IgG anti-*C. pneumoniae* con una sensibilidad del 62,5% y una especificidad del 80% y el fragmento de la GTPasa (272-482) mostró una sensibilidad del 60% y una especificidad del 75% (Figura 6.2.). Estos resultados son comparables a los obtenidos con otros recombinantes de *C. pneumoniae* específicos de especie como la proteína de 54 kDa

(CPn0980) (Sueur y cols., 2006), o ha los obtenidos en *C. trachomatis* con recombinantes antigénicos como son el LPS, MOMP, Hsp60, OmcB (Bas y cols., 2001). Sin embargo, estas especificidades en una enfermedad tan prevalente no son las más convenientes, puesto que tendríamos falsos positivos muy frecuentemente.

LtuB



GTPasa (272-482)

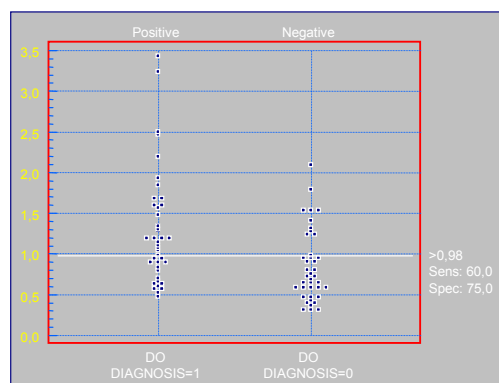


Figura 6.2. Diagrama de dispersión obtenido de los ensayos de ELISA con anticuerpos anti- *C. pneumoniae* para los recombinantes LtuB y GTPasa (272-482). Las gráficas muestran para LtuB una sensibilidad del 62,5% y una especificidad del 80% y para la GTPasa (272-482) una sensibilidad del 60% y una especificidad del 75% con los sueros sometidos a estudio.

Al realizar el estudio con la especificidad establecida ($\geq 95\%$), estos dos recombinantes fueron, igualmente, los que mejores resultados mostraron. Para LtuB, se obtuvo una sensibilidad del 25% para los 40 sueros positivos estudiados y una especificidad del 95% para los 40 sueros negativos. Para la GTPasa (272-482), con los mismos sueros ensayados, se obtuvo una sensibilidad del 30% y una especificidad del 95%.

Los equipos de ELISA que actualmente hay en el mercado, se elaboran con el patógeno entero, por lo que los anticuerpos anti-*C. pneumoniae* pueden reconocer numerosos epítomos. De hecho, los equipos de ELISA desarrollados para otros patógenos realizados con recombinantes suelen ser una mezcla de antígenos (Giménez y cols., 2009) ya que es probable que no todos los sueros positivos posean anticuerpos frente al mismo antígeno. Conseguir que una sola proteína/polipéptido sea reconocido/a por un amplio espectro de sueros positivos es muy difícil, sobretodo en una bacteria con las características de *C. pneumoniae*.

Con los datos de las tablas 5.4.-5.5. y teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, se observó que no todos los recombinantes eran reconocidos por los mismos sueros sino que teníamos recombinantes que reaccionaban con diferentes sueros positivos, por lo que si se utilizase una mezcla de los recombinantes se aumentaría el rango de sueros positivos detectados.

Tres recombinantes: Topoisomerasa (431-769), GTPasa (272-482) y LtuB fueron suficientes para reunir todos los sueros positivos anti- *C. pneumoniae* detectados por los 6 recombinantes. Los otros tres recombinantes: Exinucleasa (226-488), SmpB o proteína pequeña B (86-151) y ABC ATPasa (62-245), no reconocieron ningún suero positivo diferente a los reconocidos por los recombinantes seleccionados para la mezcla, además resultaron ser los tres recombinantes con menor sensibilidad (12,5%, 17,5% y 15%, respectivamente), al mantener una especificidad $\geq 95\%$.

Para realizar el ensayo con los tres recombinantes combinados habría que diluir los recombinantes que mostraron mayor *cut-off* en los ensayos individuales y ajustar este valor al que menor *cut-off* presentó para no ocultar la positividad de un suero con los fondos proporcionados por alguno de los otros recombinantes. Teóricamente, con esta mezcla se podrían reconocer 19 de los 40 sueros positivos, con 1 dudoso, aumentado de esta forma la sensibilidad del ensayo.

En todos los recombinantes se obtuvieron 1 o 2 falsos positivos, algunos de los cuales han llegado a coincidir incluso al analizar tres recombinantes diferentes. Estos falsos positivos podrían deberse a que esos sueros tuviesen un elevado título de anticuerpos anti-*E.coli* por presentar una infección frente a esta bacteria, que reaccionarían con proteínas de *E. coli* presentes en los recombinantes purificados, al no ser homogéneas las preparaciones de recombinantes en un 100%.

Se realizó una búsqueda de homologías con secuencias de otros microorganismos, en la base de datos del NCBI con el programa BLAST, para todas las secuencias aminoacídicas de las proteínas recombinantes sometidas a estudio, encontrado un elevado número de coincidencias, sobretodo en aquellas que llevan regiones conservadas (Anexo 1). Por lo que, existe la posibilidad de que los falsos positivos fuesen debidos a

coinfecciones con algunos de estos microorganismos en los pacientes del hospital de los que proceden los sueros negativos

Los equipos de ELISA comerciales que usan CEs enteros o LPS como antígenos, generan reacciones cruzadas con todas las especies de *Chlamydia* (CEs y LPS), al igual que con el LPS de otras bacterias (LPS) (Longbottom y cols., 2001). Existen equipos de ELISA que usan CEs sin LPS para evitar reacciones cruzadas, con mejores resultados, pero a pesar de todo esto, los falsos positivos son un fenómeno frecuentemente descrito en equipos de ELISA anti-*C. pneumoniae* (Hermann y cols., 2004). Ninguna de las muestras ensayadas fue positiva para *C. trachomatis* por IFI, por lo que las reacciones cruzadas con *C. trachomatis* pueden ser excluidas. Se han descrito reacciones cruzadas con anticuerpos de *Bartonella* en IFI y Western-blots de *C. pneumoniae* en pacientes con miocarditis (Maurin y cols. 1997), en organismos cercanos a *Chlamydia*, como *Simkania negevensis* y *Parachlamydia acanthamoebae*, además de para cuatro organismos recientemente descritos con secuencias parecidas a *Chlamydia* que pueden tener algún impacto en el incremento en los anticuerpos frente a esta bacteria con la edad. (Lieberman y cols., 1997; Ossewaarde y Meijer, 1999). Además, no se puede excluir que otras infecciones puedan aumentar los anticuerpos que generan reacciones cruzadas (Kern y cols., 1993; Ozanne y Lefebvre. 1992).

En un estudio realizado por Hermann y cols. (2004), en el que se evaluaban 4 equipos de ELISA comerciales IgG anti- *C. pneumoniae* frente a un equipo de IFI, se obtuvo: (i) un rango de sensibilidad entre 63-97% y un rango de especificidad entre 73-87%, cuando el estudio se realizó sobre 80 sueros de pacientes con neumonía aguda frente a la técnica de IFI; (ii) una sensibilidad del 100%, pero con una especificidad del 67% cuando se realizó sobre 50 sueros de pacientes con títulos más bajos (enfermedad pulmonar obstructiva crónica, neumonía o infecciones del tracto respiratorio superior (1/64-1/512). Aunque, la concordancia de los resultados de ELISA con los resultados de IFI, en cuanto a la detección de IgG, fue alto, todos los equipos ELISA dieron falsos positivos.

Dentro de los sueros seleccionados como negativos ($< 1/64$), alguno tiene un título de 1/32, que aunque no es uno de los falsos positivos si que es el *cut-off* de dos recombinantes. Por lo que otra posibilidad sería que estos falsos positivos fuesen falsos negativos de las técnicas de validación utilizadas.

Hay autores indican que el uso de la técnica de IFI como referencia puede conducir a una infravaloración de la sensibilidad analítica de las proteínas antigénicas purificadas, puesto que, esta técnica está basada en la detección de anticuerpos frente a los CEs enteros, los cuales pueden albergar variables cantidades de LPS, dependiendo del proceso de purificación (Sueur y cols., 2006). Por esta razón, sería interesante probar estos recombinantes usando la PCR como técnica de referencia, ya que permite un cálculo más exacto de la sensibilidad analítica para la detección de la enfermedad por *C. pneumoniae* (aguda y crónica) activa.

En general, el diagnóstico serológico de *C. pneumoniae* se realiza usando exclusivamente, CEs o componentes de la superficie celular (LPS, MOMP) como antígenos, mientras que otras proteínas de *Chlamydia* han mostrado ser inmunógenas en animales infectados o pacientes humanos. Por ejemplo, varios recombinantes de la proteínas Inc son reconocidas por sueros de pacientes infectados con *C. trachomatis* y *C. pneumoniae* (Bannantine y cols., 2000) o las proteínas recombinantes específicas de *C. pneumoniae* de 54 kDa (CPn0980) (Sueur y cols., 2006; Campbell y cols., 2001) y de 76 kDa (Pérez Melgosa y cols., 1994). Estos estudios indican que otros antígenos recombinantes de *Chlamydia*, además del LPS o MOMP, son inmunogénicos y pueden utilizarse para desarrollar sistemas de ELISA (Ohya y cols., 2008; Longbottom y cols., 2001; Livingstone y cols., 2005).

Estos datos lo que indican es que hacen falta más estudios serológicos con los recombinantes obtenidos con colecciones de sueros previamente validados para cada estados de la enfermedad por *C. pneumoniae*. La obtención de una colección de sueros de pacientes con neumonía aguda nos permitiría comprobar si la producción de anticuerpos frente a estos inmunógenos aumenta de forma generalizada en este tipo de infecciones, incrementando de esta forma la sensibilidad.

Otra línea interesante sería realizar estudios de estos recombinantes con sueros de pacientes con infección crónica, susceptibles de poseer cuerpos persistentes, tanto con enfermedades arteriales periféricas como con enfermedades respiratorias crónicas, para estudiar si se trata de proteínas cuya expresión se induce durante la infección persistente.

La dificultad esta en obtener sueros de pacientes en estas condiciones, la primera porque esta bacteria lleva asociado el problema de que necesita una seroconversión para que pueda ser diagnosticada la infección aguda. Y en cuanto al segundo tipo de sueros, la dificultad reside en obtener un diagnóstico fiable de pacientes con infección persistente, lo cual es muy difícil de diferenciar de una infección pasada. Para lo que se necesita un buen método para la detectar la presencia de *C. pneumoniae* debido a que no existen métodos estandarizados.

Sería útil, además de usar como controles negativos una población hospitalaria, contar con sueros procedentes de población sana, donde todos los pacientes son susceptibles de tener un proceso patológico.

Teniendo en cuenta estos estudios preliminares, el diseño de los siguientes experimentos va enfocado al ajuste de los tres recombinantes seleccionados y combinarlos juntos con otros recombinantes inmunogénos descritos en la bibliografía, como el dominio variable VD2 y VD3 de MOMP (Klein y cols., 2003), una proteína de 53 kDa específica de especie (Sueur y cols., 2005) o las Pmps (Finco y cols., 2005), que aumenten la sensibilidad del equipo obtenido y realizar un estudio con un amplio espectro de sueros de cada estado de la enfermedad por *C. pneumoniae*.

En el caso de obtener recombinantes específicos de cada estado de la enfermedad se podrían aplicar estas proteínas específicas en un mismo equipo de tests rápidos o *line-blots*.

7. CONCLUSIONES

1. La construcción de una genoteca de expresión de *Chlamydophila pneumoniae* ha revelado ser un método útil para la obtención de antígenos recombinantes.
2. El método de cribado inmunológico sobre la genoteca de expresión de *Chlamydophila pneumoniae* ha mostrado ser válido para la detección e identificación de gran número de recombinantes inmunoreactivos.
3. Los recombinantes inmunoreactivos: Topoisomerasa, Exinucleasa, GTPasa, LtuB, Proteína pequeña B y ABC ATPasa de *Chlamydophila pneumoniae* analizados por esta técnica con un suero anti-*Chlamydophila pneumoniae* de conejo han mostrado ser inmunogénicos con sueros anti-*Chlamydophila pneumoniae* de humanos.
4. Ninguna de las proteínas analizadas obtenidas en el cribado fue capaz por si sola de presentar una alta sensibilidad, manteniendo una elevada especificidad, lo que parece apoyar la necesidad de unir varios antígenos si se quiere conseguir un combinado antigénico suficientemente sensible para el serodiagnóstico de *Chlamydophila pneumoniae*.
5. Algunos de los recombinantes inmunogénicos obtenidos, como GTPasa y LtuB, podrían tener utilidad como antígenos en el serodiagnóstico de esta bacteria, aunque unidos a otros antígenos ya descritos, que aumenten la sensibilidad.
6. El futuro del serodiagnóstico de la infección por *Chlamydophila pneumoniae* pasa por determinar que antígenos de la bacteria tienen inmunoreactividad para revelar los diferentes estadios de la infección, así, se podrá obtener antígenos específicos que permitan un diagnóstico diferencial de cada estado de la infección, con o sin enfermedad: infección aguda, persistente o pasada, en función de sueros, previamente clasificados dentro de cada grupo, con los que se realice el cribado inmunológico.

8. BIBLIOGRAFÍA

Airenne S, Surcel HM, Alakärppä H y cols. 1999. *Chlamydia pneumoniae* infection in human monocytes. *Infect Immun*; 67: 1445–49.

Apfalter P, Barousch W, Nehr M y cols. 2003. Comparison of a new quantitative ompA-based real-time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *J Clin Microbiol*; 41: 592–600.

Apfalter P, Blasi F, Boman J y cols. 2001. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of *Chlamydia pneumoniae* in endarterectomy specimens. *J Clin Microbiol*; 39: 519-24.

Arnheim N y Erlich H. 1992. Polymerase chain reaction strategy. *Annu Rev Biochem*; 61: 131-56.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE y cols. 1994. In current protocols in molecular biology. Jansen K. Ed. Published by Greene Publishing Associates Inc. And John Wiley and sons Inc.

Bannantine JP, Griffiths RS, Viratyosin W y cols. 2000. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. *Cell Microbiol*; 2: 35-47.

Barbour AG, Amano K, Hackstadt T y cols. 1982. *Chlamydia trachomatis* has penicillin-binding proteins but not detectable muramic acid. *J Bacteriol*; 15: 420-8.

Bartels C, Maass M, Bein G y cols. 1999. Detection of *Chlamydia pneumoniae* but not cytomegalovirus in occluded saphenous vein coronary artery bypass grafts. *Circulation*; 99:879-82.

Bas S, Muzzin P y Vischer TL. 2001. *Chlamydia trachomatis* serology: diagnostic value of outer membrane protein 2 compared with that of other antigens. *J Clin Microbiol*; 39: 4082-5.

Bavoil P, Ohlin A y Schachter J. 1984. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*; 44: 479-85.

Beatty WL, Belanger TA, Desai AA y cols. 1994a. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun*; 62: 3705-11.

Beatty WL, Morrison RP, Byrne GI. 1994b. Persistent Chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. *Microbiol Rev*; 58: 686-99.

Bernard P y Couturier M. 1992. Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol*; 226: 735-45.

Birkelund S, Lundemose AG y Christiansen G. 1988. Chemical cross-linking of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*; 56: 654-9.

Birkelund S, Lundemose AG y Christiansen G. 1989. Immunoelectron microscopy of lipopolysaccharide in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*; 57: 3250-3.

Birnboim HC y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction method for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*; 7: 1513-23.

Bjerrum OJ y Schafer-Nielsen C. 1986. Buffer systems and transfer parameters for semidry electroblotting with a horizontal apparatus. In *Electrophoresis '86* (M.J. Dunn, ed) pp.315-327. VCH Publishers.

Black CM, Johnson JE, Farshy CE y cols. 1991. Antigenic variation among strains *Chlamydia pneumoniae*. *J Mol Microbiol*; 29: 1312-6.

Black PN, Scicchitano R, Jenkins CR y cols. 2000. Serological evidence of infection with *Chlamydia pneumoniae* is related to the severity of asthma. *Eur Respir J*; 15: 254-9.

Bloemenkamp DG, Mali WP, Visseren FL y van der Graaf Y. 2003. Meta-analysis of sero-epidemiologic studies of the relation between *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: does study design influence results?. *Am Heart J*; 145: 409-17.

Boman J y Hammerschag MR. 2002. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: Critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. *Clin Microbiol Rev*; 15: 1-20.

Boman J, Gaydos CA y Quinn TC. 1999. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*; 37: 3791-9.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*; 131: 499-503.

Braun J, Laitko S, Treharne J y cols. 1994. *Chlamydia pneumoniae*; a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Ann Rheum Dis*; 53: 100-5.

Bullock WO, Fernandez JM y Short JM. 1987. XL1B: a high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*; 5: 376-8.

Bunk S, Susnea I, Summersgill J y cols. 2008. Immunoproteomic identification and serological responses to novel *Chlamydia pneumoniae* antigens that are associated with persistent *C. pneumoniae* infections. *J Immunol*; 180: 5490-8.

Burnette WN. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*; 112: 195-203.

Bush RM y Everett KD. 2001. Molecular evolution of the *Chlamydiaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*; 51: 203-20.

Bushman W, Thompson JF, Vargas L y Landy A. 1985. Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science*; 230: 906-11.

Calvin NM y Hanawalt PC. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*; 170: 2796-801.

Campbell LA, Roberts S, Inoue S y cols. 2001. Evaluation of *Chlamydia pneumoniae* 43- and 53-kilodalton recombinant proteins for serodiagnosis by Western-blot. *Clin Diagn Lab Immunol*; 8: 1231-3.

Campbell S, Richmond SJ, Yates PS y cols. 1994. Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. *Microbiology*; 140: 1995-02.

Carlin JM y Weller JB. 1995. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect Immun*; 63: 1870-5.

Carrillo JA, Gutiérrez J, García F y cols. 2009. Development and evaluation of a multiplex test for the detection of atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood. *Clin Microbiol Infect*; Published online: 19 Mar 2009

Choussat R, Montalescot G, Collet J y cols. 2000. Effect of prior exposure to *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, or cytomegalovirus on the degree of inflammation and one year prognosis of patients with unstable angina pectoris or non-q-wave acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*; 86: 379-84.

Christiansen G, Boesen T, Hjerno K y cols. 1999. Molecular biology of *Chlamydia pneumoniae* surface proteins and their role in immunopathogenicity. *Am Heart J*; 138: S491-5.

Christiansen G, Ostergaard L y Birkelund S. 1997. Molecular biology of the *Chlamydia pneumoniae* surface. *Scand J Infect Dis Suppl*; 104: 5-10.

Cornelis y Van Gijsegem F. 2000. Assembly and function of type III secretory systems. *Annu Rev Microbiol*; 54: 735-74.

Cox RL, Kuo CC, Grayston JT y cols. 1988. Deoxyribonucleic acid relatedness of *Chlamydia* sp. strain TWAR to *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci*. *Int J Syst Bacteriol*; 38: 265-8.

Domeika M, Domeika K, Paavonen J y cols. 1998. Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis*; 177: 714-9.

Dowell SF, Peeling RW, Boman J y cols. 2001. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis*; 33: 492-503.

Dreher ML, Gherardi E, Skerra A y Milstein C. 1991. Colony assays for antibody fragments expressed in bacteria. *J Immunol Methods*; 139:197-205.

Droemann D, Rupp J, Goldmann T y cols. 2007. Disparate innate immune responses to persistent and acute *Chlamydia pneumoniae* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*; 175: 791-7.

Eagle H. 1955. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. *Proc Soc Exp Biol Med*; 89: 362-4.

Elvin S y Birgham AHA. 1991. Electroporation-induced transformation of *Escherichia coli*: Evaluation of a square waveform pulse. *Lett Appl Microbiol*; 12: 39-42.

Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S y cols. 2000. Are morphological or functional changes in the carotid artery wall associated with *Chlamydia pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, cytomegalovirus, or herpes simplex virus infection? *Stroke*; 31: 2127-33.

Everett KD y Hatch TP. 1995. Architecture of the cell envelope of *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol*; 177: 877-82.

Everett KD, Bush RM y Anderson 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 new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol*; 49: 415-40.

Everett KD, Desiderio DM y Hatch TP. 1994. Characterization of lipoprotein EnvA in *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol*; 176: 6082-7.

Finco O, Bonci A, Agnusdei M y cols. 2005. Identification of new potential vaccine candidates against *Chlamydia pneumoniae* by multiple screenings. *Vaccine*; 23: 1178-88.

Fong IW, Chiu B, Viira E y cols. 1997. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*; 35: 48-52.

Fong IW, Chiu B, Viira E y cols. 2002. Chlamydial heat-shock protein-60 antibody and correlation with *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques. *J Infect Dis*; 186: 1469-73.

Fong IW. 2000. Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. *CMAJ*; 163: 49-56.

Fontan PA, Pancholi V, Nociari MM y cols. 2000. Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in poststreptococcal sequelae. *J Infect Dis*; 182: 1712-21.

Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD y Stamm WE. 2001. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions. *J Infect Dis*; 184: 879-84.

Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J y cols. 2001. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. *Circulation*; 103: 351-6.

Gieffers J, van Zandbergen G, Rupp J y cols. 2004. Phagocytes transmit *Chlamydia pneumoniae* from the lungs to the vasculature. *Eur Respir J*; 23: 506-10.

Gill SC y von Hippel PH. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem*; 182: 319-26.

Giménez LG, Rojas J, Rojas A y cols. 2009. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay-based test with a cocktail of nucleocapsid and spike proteins for detection of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific antibody. *Clin Vaccine Immunol*; 16:241-5.

Goudswaard J, van der Donk JA, Noordzij A y cols. 1978. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scand J Immunol*; 8: 21-8.

Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS y cols. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*; 92: 3397-400.

Grayston JT, Kuo CC, Wang SP y cols. 1986. A new *Chlamydia psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infection. *N Engl J Med*; 315: 161-8.

Grayston JT. 1992. *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR pneumonia. *Annu Rev Med*; 43: 317-23.

Grimwood J y Stephens RS. 1999. Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*. *Microb Comp Genomics*; 4: 187-201.

Grimwood J, Olinger L y Stephens RS. 2001. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun*; 69: 2383-9.

Grodberg J y Dunn JJ. 1988. *ompT* encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J Bacteriol*; 170: 1245-53.

Guermontez P, Valladeau J, Zitvogel L y cols. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*; 20: 621-7.

Gutiérrez J, de Dios Luna J, Linares J y cols. 2005. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic *Chlamydia pneumoniae* infection. A meta-analysis. *Thromb Haemost*; 93: 1153-60.

Gutiérrez J, Linares J, Camacho A. y cols. 2006. Descripción de inmunógenos de *Chlamydia pneumoniae* reconocidos por el suero de sujetos con enfermedad arterial periférica. *Med Clin*; 126: 721-7.

Gutiérrez J, Linares-Palomino J, López-Espada C y cols. 2001. *Chlamydia pneumoniae* DNA in the arterial wall of patients with peripheral vascular disease. *Infection*; 29: 196-200.

Gutiérrez J, Mendoza J, Fernández F. 2002. ELISA test to detect *Chlamydia pneumoniae* IgG. *J Basic Microbiol*; 42: 13-8.

Hammerschlag MR. 2002. The intracellular life of *Chlamydiae*. *Semin Pediatr Infect Dis*; 13: 239-48.

Hanahan D y Meselson M. 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol*; 100: 333-42.

Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*; 166: 557-80.

Hardick J, Maldeis N, Theodore M y cols. 2004. Real-time PCR for *Chlamydia pneumoniae* utilizing the Roche Lightcycler and a 16S rRNA gene target. *J Mol Diagn*; 6: 132-6.

Hatch TP, Allan I y Pearce JH. 1984. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol*; 157: 13-20.

Hatch TP. 1996. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in *chlamydiae*?. *J Bacteriol*; 178: 1-5.

Henderson IR y Lam AC. 2001. Polymorphic proteins of *Chlamydia* spp.; autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol*; 9: 573-8.

Hermann C, Graf K, Groh A y cols. 2002. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol*; 40: 1603-9.

Hermann C, Gueinzius K, Oehme A y cols. 2004. Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against *Chlamydomphila pneumoniae* to a microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*; 42: 2476-9.

Hirono S, Dibrov E, Hurtado C y cols. 2003. *Chlamydia pneumoniae* stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. *Circ Res*; 93: 710-6.

Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S y cols. 2004. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. *Infect Immun*; 72: 1843-55.

Holtje JV, Fiedler W, Roterling H y cols. 1988. Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem*; 263: 3539-41.

Hoymans VY, Bosmans JM, Van Renterghem L y cols. 2003. Importance of methodology in determination of *Chlamydia pneumoniae* seropositivity in healthy subjects and in patients with coronary atherosclerosis. *J Clin Microbiol*; 41: 4049-53.

Hueck CJ. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*; 62: 379-433.

Ieven M y Goossens H. 1997. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev*; 10: 242-56.

Ieven MM y Hoymans VY. 2005. Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis: More evidence for lack of evidence. *J Clin Microbiol*; 43: 19-24.

Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC y cols. 1997. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from a carotid endarterectomy specimen. *J Infect Dis*; 176: 292-5.

Johnston S, Zhang CH, Messina LM y cols. 2005. *Chlamydia pneumoniae* burden in carotid arteries is associated with upregulation of plaque interleukin-6 and elevated C-reactive protein in serum. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 25: 2648-53.

Kalman S, Mitchell WP, Marathe R y cols. 1999. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nat Genet*; 21: 385-9.

Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD y cols. 2006. Inflammation and *Chlamydia pneumoniae* infection correlate with the severity of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*; 3: 509-15.

Karimi ST, Schloemer RH y Wilde CE. 1989. Accumulation of chlamydial lipopolysaccharide antigen in the plasma membranes of infected cells. *Infect Immun*; 57: 1780-5.

Kern DG, Neill MA y Schachter J. 1993. A seroepidemiologic study of *Chlamydia pneumoniae* in Rhode Island. Evidence of serologic cross-reactivity. *Chest*; 104: 208-13.

Kertbundit S, Greve HD, Deboeck F y cols. 1991. "In vivo" random β -glucuronidase gene fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci*; 88: 5212-16.

Kishimoto T, Kimura M, Kubota Y y cols. 1994. An outbreak of *C. pneumoniae* infection in households and schools, p. 465–68. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections. Societa Editrice Esculapio*. Bolonia, Italia.

Klein M, Kötz A, Bernardo K y Krönke M. 2003. Detection of *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the mayor outer membrane protein. *J Clin Microbiol*; 41: 1957-62.

Knudsen K, Madsen AS, Mygind P y cols. 1999. Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*; 67: 375-83.

Kol A, Sukhova GK, Lichtman AH y cols. 1998. Chlamydial heat shock protein 60 localizes in human atheroma and regulates macrophage tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase expression. *Circulation*; 98: 300-7.

Kumar S y Hammerschlag MR. 2007. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis*; 44: 568-76.

Kuo CC y Grayston JT. 1990. Amino acid requirements for growth of *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures: growth enhancement by lysine or methionine depletion. *J Clin Microbiol*; 28: 1098-100.

Kuo CC, Chen HH, Wang SP y cols. 1986. Identification of a new group of *Chlamydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol*; 24: 1034-7.

Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA y cols. 1997. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. *J Vasc Surg*; 26: 29-31.

Kuo CC, Gown AM, Benditt EP y Grayston JT. 1993b. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*; 13: 1501-4.

Kuo CC, Jackson LA, Campbell LA y cols. 1995. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR). *Clin Microb Rev*; 8: 451-61.

Kuo CC, Shor A, Campbell LA y cols. 1993a. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis*; 167: 841-9.

Kuoppa Y, Boman J, Scott L y cols. 2002. Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol*; 40: 2273-4.

Kutlin A, Roblin PM y Hammerschlag MR. 1998. Antibody response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children with respiratory illness. *J Infect Dis*; 177: 720-4.

Kutlin A, Tsumura N, Emre U y cols. 1997. Evaluation of *Chlamydia* immunoglobulin M (IgM), Ig G, and Ig A ELISAs Medac for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Clin Diagn Lab Immunol*; 4: 213-6.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; 227: 680-5.

Lamb DJ, El-Sankary W y Ferns GA. 2003. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis*; 167: 177-85.

Landy A. 1989. Dynamic, structural, y regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem*; 58: 913-49.

Lee N, Francklyn C y Hamilton EP. 1987. Arabinose-induced binding of AraC protein to *araI2* activates the *araBAD* operon promoter. *Proc Natl Acad Sci*; 84: 8814-8.

Lee N. 1980. Molecular aspects of *ara* regulation. In *The operon*, J. H: Miller y W.S. Reznikoff, eds. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 389-410.

Lieberman D, Kaen S, Lieberman D y Friedman MG. 1997. Pneumonia with serological evidence of acute infection with the Chlamydia-like microorganism "Z". *Am J Respir Crit Care Med*; 156: 578-82.

Littman AJ, Jackson LA, White E y cols. 2004. Interlaboratory reliability of microimmunofluorescence test for measurement of *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin A and G antibody titers. *Clin Diagn Lab Immunol*; 11: 615-7.

Livingstone M, Entrican G, Wattegedera S y cols. 2005. Antibody responses to recombinant protein fragments of the major outer protein and polymorphic outer membrane protein POPP90 in *Chlamydomphila abortus*-infected pregnant sheep. *Clin Diagn Lab Immunol*; 12: 770-7.

Loens K, Beck T, Goossens H y cols. 2006. Development of conventional and real-time nucleic acid sequence-based amplification assays for detection of *Chlamydomphila pneumoniae* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*; 44: 1241-4.

Longbottom D, Psarrou E, Livingstone M y Vretou E. 2001. Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydomphila abortus*. *FEMS Microbiol Lett*; 195: 157-61.

Luque J y Herráez A. 2001. Biología molecular e Ingeniería genética. Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud. Harcourt, Madrid.

Maass M y Harig U. 1995. Evaluation of culture conditions used for isolation of *Chlamydomphila pneumoniae*. *Am J Clin Pathol*; 103: 141-8.

Maass M, Bartels C, Engel PM y cols. 1998. Endovascular presence of viable *Chlamydomphila pneumoniae* is a common phenomenon in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*; 31: 827-32.

Maass M, Bartels C, Kruger S y cols. 1998. Endovascular presence of *Chlamydomphila pneumoniae* DNA is a generalized phenomenon in atherosclerotic vascular disease. *Atherosclerosis*; 140 (Suppl. 1): S25-S30.

Madico G, Quinn TC, Boman J y Gaydos CA. 2000. Touchdown enzyme time release-PCR for detection and identification of *Chlamydomphila trachomatis*, *C. pneumoniae*, and *C. psittaci* using the 16S and 16S-23S spacer rRNA genes. *J Clin Microbiol*; 38: 1085-93.

Malinverni R, Kuo CC, Campbell LA y Grayston JT. 1995. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *J Infect Dis*; 172: 593-4.

Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. 2004. Principles and practice of infectious diseases. 6th edition. Churchill Livingstone. New York, EEUU.

Matsumoto A y Manire GP. 1970. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol*; 101: 278-85.

Maurin M, Etienne FJ y Raoult D. 1997. Serological cross-reactions between *Bartonella* y *Chlamydia* species: implications for diagnosis. *J Clin Microbiol*; 35: 2283-7.

Mayr M, Metzler B, Kiechl S y cols. 1999. Endothelial cytotoxicity mediated by serum antibodies to heat shock proteins of *Escherichia coli* and *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation*; 99: 1560-6.

McClenaghan M, Honeycombe JR, Bevan BJ y cols. 1988. Distribution of plasmid sequences in avian and mammalian strains of *Chlamydia psittaci*. *J Gen Microbiol*; 134: 559-65.

Meijer A, van der Vliet JA, Roholl PJM y cols. 1999. *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms-abundance of membrane components in the absence of heat shock protein 60 and DNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 19: 2680-6.

Miller EM y Nickoloff JA. 1995. *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol*; 47: 105-13.

Miller J. 1972. Experiments in Molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EEUU.

Miyashita N, Fukano H, Hara H y cols. 2002. Recurrent pneumonia due to persistent *Chlamydia pneumoniae* infection. *Intern. Med*; 41: 30-3.

Miyashita N, Kanamoto Y y Matsumoto A. 1993. The morphology of *Chlamydia pneumoniae*. *J Med Microbiol*; 38: 418-25.

Miyashita N, Niki Y, Nakajima M y cols. 1998. *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with diffuse panbronchiolitis and COPD. *Chest*; 114: 969-71.

Moazed TC, Campbell LA, Rosenfield ME y cols. 1999. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in alipoprotein E-deficient mice. *J Infect Dis*; 180: 238-41.

Montigiani S, Falugi F, Scarselli M y cols. 2002. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*; 70: 368-79.

Morozumi M, Nakayama E, Iwata S y cols. 2006. Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol*; 44: 1440–6.

Moulder JW. 1984. Looking at *Chlamydiae* without looking at their hosts. *Am Soc Microbiol News*; 50: 353-62.

Moulder JW. 1991. Interaction of *Chlamydiae* and host cells in vitro. *Microbiol Rev*; 55: 143-90.

Murata M, Azuma Y, Miura K y cols. 2007 Chlamydial SET domain protein function as a histone methyltransferase. *Microbiology*; 153: 585-92.

Mygind P, Christiansen G, Persson K y cols. 1998. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clin Diagn Lab Immunol*; 5: 313-8.

Mygind T, Vandahl B, Pedersen AS y cols. 2004. Identification of an *in vivo* CD4+ T cell mediated response to polymorphic membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae* during experimental infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*; 40: 129-37.

Newhall WJ. 1987. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*; 55: 162-8.

Ohya K, Takahara Y, Kuroda E y cols. 2008. *Chlamydophila felis* CF0218 is a novel TMH family protein with potential as a diagnostic antigen for diagnosis of *C. felis* infection. *Clin Vaccine Immunol*; 15:1606-15.

Ossewaarde JM y Meijer A. 1999. Molecular evidence for the existence of additional members of the *Chlamydiales*. *Microbiology*; 145: 411-7.

Ozanne G y Lefebvre J. 1992. Specificity of the microimmunofluorescence assay for the serodiagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infections. *Can J Microbiol*; 38: 1185-9.

Paldanius M, Juvonen R, Leinonen M y cols. 2007. Asthmatic persons are prone to the persistence of *Chlamydia pneumoniae* antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 59: 117-22.

Peeling RW, Wang SP, Grayston JT y cols. 2000. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis*; 181(Suppl 3): S426–S429.

Pérez Melgosa M, Kuo CC y Campbell LA. 1994. Isolation and characterization of a gene encoding a *Chlamydia pneumoniae* 76-kilodalton protein containing a species-specific epitope. *Infect Immun*; 62: 880-6.

Pérez Melgosa M, Kuo CC, Campbell LA. 1991. Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*; 59: 2195-9.

Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. 1993. Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications. American Society for Microbiology. Washington, EEUU.

Peterson EM, de la Maza LM, Brade L y Brade H. 1998. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*; 66: 3848-55.

Puolakkainen M, Kuo CC, Shor A y cols. 1993. Serological response to *Chlamydia pneumoniae* in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. *J Clin Microbiol*; 31: 2212-14.

Puolakkainen M, Parker J, Kuo CC y cols. 1994. Characterization of a *Chlamydia pneumoniae* epitope recognized by species specific monoclonal antibodies, p. 185-8. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, Saikku P, Schachter J, Stamm WE y Stephens RS. (eds.) *Chlamydial infections*. Societa Editrice Esculapio. Bolonia, Italy.

Puolakkainen M, Parker J, Kuo CC y cols. 1995. Further characterization of *Chlamydia pneumoniae* specific monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol*; 39: 551-4.

Radloff R, Bauer W y Vinograd J. 1967. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci*; 57: 1514-21.

Ramirez JA. 1996. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The *Chlamydia pneumoniae*/Atherosclerosis Study Group. *Ann Intern Med*; 125: 979-82.

Read TD, Brunham RC, Shen C y cols. 2000. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Res*; 28: 1397-406.

Redecke V, Dalhoff K, Bohnet S y cols. 1998. Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and Human Alveolar Macrophages: Infection and Inflammatory Response. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 19: 721-727.

Rockey DD, Viratyosin W, Bannantine JP y cols. 2002. Diversity within inc genes of clinical *Chlamydia trachomatis* variant isolates that occupy non-fusogenic inclusions. *Microbiology*; 148: 2497-505.

Rosenberg AH, Lade BN, Chui DS y cols. 1987. Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene*; 56: 125-35.

Saikku P, Leinonen M, Mattila K y cols. 1988. Serological evidence of an association of a novel *Chlamydia*, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. *Lancet*; 2: 983-6.

Saikku P, Wang SP, Kleemola M y cols. 1985. An epidemic of mild pneumonia due to an unusual strain of *Chlamydia psittaci*. *J Infect Dis*; 151: 832-9.

Sambrook J y Russell D. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor, CSH. New York, EEUU.

Sharp PA, Sugden B y Sambrook J. 1973. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry*; 12: 3055-63.

Shirai M, Hirakawa H, Ouchi K y cols. 2000. Comparison of outer membrane protein genes *omp* and *pmp* in the whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* isolates from Japan and the United States. *J Infect Dis*; 181: 524-7.

Shor A, Kuo CC y Patton DL. 1992. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. *S Afr Med J*; 82: 158-61.

Stephens RS y Lammel CJ. 2001. *Chlamydia* outer membrane protein discovery using genomics. *Curr Opin Microbiol*; 4: 16-20.

Stephens RS, Kalman S, Lammel C y cols. 1998. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*; 282: 754-9.

Stephens RS, Koshiyama K, Lewis E y Kubo A. 2001. Heparin-binding outer membrane protein of *Chlamydiae*. *Mol Microbiol*; 40: 691-9.

Stephens RS. 1999. *Chlamydia*: Intracellular biology, pathogenesis and immunity. ASM Press. Washington, EEUU.

Stratton WC y Mitchel MW. 1997. The pathogenesis of Systemic *Chlamydial* Infections: Theoretical Considerations of Host Cell Energy Depletion and Its Metabolic consequences. *AIDIEX*; 16: 33-40.

Studier FW y Moffatt BA. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*; 189: 113-30.

Studier FW, Rosenberg AH y Dunn JJ. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth Enzymol*; 185: 60-89.

Subtil A, Parsot C y Dautry-Varsat A. 2001. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol*; 39: 792-800.

Sueur JM, Beaumont K, Cabioch T y cols. 2006. Diagnostic value of an ELISA using a recombinant 54-kDa species-specific protein from *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*; 12:470-7.

Taylor HR, Maclean IW, Brunham RC y cols. 1990. Chlamydial heat shock proteins and trachoma. *Infect Immun*; 58: 3061-3.

Thom DH, Grayston JT, Campbell LA y cols. 1994. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 13: 785-92.

Thomas M, Wong Y, Thomas D y cols. 1999. Relation between direct detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in human coronary arteries at postmortem examination and histological severity (Stary Trading of associated atherosclerotic plaque). *Circulation*; 99: 2733-6.

Thorpe C, Edwards L, Snelgrove R y cols. 2007. Discovery of a vaccine antigen that protects mice from *Chlamydia pneumoniae* infection. *Vaccine*; 25: 2252-60.

Toh H, Miura K, Shirai M y cols. 2003. In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae. *DNA Res*; 10: 9-17.

Vandahl BB, Birkelund S, Demol H y cols. 2001. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis*; 22: 1204-23.

Vandahl BB, Pedersen AS, Gevaert K y cols. 2002. The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC Microbiol*; 2: 36.

Villegas E, Camacho A, Carrillo JA y cols. 2008. Emerging strategies in the diagnosis, prevention and treatment of *Chlamydia pneumoniae* infections. *Expert Opin Ther Patents*; 18; 1175-89.

Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA y cols. 1996. Failure to detect *Chlamydia pneumoniae* in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. *J Infect Dis*; 173: 957-62.

Wolf K, Fischer E, Mead D y cols. 2001. *Chlamydia pneumoniae* major outer membrane protein is a surface-exposed antigen that elicits antibodies primarily directed against conformation-dependent determinants. *Infect Immun*; 69: 3082-91.

Wong KH, Skelton SK y Chan YK. 1992. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol*; 30: 1625-30.

Wong KH, Skelton SK y Chan YK. 1992. Efficient culture of *Chlamydia pneumoniae* with cell lines derived from the human respiratory tract. *J Clin Microbiol*; 30: 1625-30.

Wuppermann FN, Hegemann JH y Jantos CA. 2001. Heparan sulphate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis*; 184: 181-7.

Wyllie S, Longbottom D, Herring AJ y Ashley RH. 1999. Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *FEBS Lett*; 445: 192-6.

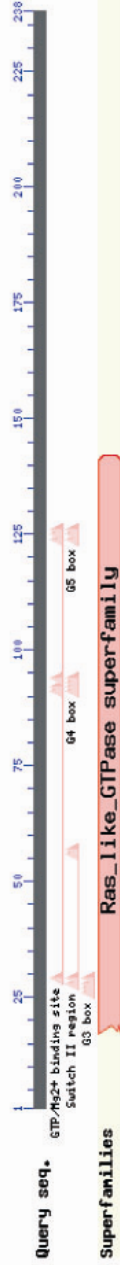
Zhang YX, Stewart SJ y Caldwell. 1989. Protective monoclonal antibodies to *Chlamydia trachomatis* serovar- and serogroup-specific major outer membrane protein determinants. *Infect Immun*; 57: 1621-5.

9. ANEXOS

Thermodesulfotribrio yellowstonii DSM 11347	205 2 hits [bacteria]	DNA topoisomerase I [Thermodesulfotribrio yellowstonii DSM 11347]
Synitrophobacter fumaroxidans MPOB	204 2 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Synitrophobacter fumaroxidans MPOB] >gi
delta proteobacterium MLMS-1	204 6 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [delta proteobacterium MLMS-1] >gi/934523
Eikenella corrodens ATCC 23834	204 2 hits [B-protobacterial]	hypothetical protein EIKCOR01_07448 [Eikenella corrodens ATCC 23834]
Coxiella burnetii RSA_493	204 4 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Coxiella burnetii RSA_493] >gi/2954245
Geobacter uramidifluens RH	202 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Geobacter uramidifluens RH] >gi/1463
Coxiella burnetii MSU Goat O177	202 4 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Coxiella burnetii MSU Goat O177] >gi
Mariiprofundus ferrooxidans PV-1	201 4 hits [protobacterial]	DNA topoisomerase I [Mariiprofundus ferrooxidans PV-1] >gi/158
Desulfococcus oleovorans Hvd3	200 2 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfococcus oleovorans Hvd3] >gi/158
Geobacter sp. FRC-32	199 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Geobacter sp. FRC-32] >gi/221563044fb
Desulfatibacillum alkenivorans AK-01	198 2 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfatibacillum alkenivorans AK-01]
Geobacter hemidjensis Bem	198 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Geobacter hemidjensis Bem] >gi/197088
Pelobacter carbinolicus DSM 2380	197 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Pelobacter carbinolicus DSM 2380] >gi
Leptospirillum sp. Group II LUBA	196 2 hits [bacteria]	topoisomerase I A [Leptospirillum sp. Group II LUBA]
Desulfotribrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774	196 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfotribrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. ATCC 27774]
Desulfuromonas acetoxidans DSM 684	195 2 hits [bacteria]	DNA topoisomerase I [Desulfuromonas acetoxidans DSM 684] >gi
Desulfotribrio vulgarens D94	194 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfotribrio vulgarens subsp. vulgarens D94]
Neisseria meningitidis Z2491	194 4 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Neisseria meningitidis Z2491] >gi/1210
Desulfotribrium autotrophicum HRM2	194 2 hits [d-protobacterial]	TopA [Desulfotribrium autotrophicum HRM2] >gi/272692536gb
Neisseria gonorrhoeae NCCP11945	194 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Neisseria gonorrhoeae NCCP11945] >gi/1
Neisseria gonorrhoeae FA 1090	193 4 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Neisseria gonorrhoeae FA 1090] >gi/597
Beggiatoa sp. PS	192 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Beggiatoa sp. PS] >gi/52075387gb EDN
Desulfotribrio vulgarens str. Hildenborough	192 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfotribrio vulgarens subsp. vulgarens str. Hildenborough]
Desulfotribrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. G20	192 2 hits [B-protobacterial]	hypothetical protein NEIL_AOT_00564 [Neisseria lactamica ATCC 25970]
Desulfotribrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. G20	192 2 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfotribrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. G20]
Neisseria lactamica ATCC 25970	191 2 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Lactella nitroferum 2002] >gi/246018
Desulfotribrio desulfuricans subsp. desulfuricans str. G20	191 2 hits [d-protobacterial]	hypothetical protein NEIL_AOT_00481 [Neisseria flavescens N 25379] >gi/1
Lactella nitroferum 2002	190 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Pelobacter propionicus DSM 23791] >gi/1
Neisseria flavescens NRI 30031/H210	189 4 hits [d-protobacterial]	hypothetical protein DESPFG_02840 [Desulfotribrio piger ATCC 25970] >gi/1
Pelobacter propionicus DSM 2379	189 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Geobacter lovleyi SZ] >gi/1894225724fb
Desulfotribrio piger ATCC 29098	189 2 hits [d-protobacterial]	zinc finger domain-containing protein I [Lawsonia intracellul]
Geobacter lovleyi SZ	189 2 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfotribrio vulgarens str. Miyazaki]
Lawsonia intracellularis PHE/MN1-00	188 2 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Beggiatoa sp. SS] >gi/1521463306gb EDN
Desulfotribrio vulgarens str. Miyazaki E	187 2 hits [d-protobacterial]	topoisomerase I [Mycococcus xanthus]
Beggiatoa sp. SS	187 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]
Mycococcus xanthus	186 4 hits [d-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Desulfotribrio salexiens DSM 26381] >gi
Chromobacterium violaceum ATCC 12472	186 4 hits [B-protobacterial]	DNA topoisomerase I [Chlorobium limicola DSM 2451] >gi/18924
Desulfotribrio salexiens DSM 2638	184 2 hits [green sulfur bacteria]	DNA topoisomerase I [Chlorobaculum parvum NCIB 8327] >gi/19
Chlorobium limicola DSM 245	183 2 hits [green sulfur bacteria]	DNA topoisomerase I [Chlorobium ferrooxidans DSM 13031] >gi/1
Chlorobaculum parvum NCIB 8327	183 2 hits [green sulfur bacteria]	DNA topoisomerase I [Acidobacterium bacterium Ellin345] >gi/94
Chlorobium ferrooxidans DSM 13031	181 2 hits [bacteria]	DNA topoisomerase I [Magnetococcus sp. MC-1] >gi/117610690
Acidobacterium bacterium Ellin345	181 2 hits [bacteria]	DNA topoisomerase I [Chloroherpeton thalassium ATCC 35110]
Magnetococcus sp. MC-1	180 2 hits [green sulfur bacteria]	DNA topoisomerase I [Chloroherpeton thalassium ATCC 35110]
Chloroherpeton thalassium ATCC 35110		

GTPasa

Dominios conservados detectados por la base de datos del NCBI con el programa BLAST.



Informe homología

- Bacteria**
- [Chlamydia pneumoniae CWL029](#)
 - [Chlamydia abortus S26/3](#)
 - [Chlamydia caviae](#)
 - [Chlamydia felis FeC-56](#)
 - [Chlamydia muridarum Nigg](#)
 - [Chlamydia trachomatis](#)
 - [Candidatus Proteochlamydia amoebophila LUWE25](#)
 - [Yersinia enterocolitica ATCC BAA-548](#)
 - [Chthonobacter flavus Ellin428](#)
 - [Alkaliphilus metalliredigens OYME](#)
 - [Fingoldia magna ATCC 29328](#)
 - [Candidatus Desulfosphaerium MP104C](#)
 - [Clostridium bartlettii DSM 16795](#)
 - [Eubacterium hallii DSM 3353](#)
 - [Clostridium acetobutylicum](#)
 - [Clostridium sporogenes ATCC 15579](#)
 - [Ruminococcus gnavus ATCC 29149](#)
 - [Clostridium botulinum C str. Eklund](#)
 - [Dorea formicigenerans ATCC 27755](#)
 - [Naeranaerobius thermophilus JW/NM-WN-LF](#)
 - [Clostridium nexile DSM 1787](#)
 - [Clostridium tetani](#)
 - [Eubolpusium sp. 'N.1. morphotype B'](#)
 - [Clostridium beijerinckii NCIMB 8052](#)
 - [Clostridium novyi NT](#)
 - [Clostridium perfringens](#)

- [bacteria]**
- [432 2 bits \[chlamydia\]](#)
 - [367 2 bits \[chlamydia\]](#)
 - [361 1 bit \[chlamydia\]](#)
 - [358 3 bits \[chlamydia\]](#)
 - [325 2 bits \[chlamydia\]](#)
 - [320 1 bit \[chlamydia\]](#)
 - [165 6 bits \[chlamydia\]](#)
 - [135 2 bits \[bacteria\]](#)
 - [129 4 bits \[yerrucoerobia\]](#)
 - [151 6 bits \[firmicutes\]](#)
 - [149 4 bits \[firmicutes\]](#)
 - [145 4 bits \[firmicutes\]](#)
 - [145 2 bits \[firmicutes\]](#)
 - [144 2 bits \[firmicutes\]](#)
 - [143 4 bits \[firmicutes\]](#)
 - [142 4 bits \[firmicutes\]](#)
 - [142 2 bits \[firmicutes\]](#)
 - [141 4 bits \[firmicutes\]](#)
 - [140 4 bits \[firmicutes\]](#)
 - [140 2 bits \[firmicutes\]](#)
 - [140 2 bits \[firmicutes\]](#)
 - [140 6 bits \[firmicutes\]](#)
 - [140 5 bits \[firmicutes\]](#)
 - [139 2 bits \[firmicutes\]](#)

- [GTP-binding protein EneA \[Chlamydia pneumoniae CWL029\]](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Chlamydia abortus S26/3\] >e|33](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Chlamydia caviae GPIC\] >e|33](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Chlamydia felis FeC-56\] >e|141](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Chlamydia muridarum Nigg\] >e|141](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Chlamydia trachomatis DUW-3/CX\]](#)
- [hypothetical protein pc H80 \[Candidatus Proteochlamydia amoebophila LUWE25\]](#)
- [small GTP-binding protein \[Yersinia enterocolitica ATCC BAA-548\]](#)
- [small GTP-binding protein \[Chthonobacter flavus Ellin428\]](#)
- [small GTP-binding protein \[Alkaliphilus metalliredigens OYME\]](#)
- [GTP-binding protein \[Fingoldia magna ATCC 29328\] >e|16783](#)
- [small GTP-binding protein \[Candidatus Desulfosphaerium MP104C\]](#)
- [hypothetical protein CLOBAR_02788 \[Clostridium bartlettii D\]](#)
- [hypothetical protein EUBHAL_02283 \[Eubacterium hallii DSM 3353\]](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Clostridium acetobutylicum ATCC 8\]](#)
- [hypothetical protein CLOSP0_02479 \[Clostridium sporogenes ATCC 15579\]](#)
- [hypothetical protein RUMGNA_02842 \[Ruminococcus gnavus ATCC 29149\]](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Clostridium botulinum C str. Eklund\]](#)
- [hypothetical protein DORFOR_06598 \[Dorea formicigenerans ATCC 27755\]](#)
- [small GTP-binding protein \[Naeranaerobius thermophilus JW/NM-WN-LF\]](#)
- [hypothetical protein CLONEX_01409 \[Clostridium nexile DSM 1787\]](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Clostridium tetani DSM 4683\]](#)
- [small GTP-binding protein \[Eubolpusium sp. 'N.1. morphotype B'\]](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Clostridium beijerinckii NCIMB 8052\]](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Clostridium novyi NT\] >e|1662243](#)
- [GTP-binding protein EneA \[Clostridium perfringens str. 13\]](#)

Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum	139 2 bits [fusobacteria]	GTP-binding protein [Fusobacterium nucleatum subsp. nucleat
Bacteroides capillosus ATCC 29799	139 4 bits [CPB group bacteria]	hypothetical protein BACCAP_02115 [Bacteroides capillosus A
Coprococcus eutactus ATCC 27759	139 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein COPEUT_00150 [Coproccoccus eutactus ATC
Clostridium sp. SS21	139 2 bits [firmicutes]	hypothetical protein CLOSS21_02551 [Clostridium sp. SS21]
Ruminococcus torques ATCC 27756	139 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein RUMTOR_02405 [Ruminococcus torques ATC
Anaerostipes stercorihominis DSM 17244	139 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein ANASTE_01189 [Anaerostipes stercorihom
Clostridium leptum DSM 753	139 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein CLOLEP_00451 [Clostridium leptum DSM 7
Clostridium butulinum E3 str. Alaska E43	138 4 bits [firmicutes]	ribonome-associated GTPase EngA [Clostridium butulinum E3 s
Clostridium hiranonis DSM 13275	138 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein CLOHIR_01059 [Clostridium hiranonis DS
Roseburia intestinalis 11482	138 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein ROSINT1182_02009 [Roseburia intestinal
Clostridium scindens ATCC 35704	138 4 bits [firmicutes]	putative GTP-binding protein [Clostridium difficile 6301 >g
Clostridium difficile 630	138 4 bits [firmicutes]	GTP-binding protein [Fusobacterium nucleatum subsp. vincenti
Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii ATCC 49756	138 4 bits [fusobacteria]	small GTP-binding protein [Alkaliphilus oremlandii Ohilj As]
Alkaliphilus oremlandii Ohilj As	137 6 bits [firmicutes]	possible GTPase [Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphu
Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum ATCC 10953	137 4 bits [fusobacteria]	hypothetical protein ANACAC_01905 [Anaerostipes caecae DSM
Anaerostipes caecae DSM 14662	137 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein COLAER_00710 [Collinsella aerofaciens
Collinsella aerofaciens ATCC 25986	137 2 bits [high GC Gram-]	hypothetical protein DORLON_00710 [Dorea longicatena DSM 13
Dorea longicatena DSM 13814	136 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein RUM_LAC_01725 [Ruminococcus lactaris AT
Ruminococcus lactaris ATCC 29176	136 4 bits [firmicutes]	small GTP-binding protein [Pelodictyon phaeocellulitratiforme
Pelodictyon phaeocellulitratiforme BU-1	136 2 bits [green sulfur bacteria]	GTP-binding protein EngA [Clostridium butyricum 3521] >g 1
Clostridium butyricum 3521	135 4 bits [firmicutes]	similar to GTP-binding protein [Candidatus Kuenenia stultica
Candidatus Kuenenia stulticantis	135 1 bit [planctomycetes]	GTP-binding protein EngA [Mycoplasma capricolum subsp. capr
Mycoplasma capricolum subsp. capricolum ATCC 27343	135 6 bits [mycoplasmas]	hypothetical protein EUBVEN_01262 [Eubacterium ventriosum A
Eubacterium ventriosum ATCC 27560	134 4 bits [firmicutes]	GTP-binding protein EngA [Mycoplasma mycoides subsp. mycoid
Mycoplasma mycoides subsp. mycoides LC str. GM12	133 2 bits [mycoplasmas]	small GTP-binding protein [Clostridium thermoceillum ATCC 27
Clostridium thermoceillum ATCC 27405	133 6 bits [firmicutes]	GTP-binding protein EngA [Clostridium kluyveri DSM 5551] >g
Clostridium kluyveri DSM 555	132 6 bits [firmicutes]	Small GTP-binding protein domain GTP-binding [Chlorobium l
Chlorobium ferrooxidans DSM 13031	132 2 bits [green sulfur bacteria]	GTP-binding protein EngA [Chlorobium phaeobacteroides DSM 2
Chlorobium phaeobacteroides DSM 266	132 2 bits [green sulfur bacteria]	hypothetical protein ANACOL_03699 [Anaerotruncus colihomii
Anerotruncus colihomii DSM 17241	132 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein CLOSTMETH_02672 [Clostridium methylipso
Clostridium methyliposum DSM 5376	132 1 bit [firmicutes]	phosphoglycerate dehydrogenase-related protein [Streptococ
Streptococcus pneumoniae SP9-B568	131 2 bits [firmicutes]	GTP-binding protein EngA [Streptococcus pneumoniae TIGR 4] >
Streptococcus pneumoniae	131 1 bit [firmicutes]	phosphoglycerate dehydrogenase-related protein [Streptococ
Streptococcus pneumoniae SP3-B571	131 2 bits [firmicutes]	GTP-binding protein EngA [Thermoanaerobacter tengcongensis
Thermoanaerobacter tengcongensis MB4	131 4 bits [firmicutes]	GTP-binding protein EngA [Thermoanaerobacter tengcongensis
Clostridium thermoceillum ATCC 27405	131 2 bits [firmicutes]	putative GTPase [Carboxydibrachium pacificum DSM 12653] >g
Carboxydibrachium pacificum DSM 12653	130 4 bits [firmicutes]	small GTP-binding protein [Desulfotomaculum redlebens M1-1]
Desulfotomaculum redlebens M1-1	130 6 bits [firmicutes]	small GTP-binding protein [Sulfolobus drakeboultoni sp. Y03/AOP1
Sulfolobus drakeboultoni sp. Y03/AOP1	130 6 bits [fauificales]	small GTP-binding protein [Desulfotomaculum redlebens DCB
Desulfotomaculum redlebens DCB2	130 4 bits [firmicutes]	small GTP-binding protein [Chlorobium limicola DSM 2451] >g
Chlorobium limicola DSM 245	130 4 bits [firmicutes]	hypothetical protein STRINF_02160 [Streptococcus infantaru
Streptococcus infantarius subsp. infantarius ATCC BAA-102	130 2 bits [firmicutes]	small GTP-binding protein [Chloroperpeton thalassium ATCC 3
Chloroperpeton thalassium ATCC 35110	130 2 bits [d-proteobacteria]	small GTP-binding protein [Anaeromyxobacter dehalogenans 2C
Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-1	130 4 bits [mycoplasmas]	putative gtp-binding protein enea [Spiroplasma citri]
Spiroplasma citri	130 1 bit [mycoplasmas]	GTP-binding protein EngA [Streptococcus suis 052YH33] >g 1
Streptococcus suis 052YH33	129 3 bits [firmicutes]	

LfuB

No tiene dominios conservados detectados por la base de datos del NCBI con el programa BLAST.

Informe homología

Bacteria	[bacteria]	
Chlamydomophila pneumoniae	198 1 bit [chlamydiaceae]	late transcription unit B protein [Chlamydomophila pneumoniae]
Chlamydomophila felis FeC-36	110 2 bits [chlamydiaceae]	late transcription unit B protein [Chlamydomophila felis FeC]
Chlamydomophila cervinae GPIC	106 2 bits [chlamydiaceae]	LfuB protein [Chlamydomophila cervinae GPIC] >gi 29834576 gb AA
Chlamydomophila abortus S2/63	95 2 bits [chlamydiaceae]	late transcription unit B protein [Chlamydomophila abortus S2]
Chlamydia trachomatis D/UW-3/CX	67 2 bits [chlamydiaceae]	late transcription unit B protein [Chlamydia trachomatis D/
Chlamydia trachomatis	67 2 bits [chlamydiaceae]	late transcription unit B protein [Chlamydia trachomatis D/
Chlamydia muridarum (agent of mouse pneumon...)	64 1 bit [chlamydiaceae]	hypothetical protein TC0353 [Chlamydia muridarum Niag] >gi
Pseudomonas aeruginosa	64 1 bit [epsilon-proteobacteria]	azoreclease [Pseudomonas aeruginosa]
Clostridium botulinum	61 2 bits [firmicutes]	Chain A, Crystal Structure Of Recombinant Botulinum Neuroto
Brevibacillus laterosporus	60 1 bit [firmicutes]	azoreclease [Brevibacillus laterosporus]
Cyanobacterium sp. ATCC 51142	55 2 bits [cyanobacteria]	Chain A, Crystal Structure Of A Lumenal Pentapeptide Repeat
Mycobacterium tuberculosis	47 4 bits [high GC Gram+]	Chain A, Crystal Structure Of The SecA Protein, Translocatio
Homo sapiens (man)	62 9 bits [primates]	Chain A, Crystal Structure Of Human Mitotic Checkpoint Kin
Triticum aestivum (common wheat)	61 1 bit [monocots]	Chain A, Crystal Structure Of Hexameric Beta-Glucosidase In
Spinacia oleracea	61 1 bit [eudicots]	Chain A, Structure Of Spinach Nitrite Reductase
Saccharomyces cerevisiae (yeast)	61 12 bits [ascomycetes]	Chain A, Crystal Structure Of Yeast Acetohydroxyacid Synth
Mus musculus (mouse)	60 5 bits [rodents]	Chain A, Murine Apoptosis-Inducing Factor (AIF) >gi 2066374
Pyrobaculum aerophilum	58 1 bit [ferroplasma]	Chain A, 3d Structure Of The E-beta Subunit Of Pyruvate Deh
Arabidopsis thaliana (thale-cress)	46 1 bit [eudicots]	Chain A, Crystal Structure Of Chloroplast Psa From Arabido

Exinucleasa ABC subunidad C

Dominios conservados detectados por la base de datos del NCBI con el programa BLAST.



Informe homologías

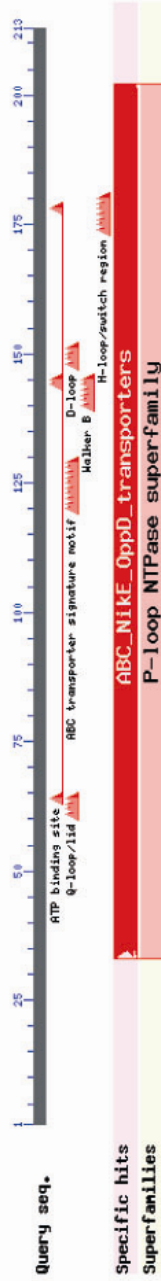
Accession	Species	Hit	Score	Expect	Ident	Positives	Negatives	Query cover	Accession	Species	Hit	Score	Expect	Ident	Positives	Negatives	Query cover
543	Bacteria	Chlamydia pneumoniae	1	0	100	1	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Chlamydia pneumoniae CWL029]								
377	Bacteria	Chlamydia caviae	1	0	100	1	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Chlamydia caviae GPIC] >gi								
374	Bacteria	Chlamydia felis	3	0	100	3	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Chlamydia felis Fe/C-56] >g								
370	Bacteria	Chlamydia abortus	1	0	100	1	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Chlamydia abortus S2/63] >g								
317	Bacteria	Chlamydia muridarum (agent of mouse pneumon...)	1	0	100	1	0	100	RecName: Full=UvrABC system protein C; Short=Protein uvrC;								
316	Bacteria	Chlamydia trachomatis	19	0	100	19	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Chlamydia trachomatis D/UW-5/CX								
167	Candidatus	Protochlamydia amoebophila LUWE25	3	0	100	3	0	100	putative excinucleasa ABC subunit C [Candidatus Protochlamy								
139	Syntrichobacter	funaroxidans MPOB	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Syntrichobacter funaroxidans M								
136	Geobacter	uramireducens R4	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Geobacter uramireducens R4]								
135	Pelobacter	propionicus DSM 2379	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Pelobacter propionicus DSM 237								
134	Magnetococcus	sp. MC-1	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Magnetococcus sp. MC-1] >gi117								
132	Stigmatella	aurantiaca DW4/3-1	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Stigmatella aurantiaca DW4/3-1								
130	Desulfatibacillum	alkalicorans AK-01	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Desulfatibacillum alkalicorans								
129	Clostridium	botulinum Pf	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Clostridium botulinum Pf] >gi								
128	Geobacter	hemidjensis Ben	1	0	100	1	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Geobacter hemidjensis Ben] >g								
128	Geobacter	sp. M21	1	0	100	1	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Geobacter sp. M21] >gi190952								
127	Clostridium	novyi NT	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Clostridium novyi NT] >gi18903								
127	Nitrosococcus	oceani AFC27	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Nitrosococcus oceani ATCC 19707								
126	Desulfobacterium	autotrophicum HRM2	2	0	100	2	0	100	UvrC [Desulfobacterium autotrophicum HRM2] >gi223692145 gb								
126	Clostridium	botulinum B1 str. Okra	2	0	100	2	0	100	hypothetical protein CLOSP0_00198 [Clostridium sporosenes A								
125	Clostridium	sporosenes ATCC 15579	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Alkaliphilus oremlandii OhLAs]								
124	Alkaliphilus	oremlandii OhLAs	3	0	100	3	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Clostridium bejerinckii NCIMB								
124	Clostridium	bejerinckii NCIMB 8052	3	0	100	3	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Clostridium botulinum C str. E								
123	Clostridium	botulinum C str. EKund	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Candidatus Desulfonitrospira								
123	Candidatus	Desulfonitrospira	2	0	100	2	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Candidatus Desulfonitrospira								
122	Anaeromyxobacter	sp. Fv 109-5	3	0	100	3	0	100	excinucleasa ABC subunit C [Anaeromyxobacter sp. Fv 109-5]								

Oceanicallis alexandrii HTCC2633	excinuclease ABC subunit C Oceanicallis alexandrii HTCC2633
Synitrophilus aciditrophicus SB	hypothetical protein ANHYDRO_00601 Anserococcus hydrogenalis
Anserococcus hydrogenalis DSM 7454	excinuclease ABC, C subunit Anserococcus hydrogenalis DSM 7454
Aneromyxobacter sp. K	excinuclease ABC subunit C Geobacter metallireducens GS-15
Geobacter metallireducens GS-15	excinuclease ABC, C subunit Geobacter sp. FRC-321 >=ajl2215
Geobacter sp. FRC-32	excinuclease ABC subunit C Bdellovibrio bacteriovorus HD10
Bdellovibrio bacteriovorus	excinuclease ABC, C subunit Epulopiscium sp. N.L. morphot
Epulopiscium sp. N.L. morphotype B'	excinuclease ABC, C subunit Desulfococcus olivovorans Hsd3
Desulfococcus olivovorans Hsd3	excinuclease ABC, C subunit Prosthecochloris aestuarii DSM
Prosthecochloris aestuarii DSM 271	excinuclease ABC, C subunit Desulfotomomas acetoxidans DSM
Desulfotomomas acetoxidans DSM 684	excinuclease ABC, C subunit Aneromyxobacter dehalogenans 2
Aneromyxobacter dehalogenans 2CP-C	excinuclease ABC, C subunit Dehalococcoides ethenogenes 19
Dehalococcoides ethenogenes 19S	excinuclease ABC, C subunit Dehalococcoides sp. VS1 >=ajl15
Dehalococcoides sp. VS	excinuclease ABC, C subunit Pelobacter carbinolicus DSM 23
Pelobacter carbinolicus DSM 2380	hypothetical protein CLOBOL_04811 Clostridium boltae ATCC
Clostridium boltae ATCC BAA-613	excinuclease ABC, C subunit Clostridiales bacterium 1_7_47
Clostridiales bacterium 1_7_47 FAA	hypothetical protein CLORAM_01347 Clostridium ramosum DSM
Clostridium ramosum DSM 1402	excinuclease ABC subunit C Clostridium difficile 630 >=ajl
Clostridium difficile 630	excinuclease ABC, C subunit Herpetosiphon aurantiacus ATCC
Herpetosiphon aurantiacus ATCC 23779	excinuclease ABC, C subunit Chloroflexus aurantiacus J-10-
Chloroflexus aurantiacus J-10-E1	excinuclease ABC, C subunit Chloroflexus aurantiacus J-10-
Chloroflexus sp. Y-400-J1	excinuclease ABC, C subunit Thermomicrobium roseum DSM 515
Thermomicrobium roseum DSM 5159	excinuclease ABC, C subunit Plesiocystis pacifica SIR-1 >
Plesiocystis pacifica SIR-1	excinuclease ABC, C subunit Rickettsiella arylli >=ajl1591
Rickettsiella arylli	excinuclease ABC, C subunit Roseiflexus sp. RS-11 >=ajl1485
Roseiflexus sp. RS-1	excinuclease ABC subunit C Bartonella bacilliformis KC583
Bartonella bacilliformis KC583	excinuclease ABC subunit C Chromohalobacter salicivivans DSM
Chromohalobacter salicivivans DSM 3043	excinuclease ABC subunit C Bartonella henselae str. Houston
Bartonella henselae	excinuclease ABC subunit C Clostridium acetobutylicum ATCC
Clostridium acetobutylicum	hypothetical protein DORFOR_00713 Dorea formicigenerans AT
Dorea formicigenerans ATCC 27755	excinuclease ABC subunit C Hyphomonas neptunium ATCC 15444
Hyphomonas neptunium ATCC 15444	hypothetical protein MITSMUL_00490 Mitsunokella mullaeida D
Mitsunokella mullaeida DSM 20544	UvrABC system protein C Streptococcus uberis 0140J >=ajl22
Streptococcus uberis 0140J	
122 2 his (a-protobacteria)	
122 2 his (d-protobacteria)	
121 2 his (firmicutes)	
120 2 his (d-protobacteria)	
119 2 his (d-protobacteria)	
119 2 his (d-protobacteria)	
117 1 hit (d-protobacteria)	
117 1 hit (firmicutes)	
117 2 his (d-protobacteria)	
116 2 his (green sulfur bacteria)	
116 2 his (d-protobacteria)	
116 2 his (d-protobacteria)	
115 2 his (GNS bacteria)	
115 2 his (GNS bacteria)	
115 2 his (d-protobacteria)	
115 2 his (firmicutes)	
115 1 hit (firmicutes)	
114 2 his (firmicutes)	
114 2 his (firmicutes)	
114 2 his (GNS bacteria)	
114 2 his (GNS bacteria)	
114 2 his (GNS bacteria)	
114 2 his (GNS bacteria)	
113 2 his (d-protobacteria)	
113 2 his (a-protobacteria)	
113 2 his (GNS bacteria)	
112 2 his (a-protobacteria)	
112 2 his (a-protobacteria)	
112 1 hit (a-protobacteria)	
112 1 hit (firmicutes)	
112 2 his (firmicutes)	
112 2 his (a-protobacteria)	
111 2 his (firmicutes)	
111 2 his (firmicutes)	

<u>Helicobacter mobilis</u>		SarA-binding protein [Helicobacter mobilis]
<u>Polioromonas raphidolalicivivans C12</u>	66 1 hit [firmicutes]	SarA-binding protein [Polioromonas raphidolalicivivans C12] >g
<u>Salinispora arenicola CNS-205</u>	66 2 hits [β-proteobacteria]	SarA-binding protein [Salinispora arenicola CNS-205] >g 18
<u>Chlorobium phaeobacteroides DSM 266</u>	66 3 hits [high GC Gram+]	SarA-binding protein [Chlorobium phaeobacteroides DSM 266]
<u>Synechococcus sp. JA-3-3/Ab</u>	66 3 hits [green sulfur bacteria]	SarA-binding protein [Synechococcus sp. JA-3-3/Ab] >g 12350
<u>Lactobacillus reuteri 100-23</u>	65 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus reuteri DSM 20016] >g
<u>Salinispora tropica CNB-440</u>	64 3 hits [high GC Gram+]	SarA-binding protein [Salinispora tropica CNB-440] >g 1890
<u>Clostridium sp. SS21</u>	64 2 hits [firmicutes]	hypothetical protein CLOSS21_02446 [Clostridium sp. SS21]
<u>Crocospheera watsonii WH 8501</u>	64 2 hits [cyanobacteria]	SarA protein [Crocospheera watsonii WH 8501] >g 67857169g
<u>Pelotectyon phaeocelluloseformis BL-1</u>	64 2 hits [green sulfur bacteria]	SarA-binding protein [Pelotectyon phaeocelluloseformis BL-1]
<u>Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1</u>	63 1 hit [β-proteobacteria]	SarA-binding protein [Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1]
<u>Chloroflexus aggregans DSM 9485</u>	63 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Chloroflexus aggregans DSM 9485] >g
<u>Clostridium botulinum B str. Eklund 17B</u>	63 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Clostridium botulinum B str. Eklund 17B]
<u>Polioromonas sp. JS666</u>	63 3 hits [β-proteobacteria]	SarA-binding protein [Polioromonas sp. JS666] >g 122967789
<u>Synechococcus sp. PCC 7335</u>	63 1 hit [cyanobacteria]	SarA-binding protein [Synechococcus sp. PCC 7335]
<u>Anaerotruncus colthomii DSM 17241</u>	63 2 hits [firmicutes]	hypothetical protein ANACOL_03386 [Anaerotruncus colthomii]
<u>Lactobacillus rhamnosus HN001</u>	63 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus rhamnosus HN001] >g 19
<u>Lactobacillus casei ATCC 334</u>	63 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus casei ATCC 334] >g 191
<u>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulg</u>	63 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulg]
<u>Lactobacillus brevis ATCC 307</u>	63 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus brevis ATCC 307] >g 12
<u>Acidothermus cellulolyticus 11B</u>	66 3 hits [high GC Gram+]	SarA-binding protein [Acidothermus cellulolyticus 11B] >g
<u>Brvantiella formatexiens DSM 14469</u>	62 2 hits [firmicutes]	hypothetical protein BRVFOR_04623 [Brvantiella formatexiens]
<u>Parvimonas micro ATCC 33270</u>	62 2 hits [firmicutes]	hypothetical protein PPMJC_01472 [Parvimonas micro]
<u>Lyngbya sp. PCC 8106</u>	62 2 hits [cyanobacteria]	SarA-binding protein [Lyngbya sp. PCC 8106] >g 19453879g
<u>Lactobacillus johnsonii</u>	62 1 hit [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus johnsonii NCC 533] >g
<u>Lactobacillus gasseri ATCC 33323</u>	62 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Lactobacillus gasseri ATCC 33323] >g
<u>Pelobacter carbinolicus DSM 2380</u>	62 3 hits [β-proteobacteria]	SarA-binding protein [Pelobacter carbinolicus DSM 2380] >g
<u>Clostridium thermoacellum ATCC 27405</u>	62 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Clostridium thermoacellum ATCC 27405]
<u>Anaerocellum thermophilum DSM 6725</u>	62 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Anaerocellum thermophilum DSM 6725] >
<u>Bacillus coagulans 36D1</u>	62 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Bacillus coagulans 36D1] >g 12449543
<u>Bacillus cereus subsp. cytotoxicus NVH 391-98</u>	62 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Bacillus cereus subsp. cytotoxicus NVH]
<u>Ralstonia eutropha H16</u>	62 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Ralstonia eutropha H16] >g 122946822
<u>Frankia sp. Ce13</u>	62 3 hits [high GC Gram+]	SarA-binding protein [Frankia sp. Ce13] >g 12373756sp102
<u>Comprotherrhabacter proteolyticus DSM 5265</u>	61 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Comprotherrhabacter proteolyticus DSM 5]
<u>Comamonas testosteroni KF-1</u>	61 2 hits [β-proteobacteria]	SarA-binding protein [Comamonas testosteroni KF-1] >g 22107
<u>Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338</u>	61 3 hits [high GC Gram+]	SarA-binding protein [Saccharopolyspora erythraea NRRL 2338]
<u>Caldicellulosiruptor saccharovorans DSM 8903</u>	61 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Caldicellulosiruptor saccharovorans]
<u>Clostridium cellulolyticum H10</u>	61 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Clostridium cellulolyticum H10] >g 2
<u>Pelobacter sp. BAL-32</u>	61 2 hits [CFB group bacteria]	SarA-binding protein [Pelobacter sp. BAL-32] >g 149231178g
<u>Pedococcus pentosaceus ATCC 25745</u>	61 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Pedococcus pentosaceus ATCC 25745] >
<u>Chlorobium parvum NCIB 8327</u>	61 2 hits [green sulfur bacteria]	SarA-binding protein [Chlorobium parvum NCIB 8327] >g 1
<u>Streptococcus infantarius subsp. infantarius ATCC BAA-102</u>	61 2 hits [firmicutes]	hypothetical protein STRINF_01942 [Streptococcus infantarius]
<u>Syntrophobacter fumaroxidans MPOB</u>	61 3 hits [β-proteobacteria]	SarA-binding protein [Syntrophobacter fumaroxidans MPOB] >g
<u>Moorella thermacetica ATCC 39072</u>	61 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Moorella thermacetica ATCC 39072] >g
<u>Streptococcus pneumoniae TIGR4</u>	60 3 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Streptococcus pneumoniae TIGR4] >g 1
<u>Streptococcus pneumoniae SP19-B575</u>	60 2 hits [firmicutes]	SarA-binding protein [Streptococcus pneumoniae TIGR4] >g 1

Transportador de dipéptidos ABC de la ATPasa

Dominios conservados detectados por la base de datos del NCBI con el programa BLAST.



Informe homología

Query seq.	Specific hits	Superfamilies	Información de homología
1	351 2 his (Chlamydia)	Bacteria	peptide ABC transporter ATPase [Chlamydia pneumoniae CW]
25	271 2 his (Chlamydia)	Chlamydia	peptide ABC transporter ATP-binding protein [Chlamydia]
50	264 2 his (Chlamydia)	Chlamydia	nucleative peptide ABC transporter ATP-binding protein [Chlamydia]
75	261 2 his (Chlamydia)	Chlamydia	ABC transporter of dipeptides [Chlamydia felis Fe/C-56]
100	275 17 his (Chlamydia)	Chlamydia	Dpp1 [Chlamydia trachomatis]
125	269 2 his (Chlamydia)	Chlamydia	peptide ABC transporter ATP-binding protein [Chlamydia mur]
150	189 2 his (Chlamydia)	Chlamydia	ATP binding protein, component of oligopeptide permease, og
175	185 1 hit (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	peptide ABC transporter ATP-binding protein [Burkholderia]
200	185 2 his (high GC Gram+)	Firmicutes	oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATPase subunit [Noc]
213	183 2 his (Firmicutes)	Firmicutes	oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein [Bacillus]
	182 1 hit (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	peptide ABC transporter ATP-binding protein [Burkholderia]
	182 2 his (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	ABC-type uncharacterized transport ATPase component [Azorhi]
	180 2 his (Firmicutes)	Firmicutes	oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein [Bacillus]
	179 2 his (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATP-binding protein
	178 2 his (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATPase subunit [Bhr]
	178 4 his (Firmicutes)	Firmicutes	oligopeptide transport ATP-binding protein [Staphylococcus]
	177 2 his (Firmicutes)	Firmicutes	oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein [Oceanobac]
	177 2 his (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	oligopeptide/dipeptide ABC transporter ATP-binding protein
	177 4 his (Firmicutes)	Firmicutes	peptide ABC transporter ATP-binding protein [Staphylococcus]
	177 4 his (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	mutative transport ATP-binding protein [alpha proteobacter]
	176 2 his (Firmicutes)	Firmicutes	oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein [Clostridium bo]
	176 2 his (B-proteobacteria)	B-proteobacteria	oligopeptide ABC transporter ATP-binding protein [Serangium]
	176 2 his (Firmicutes)	Firmicutes	peptide ABC transporter ATP-binding protein [Fusobacterium]
	176 2 his (Firmicutes)	Firmicutes	ABC transporter related [Geobacillus sp. WCH701 >gi11710877]

Bacillus coagulans 36D1	176	2 his	[firmicutes]	ABC transporter related [Bacillus coagulans 36D1] >gii12449
Agrobacterium vitis SH	176	2 his	[alpha-proteobacteria]	ABC transporter nucleotide binding/ATPase protein [oligopep
Paracoccus denitrificans PD1222	174	2 his	[alpha-proteobacteria]	ABC transporter [Paracoccus denitrificans PD1222] >gii1938
Burkholderia pseudomallei 1106a	174	2 his	[beta-proteobacteria]	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein, OppF [Bur
Burkholderia mallei ATCC 23344	174	2 his	[beta-proteobacteria]	hypothetical protein BMA0354.1 [Burkholderia mallei ATCC 2
Bacillus cereus H3081.97	174	2 his	[firmicutes]	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein [Bacillus
Rhizobium leguminosarum bv. trifolii WSM1325	174	4 his	[alpha-proteobacteria]	ABC transporter related [Rhizobium leguminosarum bv. trifol
Sinorhizobium meliloti 1021	174	4 his	[alpha-proteobacteria]	putative transport system ATP-binding ABC transporter prote
Agrobacterium radiobacter K84	174	4 his	[alpha-proteobacteria]	oligopeptide ABC transporter [Agrobacterium radiobacter K84
Burkholderia multivorans CGD1	173	2 his	[beta-proteobacteria]	oligopeptide transport ATP-binding protein, OppF [Burkholder
Pseudomonas syringae pv. syringae B728a	173	2 his	[beta-proteobacteria]	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATP-binding protein
Cellvibrio japonicus Ueda107	173	4 his	[alpha-proteobacteria]	peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Cellvibrio ja
Burkholderia dolosa AU0158	173	2 his	[beta-proteobacteria]	ABC-type oligopeptide transport system ATPase component [Bu
Vibrio angustum S14	173	4 his	[alpha-proteobacteria]	putative peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Vibr
Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii ATCC 49256	173	2 his	[fusobacteria]	Dipeptide transport ATP-binding protein dppF [Fusobacterium
Photobacterium profundum S59	173	4 his	[alpha-proteobacteria]	putative peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Phot
Bacillus weihenstephanensis KBAB4	173	2 his	[firmicutes]	ABC transporter related [Bacillus weihenstephanensis KBAB4]
Clostridium sporosensu ATCC 15579	172	2 his	[firmicutes]	hypothetical protein CLOSPO_01348 [Clostridium sporosensu
Artihrosira maxima CS-328	172	2 his	[alpha-ambobacteria]	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase, subunit [Art
Burkholderia cenocepacia J2315	172	2 his	[beta-proteobacteria]	putative oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein [
Clostridium tetani E88	172	2 his	[firmicutes]	peptide transport ATP-binding protein [Clostridium tetani E
Burkholderia multivorans CGD2M	172	2 his	[beta-proteobacteria]	oligopeptide transport ATP-binding protein, OppF [Burkholder
Lysinibacillus sphaeratus C3-41	172	6 his	[firmicutes]	ABC transporter, ATP-binding protein [Lysinibacillus sphaeri
Burkholderia sp. 383	172	2 his	[beta-proteobacteria]	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase, subunit [Bur
Vibrio fischeri MJ11	172	4 his	[alpha-proteobacteria]	glutathione import ATP-binding protein GsiA [Vibrio fischer
Pelodictyon phaeoacanthiforme BL-1	172	2 his	[green sulfur bacteria]	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase, subunit [Pel
Ochrobactrum anthonii ATCC 49188	172	4 his	[alpha-proteobacteria]	ABC transporter related [Ochrobactrum anthonii ATCC 49188]
Pseudomonas syringae pv. tomato TI	172	2 his	[beta-proteobacteria]	conserved hypothetical protein [Pseudomonas syringae pv. to
Bacillus cereus ATCC 10987	172	2 his	[firmicutes]	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein [Bacillus
Marinomonas sp. MWYL1	172	4 his	[alpha-proteobacteria]	ABC transporter related [Marinomonas sp. MWYL1] >gii15068393
Vibrio cholerae V52	172	4 his	[alpha-proteobacteria]	peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Vibrio cholera
Agrobacterium tumefaciens str. C58	172	2 his	[alpha-proteobacteria]	ABC transporter, nucleotide binding/ATPase protein [dipept
Pseudomonas syringae pv. phaseolicola 1448A	172	2 his	[beta-proteobacteria]	peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Pseudomonas s
Vibrio cholerae V51	172	2 his	[alpha-proteobacteria]	peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Vibrio cholera
Bacillus anthracis str. Ames	172	2 his	[firmicutes]	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein [Bacillus
Bacillus thuringiensis str. AI Hakam	172	2 his	[firmicutes]	oligopeptide ABC transporter, ATP-binding protein [Bacillus
Stenococcus sp. PCC 6803	172	4 his	[alpha-ambobacteria]	ABC transporter [Stenococcus sp. PCC 6803] >gii16523244db
Propionibacterium acnes SK137	172	2 his	[high GC Gram+]	oligopeptide transport ATP-binding protein, OppF [Propioniba
Photobacterium sp. SKA31	172	4 his	[alpha-proteobacteria]	putative peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Phot
Chlorobium phaeoacanthoides BS1	171	2 his	[green sulfur bacteria]	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase, subunit [Ch]
Bordetella pertussis	171	1 his	[beta-proteobacteria]	putative oligopeptide ABC transporter, ATPase, component [Bo
Propionibacterium acnes KPA171202	171	2 his	[high GC Gram+]	putative peptide ABC transporter, ATP-binding protein [Prop
Clostridium thermocellum ATCC 27405	171	2 his	[firmicutes]	oligopeptide/dipeptide ABC transporter, ATPase, subunit [Clo

10. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Chlamydomphila pneumoniae: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis

Enrique Villegas^a, Antonio Sorlózano^a, Ana Camacho^b y José Gutiérrez^a

^aDepartamento de Microbiología. Universidad de Granada. Granada. ^bLaboratorio Vircell SL. Granada. España.

Chlamydomphila pneumoniae es un patógeno humano intracelular, muy prevalente, con un ciclo único de desarrollo bifásico, que causa infecciones respiratorias en las vías altas y neumonía, y que actualmente se cree que puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de la arteriosclerosis.

C. pneumoniae muestra una gran complejidad en los antígenos de superficie de la membrana externa, ya sea por ser específicos pero poco inmunógenos (como la proteína principal de la membrana externa) o bien por ser muy inmunógenos pero poco específicos entre las especies de clamidias. Todo esto hace necesario profundizar en el estudio de nuevos antígenos que sean altamente inmunodominantes y específicos de especie. En este sentido, las proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP) son *a*) específicas de clamidia, *b*) se exponen en la superficie de la bacteria y *c*) son muy inmunógenas, todo lo cual las hace acreedoras de un importante potencial de aplicación en los diferentes ensayos de laboratorio. Otras, como la proteína de choque térmico 60 (HSP 60), parecen estar relacionadas con la arteriosclerosis, por inducir un ataque inmunológico sobre la pared endotelial.

A partir de los estudios existentes hasta la fecha, para obtener una conclusión sobre la relación entre la infección y la arteriosclerosis, faltan estudios con suficiente número de pacientes y muestras, prospectivo, comparativo frente a controles sanos, que utilicen la combinación de varias técnicas microbiológicas (directas e indirectas) en un mismo sujeto y muestra, relacionando los resultados con la actividad de la enfermedad.

Palabras clave: *Chlamydomphila pneumoniae*. Proteómica. Arteriosclerosis.

Chlamydomphila pneumoniae: from proteomics to arteriosclerosis

***Chlamydomphila pneumoniae* is a highly prevalent intracellular human pathogen with a unique biphasic life cycle. It is a common cause of upper respiratory infection**

Correspondencia: Dr. J. Gutiérrez.
Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina.
Avda. de Madrid, 11. 8008 Granada. España.
Correo electrónico: josegf1199@hotmail.com

Manuscrito recibido el 2-3-2007; aceptado para su publicación el 11-6-2007.

and pneumonia, and is currently being studied as a potential risk factor for the development of atherosclerotic cardiovascular disease.

The outer membrane surface antigens of *C. pneumoniae* are highly complex: some, such as the major outer membrane protein, are specific, but poorly immunodominant, whereas others have stronger immunogenicity, but are cross-reactive among *Chlamydia* species. Therefore, new, highly immunodominant, species-specific antigens should be sought. In this regard, the polymorphic membrane proteins (PMPs) are *a*) unique to *Chlamydiae*, *b*) often exposed on the surface of the bacteria, and *c*) highly immunogenic; these factors make them potential candidates for application in laboratory assays. Other chlamydial antigens, such as heat shock protein (HSP) 60, have been associated with atherosclerotic lesions because of their ability to induce an immunological attack on the endothelial wall. Over the last decade, several studies have suggested a potential role of chronic *C. pneumoniae* infection in human atherosclerosis. Nevertheless, prospective studies with sufficiently large samples and a healthy comparison group, using a combination of direct and indirect microbiological techniques in the same subject and sample, are needed to establish a relationship between the infection and disease activity.

Key words: *Chlamydomphila pneumoniae*. Proteomics. Atherosclerosis.

Taxonomía del orden *Chlamydiales*

Históricamente, el orden *Chlamydiales* incluye la familia *Chlamydiaceae*, con un solo género, *Chlamydia*, y cuatro especies: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia pneumoniae* y *Chlamydia pecorum*. Más recientemente, a partir del análisis de las secuencias de los genes del ARNr 16S y 23S, se comprobó que existían diferencias entre *C. trachomatis* y el grupo *C. psittaci*-*C. pneumoniae*, lo que llevó a dividir esta familia en dos géneros diferentes¹: *Chlamydia* y *Chlamydomphila*, respectivamente. No obstante, junto con los géneros anteriores, patógenos humanos, existen otros, pertenecientes al orden *Chlamydiales*, que carecen, en estos momentos, de interés clínico.

Chlamydomphila pneumoniae es muy conocido actualmente por ser un agente productor de enfermedad respiratoria aguda, incluyendo neumonía, bronquitis, sinusitis

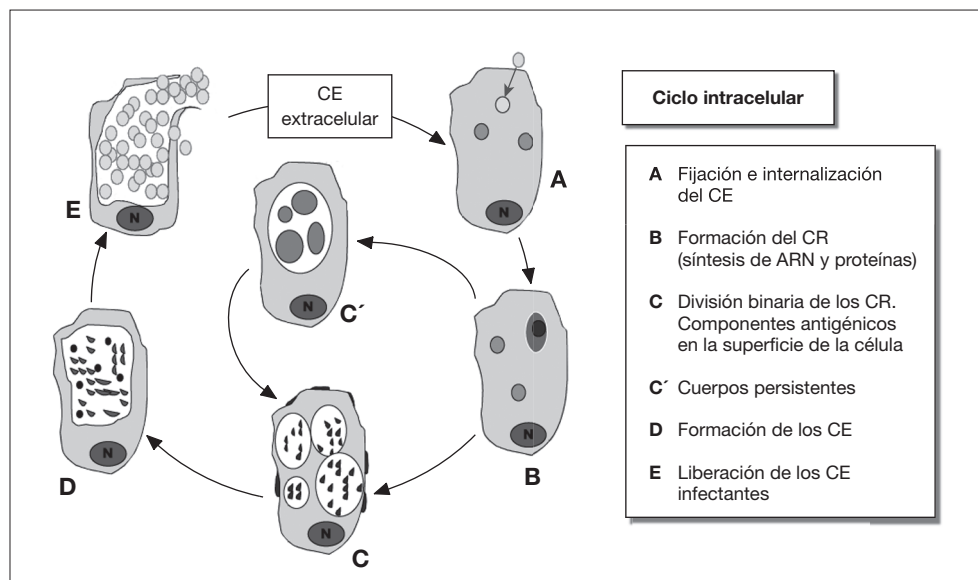


Figura 1. Ciclo celular de *Chlamydophila pneumoniae*. CE: cuerpo elemental; CR: cuerpo reticular.

y faringitis y, así como por las investigaciones que la relacionan con la arteriosclerosis, entre otras enfermedades. Este organismo fue aislado por primera vez en 1965, de la conjuntiva de un niño taiwanés durante la vacunación antitracoma².

Ciclo celular

Durante su ciclo celular adopta dos morfologías distintas, una forma infecciosa extracelular, el cuerpo elemental, y una forma replicativa intracelular, el cuerpo reticular. El primero es pequeño y denso, tiene un tamaño de entre 0,2 y 0,4 μm , y una forma característica de pera. Morfológicamente, es distinto de los cuerpos elementales redondeados de *C. trachomatis* y *C. psittaci*. No obtiene nutrientes del exterior y carece de actividad metabólica y de replicación. Posee una pared celular rígida, aunque lo suficientemente laxa como para permitir esta forma de pera, gracias a proteínas ricas en aminoácidos azufrados, que forman un entramado denso, que le hace resistente a los factores ambientales.

El cuerpo reticular es más grande, con un tamaño de entre 0,6 y 1,2 μm . Procede de la transformación del cuerpo elemental tras entrar en la célula hospedadora. Éste obtiene nutrientes del citoplasma de la célula y se multiplica por división binaria. Los cuerpos reticulares son lábiles, osmóticamente inestables e incapaces de infectar a otras células.

El ciclo celular se inicia cuando un cuerpo elemental, por su zona más aguda, se une a una célula por un mecanismo del tipo adhesina-receptor (fig. 1A). Si bien la identidad precisa de ambas moléculas continúa siendo incierta, parece tratarse de un sistema del tipo glucosamino-glucano parecido al sulfato de heparina. Penetran en la célula por endocitosis y se forma un fagosoma, pero no un fagolisosoma³. Es característica del orden de las *Chlamydiales* su habilidad para inhibir la fusión lisosomal, por mecanismos no definidos, permitiendo al cuerpo elemental habitar en una vesícula, rodeada de una membrana pro-

tectora, llamada cuerpo de inclusión, visible al microscopio óptico (fig. 1B). Entonces, se modifica la membrana externa del cuerpo elemental, desaparecen los aminoácidos azufrados y se conforman, funcionalmente, las porinas.

El paso de cuerpo elemental a cuerpo reticular, y viceversa, requiere un ciclo intracelular de 2-4 días en *C. pneumoniae*. El cuerpo elemental se transforma en reticular cuando penetran metabolitos, como fosfatos ricos en energía, y aminoácidos, aumentando la actividad metabólica. Estos procesos iniciales incluyen la síntesis de nuevas proteínas, reducción de los enlaces disulfuro y la activación de la adenosina trifosfatasa⁴.

Los cuerpos reticulares se dividen de forma binaria e incesante, agrupados en el fagosoma (fig. 1C). El cuerpo de inclusión y la célula infectada muestran en la superficie antígenos derivados de la bacteria. Los cuerpos reticulares madurarán, reduciendo su tamaño y reorganizando su pared celular, a modo de cuerpos elementales. En ese momento, los cuerpos de inclusión contendrán cuerpos reticulares maduros, futuros elementales (fig. 1D).

La liberación de los cuerpos elementales de las células infectadas se puede realizar por lisis celular, extrusión o exocitosis, y se cierra el ciclo de desarrollo permitiendo la infección de nuevas células (fig. 1E).

Por determinadas condiciones ambientales, o dependiendo del estado del agente infeccioso o de la célula hospedadora, el ciclo se puede detener, permanente o temporalmente, en la fase de cuerpo reticular, que se denomina ahora cuerpo persistente (fig. 1C'). Así, Beatty et al⁵, realizando cultivos celulares en líneas de epitelio de faringe humana, determinaron que uno de los mecanismos que induce a entrar a la bacteria en un estado persistente es la presencia de interferón gamma (IFN- γ).

Estos cuerpos persistentes son cuerpos reticulares más grandes, que, por el menor número de porinas, se dividen lentamente. Este estado críptico conlleva la reducción en la expresión de antígenos, cambios de la morfología y la pérdida de la infectividad. Se piensa que estas formas podrían tener un papel importante en la patogénesis de la infección crónica, debido, entre otros, a la presencia en

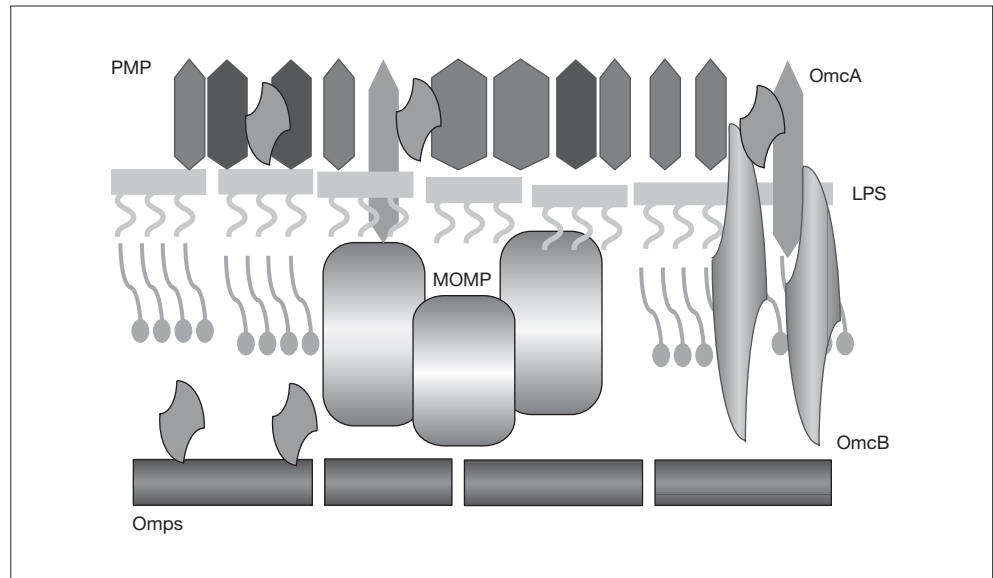


Figura 2. Proteínas de la envuelta celular de *Chlamydomytila pneumoniae*. LPS: lipopolisacárido; Omc: complejo proteico de membrana externa; PMP: proteínas polimórficas de la membrana externa.

este estadio de proteínas de choque térmico (*heat shock protein* [HSP])⁶. Esta fase puede ser temporal y luego continuarse el ciclo, como antes se ha comentado.

Los cuerpos persistentes podrían ser una adaptación de la bacteria al hospedador para evitar el sistema inmunológico, reducir una virulencia innecesaria o mantenerse viable en condiciones adversas. Su presencia podría tener, como en el caso de *C. trachomatis*⁷, repercusiones diagnósticas (ya que determinarían falsos negativos en el inmunodiagnóstico, por la escasa expresión de antígenos bacterianos, o en el cultivo celular, por la menor viabilidad del cuerpo persistente), y terapéuticas (por una menor respuesta al tratamiento debido a la pérdida de porinas y la menor expresión de dianas).

Antígenos de *C. pneumoniae*

Los antígenos de *C. pneumoniae* son complejos y sólo parcialmente conocidos. Las primeras descripciones fueron realizadas por Kuo et al². Se localizan en la pared celular (fig. 2), y, entre otros, destacan los siguientes grupos (tabla 1)⁸:

Lipopolisacárido

El lipopolisacárido es un antígeno presente en todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*. Su presencia se ha demostrado mediante fijación del complemento, inmunofluorescencia y ELISA^{9,10} y es una causa importante de las reacciones cruzadas que, con frecuencia, se observan en la serología de *Chlamydiaceae*.

Está presente en los cuerpos elementales, en los reticulares, en la membrana de las células infectadas y en la región proximal de células anejas a la anterior, pero no infectadas. Su presencia se ha demostrado a las 20 h de la infección celular. Dado que la superficie de los cuerpos reticulares es 10 veces superior a la de los elementales, durante la transformación de aquéllos, es probable que sean expulsadas al exterior grandes cantidades de lipopolisacárido a través de vesículas, desde la inclusión intracelular,

al citoplasma y a la superficie de la célula. Este hecho apoya la hipótesis que implica al lipopolisacárido en la patogenia de las manifestaciones clínicas asociadas a *C. pneumoniae*¹¹.

De manera indirecta, a partir de la capacidad de neutralización de los anticuerpos monoclonales, pero no bien caracterizada, se han supuesto también, en el lipopolisacárido de *C. pneumoniae*, la presencia de epítomos específicos de especie¹². Del mismo modo, los estudios con anticuerpos han sugerido que, durante el proceso de transformación de los cuerpos reticulares en elementales, la estructura del lipopolisacárido puede sufrir algún cambio⁹.

Proteínas de la membrana externa

Proteína principal de la membrana externa (MOMP)

Uno de los antígenos mejor caracterizados en las especies de *Chlamydia* es la MOMP. Es la proteína que se halla en mayor proporción (60%) en los cuerpos elementales y reticulares¹⁰.

Tiene funciones de porina. Para ello, se debe encontrar químicamente reducida, situación que modifica las uniones entre las proteínas ricas en cisteína y que permite dicha función¹³ en los cuerpos reticulares¹⁰ activos metabólicamente.

Esta proteína es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies. Tiene cuatro dominios variables, que tienden a situarse en la superficie de la membrana, y cinco constantes. La secuencia, en *C. pneumoniae*, no se considera inmunodominante. Esto se ha intentado explicar por la supuesta incapacidad del sistema inmunológico para identificar los epítomos superficiales de la MOMP, a causa de un mecanismo de interposición o enmascaramiento que ejercerían las proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP)¹⁴. Esto no impide que algunos anticuerpos monoclonales sí puedan reconocer antígenos especie-específicos de *C. pneumoniae* y neutralizar la infección *in vitro*¹⁵.

TABLA 1. Características de los antígenos descritos en *C. pneumoniae*

Antígenos	Tamaño	Función	Presencia	Inmunogenicidad	pI*
Lipopolisacárido	Desc	Integridad estructural	CE y CR	Inmunogénico género-específico	Desc
Asociados a la membrana externa					
MOMP	39,5 kDa	Porina Integridad estructural	CE y CR	No inmunodominante	6,1
OmcA	9 kDa	Adhesina	CE	No inmunogénica	6,1
OmcB	2 × 60 kDa	Adhesina periplásmica	CE	Inmunogénica género-específica	5,6
PMP 1-21	≈ 100 kDa	Porinas lipoproteicas	CE y CR	Inmunogénicas	5-9
Lipoproteína	22 kDa	Desc	Desc	Desc	Desc
Lipoproteína (CPn0278)	30,2 kDa	Desc	Desc	Desc	6,5
Omp H	19,5 kDa	Desc	Desc	Desc	4,7
Omp 85	89 kDa	Desc	Desc	Inmunogénica	7,7
Asociados al proceso celular					
IncA	39 kDa	Desarrollo y supervivencia en la inclusión	CI	No inmunogénica	Desc
IncB	18 kDa	Desarrollo y supervivencia en la inclusión	CI	No inmunogénica	Desc
IncC	21 kDa	Desarrollo y supervivencia en la inclusión	CI	No inmunogénica	Desc
HSP 60	60 kDa	Chaperona	CE y CR	Inmunogénica	Desc
HSP 70	70 kDa	Chaperona	CE y CR	Inmunogénica	5,6
Sistema de secreción III	52 kDa**	Secreción de proteínas	CE y CR	No inmunogénico	5,9**
Proteína respuesta baja en calcio	43 kDa	Regulador sistema secreción III	Desc	Desc	5
Asociados a la membrana interna					
Proteína hipotética	89 kDa	Desc	Desc	Inmunogénica	Desc
Asociados al metabolismo					
Enolasa	46 kDa	Invasión tisular, coagulación	Desc	Inmunogénica	4,7

*Valores teóricos del pI⁸.

**Molestina RE, Klein JB, Miller RD, Pierce WH, Ramírez JA. Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of HEp-2 cells. Infect Immun. 2002;70:2976-81.

CE: cuerpo elemental; CI: cuerpo de inclusión; CR: cuerpo reticular; Desc: desconocido. HSP: proteína de choque térmico; Inc: proteínas de inclusión; PMP: proteínas polimórficas de membrana externa.

Proteínas del complejo de membrana externa (OMC) ricas en cisteína

Están presentes en grandes cantidades en el cuerpo elemental y se sintetizan de manera tardía en la maduración del cuerpo reticular hacia el elemental. No están presentes en el cuerpo reticular (a diferencia de la MOMP)¹⁶.

La proteína OmcA recuerda a las lipoproteínas mureínicas de las bacterias gramnegativas. Es una adhesina que se fija a las moléculas de heparina, facilitando la infectividad. Está anclada en la membrana externa por su región lipídica, mientras que la zona peptídica se extiende hacia el periplasma¹⁷.

Más controvertida es la estructura de la OmcB¹⁸. Se sabe que la posición de las cisteínas es muy mantenida y es muy inmunogénica, pero comparte epítomos con otras especies bacterianas. Finalmente, los puentes disulfuro de OmcB forman uniones cruzadas con los dominios periplásmicos de OmcA y de otras proteínas, contribuyendo a la estabilidad del cuerpo elemental¹⁷. Algunos autores proponen que este complejo es el equivalente del peptidoglucano, cuya presencia en *Chlamydia* es discutida¹⁹.

Proteínas polimórficas de la membrana externa (PMP)

Existen hasta 21 tipos en *C. pneumoniae*. Su superficialidad e inmunogenicidad justifican el interés por estas proteínas²⁰. Son ricas en serina y fenilalanina, y son polimórficas, ya que sus genes sufren mutaciones que originan variaciones en la estructura²¹. Se piensa que dicha variabilidad depende del número de residuos de guanina, y no está claro si se debe a la presión del sistema inmunológico, o es intrínseca. Biológicamente, actúan como citolisinas, que contribuyen a la rotura de la célula hospedadora y a la salida del cuerpo elemental, y, además, posiblemente, tienen un papel en la entrada al hospedador²².

Otras proteínas de la membrana externa

Otras proteínas presentes en *C. pneumoniae*, y cuya función no es bien conocida, se reflejan en la tabla 1.

Proteínas del proceso celular

Proteínas de inclusión (Inc)

Se localizan en la membrana de los cuerpos de inclusión de *C. pneumoniae* y el resto de miembros del orden *Chlamy-*

diales. Cada proteína posee un dominio hidrofóbico único de 50 a 80 aminoácidos²³. Sus funciones se han relacionado con el desarrollo de la inclusión, la evasión del sistema inmunológico, la adquisición de nutrientes e, incluso, son mediadores en los procesos de transición de cuerpos reticulares a elementales, y viceversa. Constituyen una familia de proteínas que tienen un importante papel en la infección, el crecimiento y la supervivencia en el hospedador celular²⁴.

Chaperonas

Parte de ellas son HSP y corrigen plegamientos incorrectos de proteínas desnaturalizadas. La HSP 60 parece estar implicada en los daños ocasionados en las arterias de los sujetos infectados debido a la hiperestimulación de macrófagos y a la inducción de los autoanticuerpos, por mimetismo molecular con la proteína humana²⁵, citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas, que degradarían el colágeno²⁶. Se relaciona, por tanto, con la arteriosclerosis, por inducir un ataque a la pared endotelial, mediante una reacción de hipersensibilidad retardada, propia de las infecciones crónicas²⁷, que puede ser el eslabón entre los microorganismos involucrados y la autoinmunidad²⁸.

Por su parte, la HSP 70 está presente de forma temprana en la infección y tiene un importante papel en el transporte de proteínas a través de las membranas²⁹.

Sistema de secreción tipo III y proteínas de respuesta baja en calcio

Las características^{30,31} de estas proteínas presentes en *C. pneumoniae*, y cuya función no es bien conocida, se reflejan en la tabla 1.

Proteínas relacionadas con el metabolismo³²

Entre las proteínas relacionadas con el metabolismo energético está la enolasa. Esta proteína de la superficie bacteriana comparte antígenos con la enolasa humana, presente en las células hematopoyéticas, por lo que, en las infecciones por clamidia, la inducción de anticuerpos anti-enolasa podría causar reacciones autoinmunes inflamatorias^{8,33}.

Peptidoglucano

Su presencia se ha sospechado por estudios, inicialmente referidos a los cuerpos reticulares de *C. trachomatis*, en los que se comprobó que antibióticos como penicilina o cicloserina inhibían el proceso de división celular³⁴. Asimismo, se ha demostrado la presencia, en el genoma del serovar D de *C. trachomatis*, de genes para la síntesis del peptidoglucano³⁵. Sin embargo, los estudios realizados con objeto de detectar ácido N-acetilmurámico, la molécula característica del peptidoglucano, no han sido concluyentes. Entonces, es posible que el peptidoglucano esté presente, de forma transitoria y escasa, en determinados momentos del ciclo vital, y con funciones muy concretas. Apoyando esta hipótesis se ha sugerido que, en el cuerpo reticular, sustituiría la función de las proteínas ricas en cisteína de la pared celular del CE, participando en la división de la bacteria³⁶, y en la adhesión a la membrana y superficie celular³⁷.

Patogenia de la infección por *C. pneumoniae*

Para penetrar en el organismo humano la bacteria utiliza, entre otras, la célula epitelial columnar o de tran-

sición, infectando las vías respiratorias y los monocitos. Inicialmente lo hace en las células respiratorias de las vías altas y/o bajas y se disemina por la sangre gracias a los monocitos. Esto le permite la colonización a distancia de muchos lugares del organismo, tales como las arterias. Tras la infección inicial del epitelio respiratorio de las vías altas el sujeto puede quedar como portador debido a un fracaso en la actuación de la respuesta inmunológica³⁸.

Al igual que con *C. trachomatis*, las personas infectadas por *C. pneumoniae* desarrollan una respuesta inmunológica celular³⁹. Ésta es la más importante, suele ser poco intensa, pero persistente en el tiempo, y puede resolver la infección.

La bacteria, durante la infección de la célula hospedadora, detiene la apoptosis, lo que contribuye a la replicación y facilita una posible cronificación. Las células T CD4 son activadas por los antígenos de *Chlamydia*, que derivan del contenido de las vacuolas, y se relacionan con las moléculas de clase II del sistema HLA, que se exponen en las células infectadas como macrófagos, dendritas y células endoteliales; el reconocimiento de los antígenos producirá la secreción de citocinas. Éstas activan los macrófagos y las células B para producir anticuerpos⁶.

El IFN- γ inhibe la replicación de los patógenos intracelulares estrictos, por inducción de la producción de indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO). La IDO degrada el triptófano a quineurina y N-formilquineurina, privando al patógeno de triptófano. Como resultado, el crecimiento bacteriano puede ser restringido. Cuando el triptófano es repuesto, la inhibición se revierte⁴⁰. Carlin y Weller⁴¹ investigaron algunos agentes inmunomoduladores que podían actuar sinérgicamente con los IFN, en la restricción del crecimiento de *Chlamydia* por incremento de la actividad de la IDO. La adición de interleucina 1 (IL-1) aumentó la producción de IDO y suprimió el crecimiento de *Chlamydia*. La IL-1 β parece ser la más importante. Entonces es posible que un déficit de IFN- γ sea el causante de la aparición de una infección persistente, a través de la menor inducción de la IDO (v. ciclo replicativo en fig. 1).

La reinfección es frecuente a lo largo de la vida porque surgen variantes alélicas, debido a la presión inmunológica o recombinación genética en la infección mixta. Además, no se ha demostrado la capacidad de neutralización de los anticuerpos para evitar nuevas infecciones¹⁵. Finalmente, hay evidencias de que una infección reciente supe- rada puede conferir protección frente a enfermedades graves posteriores, aunque no a la reinfección⁴².

El período de incubación de la enfermedad aguda es de varias semanas (media de tres), más largo que para otros muchos patógenos respiratorios⁴³. A través de la investigación de los anticuerpos, generalmente mediante el empleo de pruebas de microinmunofluorescencia⁴⁴, se ha demostrado que la infección tiene una presencia universal⁴⁵, que los sujetos se infectan alguna vez en su vida y que la seroprevalencia es más importante a medida que aumenta la edad debido a las reinfecciones repetidas.

La bacteria es capaz de originar infecciones asintomáticas en niños, por infección primaria. Esto no excluye la posibilidad de ocasionar faringitis, otitis y sinusitis. Así, la bacteria se ha asociado con sinusitis purulenta⁴⁶, otitis media supurada⁴⁷ y faringitis, pero se desconoce la frecuencia real de estas enfermedades⁴⁸.

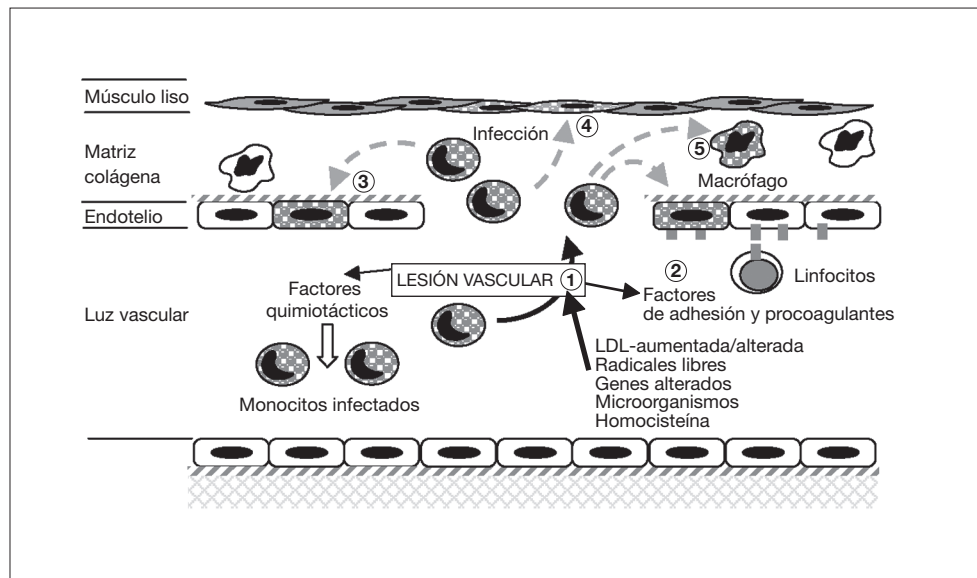


Figura 3. Patogénesis de la arteriosclerosis y su relación con la infección por *Chlamydomphila pneumoniae* (1). (1) Lesión de los vasos por diferentes causas. (2) Esta lesión incrementa la síntesis de proteína quimiotáctica 1 de monocito y moléculas de adhesión que fijan leucocitos infectados; actividad procoagulante de lipoproteínas tisulares, con trombosis y adhesión de plaquetas. La célula endotelial se infecta por *C. pneumoniae* intramocítica. (3) Los monocitos migran al subendotelio, liberan citocinas proinflamatorias y expresan la molécula CD14. El interferón γ aumenta la dioxigenasa intramocítica que oxida el triptófano hasta quineurina. (4) Se infectan las células musculares lisas y (5) los macrófagos.

Las infecciones sintomáticas suelen ocurrir en adultos, debido a reinfección, y menos frecuentemente por reactivación. Así, ocasiona bronquitis y neumonía (hasta el 20% de las neumonías extrahospitalarias ocurridas en los mayores de 65 años y el 5% de los casos de bronquitis y sinusitis) y es una causa de reactivación clínica de los sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)³⁸.

Más recientemente, se ha asociado con otros procesos de etiología hasta ahora no bien conocidos, tales como la arteriosclerosis.

C. pneumoniae y su relación con la arteriosclerosis

Actualmente, el área de investigación más activa en relación con este patógeno es la posible influencia de la infección vascular por *C. pneumoniae* en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares arterioscleróticas. Esto se debe a que los factores de riesgo clásicos para la arteriosclerosis sólo explican el 60% de los casos, y nuevos agentes, tales como *C. pneumoniae*, se han asociado con la enfermedad⁴⁹.

Desde hace años se han obtenido muchas evidencias microbiológicas de la presencia de *C. pneumoniae* en las placas de ateroma de las arterias coronarias, carótida, aorta, iliaca y femoral, mediante visualización con microscopía electrónica o inmunohistoquímica y pruebas de PCR⁵⁰⁻⁵².

Observaciones procedentes de la infección experimental de conejos sugieren que la infección por *C. pneumoniae* puede facilitar el desarrollo de placas de ateroma en animales hipercolesterolémicos. La lesión inicial inducida por el colesterol podría ser necesaria para que pueda infectar y residir en la arteria⁵³ o una consecuencia de la infección. Esto se apoya en el hecho de que la infección induce, *in vitro*, un marcado aumento de la captación de ésteres de colesterol por los monocitos humanos incubados en presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL), de modo que éstos acaban evolucionando a células espumosas⁵⁴. En

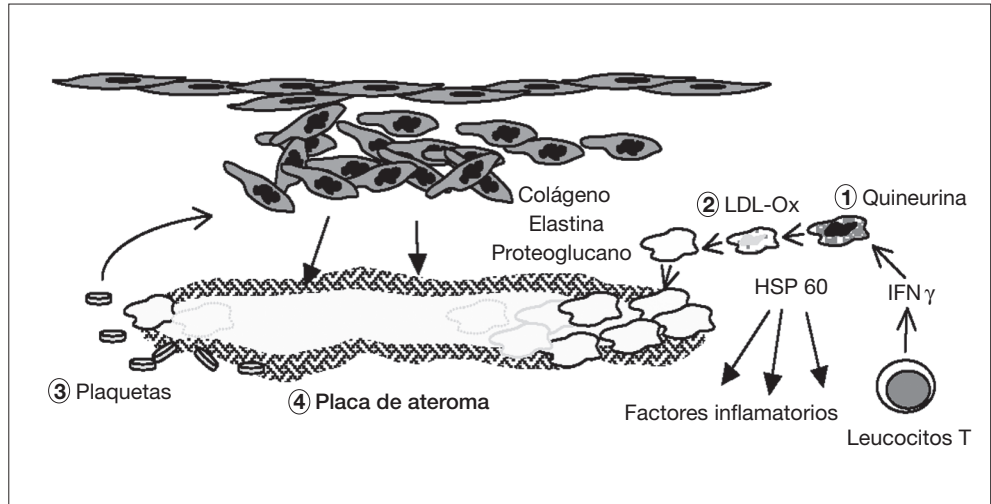
tonces ¿cómo se podría producir la placa de ateroma en el curso de la infección?

Resumiendo los conocimientos existentes hasta la fecha, podríamos establecer una secuencia de los acontecimientos (figs. 3 y 4). Se sabe que los vasos se pueden lesionar por: una concentración elevada de LDL y/o una alteración de ésta; la presencia de radicales libres causados por el tabaco, hipertensión o diabetes mellitus; alteraciones genéticas; agentes infecciosos como herpesvirus o *C. pneumoniae*; concentraciones plasmáticas elevadas de homocisteína, o una combinación de cualquiera de estos factores⁵⁵. Por lo expuesto anteriormente se sabe que *C. pneumoniae* puede infectar, en el vaso, el endotelio, previamente lesionado por cualquiera de las causas anteriores, el músculo liso y los macrófagos, con más facilidad en presencia de grasas. La infección de las células endoteliales permitiría liberar cuerpos elementales al medio extracelular, que servirían para extender la infección localmente, o por vía sistémica^{4,56}.

La célula endotelial infectada incrementa la síntesis, por un lado, de la proteína quimiotáctica-1 del monocito y también de moléculas de adhesión (selectina E, molécula de adhesión intercelular-1, y molécula de adhesión vascular-1, que fijan nuevos leucocitos, los cuales pueden estar infectados) y, por otro lado, de factores tisulares procoagulantes, lipoproteínas tisulares, con trombosis y adhesión de plaquetas⁵⁷.

Los monocitos, que no son susceptibles al ciclo replicativo completo de la bacteria, se activan, migran al subendotelio, liberan citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral [TNF], IL-1, 6 y 8, factor nuclear kappa B) y expresan la molécula CD14⁵⁸. El IFN- γ , de los LTh1 sensibilizados⁵⁹, aumenta la dioxigenasa intramocítica de las células endoteliales y mononucleares, y oxida el triptófano hasta N-formilquineurina y quineurina (fig. 4). Esta sustancia reduce, según hemos visto en el ciclo replicativo y la patogénesis de la infección, la salida de los cuerpos elementales (lo que explican los falsos negativos del cultivo de placas de ateroma), aumenta la persistencia intracelular porque surgen las formas crípticas denominadas CPE, re-

Figura 4. Patogenia de la arteriosclerosis y su relación con la infección por *Chlamydomydia pneumoniae* (II). (1) La quineurina reduce la salida de *C. pneumoniae* y aumenta la expresión de la proteína de choque térmico 60 (HSP 60). (2) Los macrófagos infectados engloban las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y se transforman en células grasas. (3) Las plaquetas agregadas liberan un factor de crecimiento celular que hace proliferar un músculo liso indiferenciado que libera colágeno, elastina y proteoglicanos con formación de tejido fibroso. (4) Se forma la placa madura con un core de lípidos y colesterol rodeada de una capa fibrosa.



duce la expresión de la MOMP y aumenta la de la HSP 60^{60,61}. Así, se ha visto que si no hay arteriosclerosis, no se observa la HSP 60 en la pared arterial. Ésta estimula la síntesis de autoanticuerpos y, de nuevo, a los macrófagos, produciendo más citocinas y metaloproteínasa que degradan el colágeno⁶². De esta manera, se establecería una infección crónica con presencia de CPE en la que el antígeno más abundante es el lipopolisacárido⁶³.

Kalayoglu y Byrne⁵⁴ demostraron que los macrófagos infectados engloban más LDL, por acción del lipopolisacárido, transformándose en células grasas. Las plaquetas agregadas liberarían un factor de crecimiento celular que hace proliferar un músculo liso indiferenciado, que libera colágeno, elastina y proteoglicanos con formación de tejido fibroso. Finalmente, se forma la placa de ateroma madura, con un centro de lípidos y colesterol, rodeada de una capa fibrosa.

Acerca de la asociación entre la enfermedad arterial periférica (EAP) oclusiva y la infección por esta bacteria se han publicado más de 50 estudios⁶⁴, caracterizados por un grupo de casos y controles y metodologías analíticas bien definidas, en los que se analizan, mediante alguna prueba independiente, esta relación. De éstos, se ha concluido que existe, de forma estadísticamente significativa, una asociación cuando se utilizan pruebas inmunohistoquímicas, PCR anidada en biopsias de arterias, estudios de PCR en muestras no arteriales, pruebas de ELISA y MIF para detectar valores altos de inmunoglobulina G (IgG) e IgA, y otros métodos directos de detección de la bacteria diferentes de los anteriores. Sin embargo, no se ha encontrado asociación cuando se ha empleado la PCR simple en biopsias arteriales, en las pruebas de MIF que detectan IgG en niveles bajos, o IgM, y en los estudios de ELISA para detectar IgM. Según lo anterior, el hallazgo de la asociación entre la EAP y la infección por *C. pneumoniae* depende del método empleado en estos trabajos. La mayoría establece una relación con una probabilidad variable, pero no se encuentra esta relación con los métodos de PCR menos sensibles y la presencia de IgM antibacteria, lo que parecería lógico, ya que la EAP hay que entenderla como una enfermedad crónica. En relación con la detección del ADN de *C. pneumoniae*, en la mayor parte de los estudios publica-

dos sólo se informa de las regiones amplificadas, que han sido muy diferentes, pero no del método de extracción del ADN y de la sensibilidad de la prueba empleada. Esto puede justificar las discrepancias de los resultados obtenidos en los estudios, ya que las metodologías han sido muy diferentes.

Aunque la asociación arteriosclerosis-*Chlamydomydia* es aparente en muchos estudios, no implicaría que exista una relación causal, ya que faltan, entre otros, estudios que empleando un análisis de los marcadores de la inflamación justifiquen la relación patogénica causa-efecto.

Finalmente, hay que señalar que otros agentes infecciosos pueden estar involucrados en la aparición de la arteriosclerosis⁶⁵, pues, en general, las infecciones crónicas pueden ejercer un efecto proaterogénico al actuar a nivel sistémico o de forma local sobre la pared vascular⁶⁶.

En conclusión, aún nos encontramos en estadios muy iniciales en el conocimiento de la proteómica de *C. pneumoniae*. Su estudio ayudará decisivamente a conocer los mecanismos patogénicos finales por los que ocasiona la enfermedad en el hombre y, por tanto, a saber si esta bacteria desempeña un papel en enfermedades como la aterosclerosis.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Proyecto de Investigación CTS-138 de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (Descripción de inmunógenos de *Chlamydomydia pneumoniae* reconocidos por los sueros de sujetos con enfermedad arterial periférica. Relaciones clínicas).

Bibliografía

1. Everett KD, Bush RM, Andersen AA. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49: 415-40.
2. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, Grayston JT. Identification of a new group of *Chlamydomydia psittaci* strains called TWAR. *J Clin Microbiol.* 1986;24:1034-7.
3. Kuo CC, Chi EY, Grayston JT. Ultrastructural study of entry of *Chlamydomydia* strain TWAR into HeLa cells. *Infect Immun.* 1988;56:1668-72.

4. Stratton WC, Mitchel WM. The pathogenesis of Systemic Chlamydial infections: theoretical considerations of host cell energy depletion and its metabolic consequences. *AIDIEX*. 1997;16:33-40.
5. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun*. 1994;62:3705-11.
6. Stratton WC. The role of *Chlamydia* in connective tissue diseases. *AIDIEX*. 1998;17:9-16.
7. Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD, Stamm WE. Epidemiology and clinical manifestations of unique *Chlamydia trachomatis* isolates that occupy nonfusogenic inclusions. *J Infect Dis*. 2001;184:879-84.
8. Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, Finco O, Petracca R, Galli G, et al. Genomic approach for analysis of surface proteins in *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*. 2002;70:368-79.
9. Campbell S, Richmond SJ, Yates PS, Storey CC. Lipopolysaccharide in cells infected by *Chlamydia trachomatis*. *Microbiology*. 1994;140:1995-2002.
10. Peterson EM, de la Maza LM, Brade L, Brade H. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of *Chlamydia pneumoniae*. *Infect Immun*. 1998;66:3848-55.
11. Birkelund S, Lundemose AG, Christiansen G. Immunoelectron microscopy of lipopolysaccharide in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1989;57:3250-3.
12. Bavoil P, Ohlin A, Schachter J. Role of disulfide bonding in outer membrane structure and permeability in *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1984;44:479-85.
13. Wyllie S, Ashley RH, Longbottom D, Herring AJ. The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infect Immun*. 1998;66:5202-7.
14. Christiansen G, Ostergaard L, Birkelund S. Molecular biology of the *Chlamydia pneumoniae* surface. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1997;104:5-10.
15. Puolakkainen M, Parker J, Kuo CC. Characterization of a *Chlamydia pneumoniae* epitope recognized by species specific monoclonal antibodies. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, et al, editors. *Chlamydial infections*. Bologna: Società Editrice Esculapio; 1994. p. 185-8.
16. Newhall WJ. Biosynthesis and disulfide cross-linking of outer membrane components during the growth cycle of *Chlamydia trachomatis*. *Infect Immun*. 1987;55:162-8.
17. Everett KD, Desiderio DM, Hatch TP. Characterization of lipoprotein EnvA in *Chlamydia psittaci* 6BC. *J Bacteriol*. 1994;176:6082-7.
18. Hatch TP, Allan I, Pearce JH. Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive life cycle forms of *Chlamydia* spp. *J Bacteriol*. 1984;157:13-20.
19. Hatch TP. Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? *J Bacteriol*. 1996;178:1-5.
20. Lindquist EA, Stephens RS. Transcriptional activity of a sequence variable protein family in *Chlamydia trachomatis*. En: Stephens RS, Byrne GI, Christiansen G, Clarke IN, Grayston JT, Rank RG, et al, editors. *Chlamydial infections. Proceedings of the Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infections*. San Francisco, EEUU: International Chlamydia Symposium; 1998. p. 259-62.
21. Grimwood J, Olinger L, Stephens RS. Expression of *Chlamydia pneumoniae* polymorphic membrane protein family genes. *Infect Immun*. 2001;69:2383-9.
22. Vandahl BB, Pedersen AS, Gevaert K, Holm A, Vandekerckhove J, Christiansen G, et al. The expression, processing and localization of polymorphic membrane proteins in *Chlamydia pneumoniae* strain CWL029. *BMC Microbiol*. 2002;2:36.
23. Rockey DD, Viratyosin W, Bannantine JP, Suchland RJ, Stamm WE. Diversity within inc genes of clinical *Chlamydia trachomatis* variant isolates that occupy non-fusogenic inclusions. *Microbiology*. 2002;148:2497-505.
24. Toh H, Miura K, Shirai M, Hattori M. In silico inference of inclusion membrane protein family in obligate intracellular parasites chlamydiae. *DNA Res*. 2003;10:9-17.
25. Domeika M, Domeika K, Paavonen J, Mardh PA, Witkin SS. Humoral immune response to conserved epitopes of *Chlamydia trachomatis* and human 60-kDa heat-shock protein in women with pelvic inflammatory disease. *J Infect Dis*. 1998;177:714-9.
26. Lamb DJ, El-Sankary W, Ferns GA. Molecular mimicry in atherosclerosis: a role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis*. 2003;167:177-85.
27. Taylor HR, Maclean IW, Brunham RC, Pal S, Whittum-Hudson J. Chlamydial heat shock proteins and trachoma. *Infect Immun*. 1990;58:3061-3.
28. Fong IW, Chiu B, Viira E, Tucker W, Wood H, Peeling RW. Chlamydial heat-shock protein-60 antibody and correlation with *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic plaques. *J Infect Dis*. 2002;186:1469-73.
29. Hiron S, Dibrov E, Hurtado C, Kostenuk A, Ducas R, Pierce GN. *Chlamydia pneumoniae* stimulates proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of endogenous heat shock protein 60. *Circ Res*. 2003;93:710-6.
30. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:379-433.
31. Subtil A, Parsot C, Dautry-Varsat A. Secretion of predicted Inc proteins of *Chlamydia pneumoniae* by a heterologous type III machinery. *Mol Microbiol*. 2001;39:792-800.
32. Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, Hoorelbeke B, Christiansen G, Vandekerckhove J, et al. Proteome analysis of the *Chlamydia pneumoniae* elementary body. *Electrophoresis*. 2001;22:1204-23.
33. Fontan PA, Pancholi V, Nociari MM, Fischetti VA. Antibodies to streptococcal surface enolase react with human alpha-enolase: implications in post-streptococcal sequelae. *J Infect Dis*. 2000;182:1712-21.
34. Matsumoto A, Manire GP. Electron microscopic observations on the effects of penicillin on the morphology of *Chlamydia psittaci*. *J Bacteriol*. 1970;101:278-85.
35. Stephens RS, Kalman S, Lammel C, Fan J, Marathe R, Aravind L, et al. Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science*. 1998;282:754-9.
36. Holtje JV, Fiedler W, Roterling H, Walderich B, van Duin J. Lysis induction of *Escherichia coli* by the cloned lysis protein of the phage MS2 depends on the presence of osmoregulatory membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem*. 1988;263:3539-41.
37. Rockey DD, Matsumoto A. The chlamydial developmental cycle. En: Brun YV, Shinkets LJ, editors. *Prokaryotic development*. Washington: Blackwell Publishing; 1999. p. 403-25.
38. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to *Chlamydia pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Clin Infect Dis*. 2007;44:568-76.
39. Braun J, Laitko S, Treharne J, Eggens U, Wu P, Distler A, et al. *Chlamydia pneumoniae*; a new causative agent of reactive arthritis and undifferentiated oligoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:100-5.
40. Malinverni R, Kuo CC, Campbell LA, Grayston JT. Reactivation of *Chlamydia pneumoniae* lung infection in mice by cortisone. *J Infect Dis*. 1995;172:593-4.
41. Carlin JM, Weller JB. Potentiation of interferon-mediated inhibition of *Chlamydia* infection by interleukin-1 in human macrophage cultures. *Infect Immun*. 1995;63:1870-5.
42. Thom DH, Grayston JT, Campbell LA, Kuo CC, Diwan VK, Wang SP. Respiratory infection with *Chlamydia pneumoniae* in middle-aged and older adult outpatients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994;13:785-92.
43. Kishimoto T, Kimura M, Kubota Y. An outbreak of *Chlamydia pneumoniae* infection in households and schools. En: Orfila J, Byrne GL, Cherneskey A, Grayston JT, Jones JP, Ridgway GL, et al, editors. *Chlamydial infections*. Bologna: Società Editrice Esculapio; 1994. p. 465-8.
44. Moazed TC, Grayston JT, Campbell LA. A rabbit model of *Chlamydia pneumoniae* infection. En: Abstracts of the 94th General Meeting of the American Society for Microbiology. Washington: American Society for Microbiology; 1994; Abstr. B-214. p. 66.
45. Montes M, Cilla G, Alcorta M, Perez-Trallero E. High prevalence of *Chlamydia pneumoniae* infection in children and young adults in Spain. *Pediatr Infect Dis J*. 1992;11:972-3.
46. Hashiguchi K, Ogawa H, Suzuki T, Kazuyama Y. Isolation of *Chlamydia pneumoniae* from the maxillary sinus of a patient with purulent sinusitis. *Clin Infect Dis*. 1992;15:570-1.
47. Ogawa H, Hashiguchi K, Kazuyama Y. Recovery of *Chlamydia pneumoniae*, in six patients with otitis media with effusion. *J Laryngol Otol*. 1992;106:490-2.
48. Hammerschlag MR, Chirgwin K, Roblin PM, Gelling M, Dumornay W, Mandel L, et al. Persistent infection with *Chlamydia pneumoniae* following acute respiratory illness. *Clin Infect Dis*. 1992;14:178-82.
49. Gutiérrez J, Linares J, Camacho A, Palanca M, Maroto C, Ros E, et al. Descripción de inmunógenos de *Chlamydia pneumoniae* reconocidos por el suero de sujetos con enfermedad arterial periférica. *Med Clin (Barc)*. 2006;126:721-7.
50. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1501-4.
51. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, Fukushi H, Patton DL, Grayston JT. Demonstration of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerotic lesions of coronary arteries. *J Infect Dis*. 1993;167:841-9.
52. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, Lawrence RD, Lee MJ. *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. *Circulation*. 1995;92:3397-400.
53. Fong IW, Chiu B, Viira E, Fong MW, Jang D, Mahony J. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*. 1997;35:48-52.
54. Kalayoglu M, Byrne G. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis*. 1998;177:725-9.
55. Ross R. Atherosclerosis. An inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
56. Gutiérrez J, Linares-Palomino J, Rodríguez M, Maroto MC. *Chlamydia pneumoniae* y su relación con la arteriosclerosis humana. *Rev Invest Clin*. 2000;52:482-6.

57. Fryer RH, Schwobe EP, Woods ML, Rodgers GM. *Chlamydia* species infect human vascular endothelial cells and induce procoagulant activity. *J Invest Med*. 1997;45:168-74.
58. Summersgill JT, Sahney NN, Gaydos CA, Quinn TC, Ramirez JA. Inhibition of *Chlamydia pneumoniae* growth in HEp-2 cells pretreated with gamma interferon and tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun*. 1995;63:2801-3.
59. Helme S, Juvonen T, Laurila A, Juvonen J, Mosotin M, Saikku P, Surcel HM. *Chlamydia pneumoniae* reactive T lymphocytes in the walls of abdominal aortic aneurysms. *Eur J Clin Invest*. 1999;29:546-52.
60. Sakash JB, Byrne GI, Lichtman A, Libby P. Cytokines induce indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human atheroma-associated cells: implications for persistent *Chlamydomydia pneumoniae* infection. *Infect Immun*. 2002;70:3959-61.
61. Kane CD, Vena RM, Ouellette SP, Byrne GI. Intracellular tryptophan pool sizes may account for differences in gamma interferon-mediated inhibition and persistence of chlamydial growth in polarized and nonpolarized cells. *Infect Immun*. 1999;67:1666-71.
62. Kol A, Bourcier T, Lichtman AH, Libby P. Chlamydial and human heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *J Clin Invest*. 1999;103:571-7.
63. Wyrick PB, Knight ST, Paul TR, Rank RG, Barbier CS. Persistent chlamydial envelope antigens in antibiotic-exposed infected cells trigger neutrophil chemotaxis. *J Infect Dis*. 1999;179:954-66.
64. Gutiérrez J, de Dios Luna J, Linares J, del Rosario Montes M, Quesada E, Rojas A, et al. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic *Chlamydomydia (Chlamydia) pneumoniae* infection: a meta-analysis. *Thromb Haemost*. 2005;93:1153-60.
65. Gois J, Higuchi M, Reis M, Diament J, Sousa J, Ramires J, Oliveira S. Infectious agents, inflammation, and growth factors: how do they interact in the progression or stabilization of mild human atherosclerotic lesions? *Ann Vasc Surg*. 2006;20:638-45.
66. Ameriso SF, Ruiz A, Pérez M. Infección, inflamación e ictus cerebral. *Rev Esp Cardiol*. 2004;4:7-12.

Expert Opinion

1. Introduction: cell cycle
2. *C. pneumoniae* antigens
3. *C. pneumoniae* and atherosclerosis
4. *C. pneumoniae* and chronic respiratory disease
5. Diagnosis
6. Prevention
7. Treatment
8. Conclusions
9. Expert opinion

informa
healthcare

Emerging strategies in the diagnosis, prevention and treatment of *Chlamydomphila pneumoniae* infections

Enrique Villegas, Ana Camacho, Antonio Sorlózano, José Rojas & José Gutiérrez[†]

[†]University of Granada, School of Medicine, Department of Microbiology, Avda de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain

Background: *Chlamydomphila pneumoniae* infections are a common cause of acute respiratory diseases, including upper respiratory tract infections and pneumonia. Over the past few years, *C. pneumoniae* infections have been strongly related to atherosclerotic cardiovascular diseases. **Objective:** The aim of this review is to offer an update and overview of recent advances in the diagnosis, prevention and treatment of these infections. **Methods:** Diagnostic systems have improved but further progress is required to allow a reliable diagnosis to be made. This is especially true for atherosclerotic diseases, for which standard criteria need to be established. **Results/conclusion:** Polymerase chain reaction and serological methods need to be standardized and made better to improve the diagnosis of *C. pneumoniae* infections. It seems to be crucial to obtain new and more selective antigens associated with persistent infections to explain the participation of *C. pneumoniae* in coronary artery disease.

Keywords: *Chlamydomphila pneumoniae*, diagnosis, prevention, treatment

Expert Opin. Ther. Patents (2008) 18(10):1-15

1. Introduction: cell cycle

Chlamydomphila (*Chlamydia*) *pneumoniae* is an obligate intracellular human pathogen with a unique biphasic development cycle, which causes acute respiratory disease, including pneumonia, bronchitis, sinusitis and pharyngitis. It has also been associated with atherosclerosis [1-3], among other diseases. This organism was first isolated in 1965 from the conjunctival tissue of a Taiwanese child being vaccinated against trachoma [4].

C. pneumoniae has two well-differentiated morphologies during its cell cycle [5]: the elementary body (EB), the extracellular and infectious form; and the reticulate body (RB), the intracellular and replicative form. The latter morphology develops after infection of the host eukaryotic cell by the EB, which then differentiates to RB in membrane-associated vacuoles, known as chlamydial inclusions.

The cell cycle may occasionally be temporarily or permanently arrested in the RB phase, as has been observed after treatment with cytokines, for example, IFN- γ , or antibiotics, after restriction of certain nutrients, or spontaneously under certain culture conditions, when they are designated persistent bodies (PBs). PBs are characterized as large non-infective aberrant forms.

Persistent *C. pneumoniae* infection seems to be related to the continuous expression of genes associated with DNA replication but not to genes involved in cell division. The cell division is very slow and the metabolic activity is complex. Thus, whereas the expression of some genes is downregulated, such as those

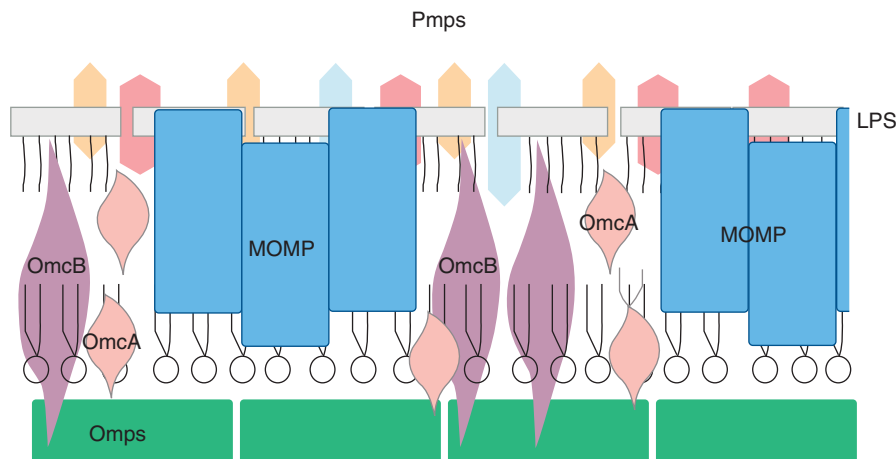


Figure 1. Cellular envelope proteins of *Chlamydomphila pneumoniae* EBs.

LPS: Lipopolysaccharide; MOMP: Major outer membrane protein; Omc: Outer membrane complex protein; Omps: Outer membrane protein; Pmps: Polymorphic outer membrane protein.

55 related to cell division (*ftsK*, *ftsW*), others are upregulated
 (56 *pgk*, *groEL*), depending on the restricting conditions
 and the time after infection [6]. They have fewer porins
 compared with RBs and a lower expression of most structural
 constituents of the organism, including lipopolysaccharide
 60 (LPS), outer membrane complex protein B (OmcB) and
 major outer membrane protein (MOMP). However, synthesis
 of heat-shock protein 60 kDa (Hsp60) is maintained [7],
 suggesting that PBs may play an important role in the
 pathogenesis of chronic infection. In general, a lower
 65 MOMP:Hsp60 ratio has been found in cell culture studies
 on the persistence of *Chlamydia trachomatis*. However, recent
 studies of *C. pneumoniae* reported an upregulation of
 MOMP, increasing the MOMP:Hsp60 ratio, indicating that
 this ratio cannot be used as a universal marker of persistence,
 as was first thought [6].

70 *C. pneumoniae* has been implicated in the pathogenesis of
 various chronic diseases, including asthma and atherosclerosis.
 It has been proposed that this state is an adaptation of the
 bacteria to the host to avoid the immune system or remain
 viable under adverse conditions. Its presence may have diagnostic
 repercussions because it can generate false negatives owing
 to the scant antigen expression or low viability of PBs. It
 may also have therapeutic repercussions, because porin loss
 is frequently associated with resistance to treatment [8].

80 2. *C. pneumoniae* antigens

85 The outer membrane of *C. pneumoniae* is highly complex
 (Figure 1). Its antigens have been widely reported in numerous
 studies, and the more important are listed in Table 1 [9-14].
 Although the type and composition of its antigenic proteins
 are known, further knowledge of its immunogenic antigens
 is required to improve the diagnosis and prevention of
 89 this disease.

All antigens depicted in Table 1 were demonstrated in
 several immunogenetic analyses. Key studies in the identification
 of *C. pneumoniae* proteins include the reports by
 Vandahl *et al.* [11] and Molestina *et al.* [15], based on
 bidimensional electrophoresis analysis and subsequent
 identification by matrix-assisted laser desorption/ionization-mass
 95 spectrometry of a large number of *C. pneumoniae* proteins.
 Among studies describing immunogenic proteins, we highlight
 the identification by Montigiani *et al.* [10] of immunogenic
 EB surface proteins. They used a genomic and proteomic
 approach based on *in silico* prediction, followed by the
 100 expression and purification of *C. pneumoniae* surface antigens,
 production of mouse immune sera to be used in western
 blotting and fluorescence-activated cell sorter analyses,
 confirmed by mass spectrometry analysis of 2D electrophoresis.
 They obtained 53 antigens, of which 28 were surface
 105 antigens, and their study helped to clarify the organization
 of *C. pneumoniae* surface proteins.

3. *C. pneumoniae* and atherosclerosis

110 The possible influence of vascular infection with *C. pneumoniae*
 on the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease
 was first suggested in 1988 by the results of a seroepide-
 miological study in Finland [3]. This issue has been addressed
 by hundreds of publications since the presence of *C. pneumoniae*
 115 was first identified in coronary atheromas by electron
 microscopy and verified by polymerase chain reaction (PCR)
 and immunohistochemistry [16]. Nevertheless, other studies
 did not find this association, either by direct detection of
 the pathogen in atheromatous plaques in coronary arteries [17]
 120 or in seroepidemiological studies [18,19]. The possible causal
 role of *C. pneumoniae* in the pathogenesis of atherosclerosis
 is controversial because of the several obstacles in establishing
 this association, including the difficulty of avoiding contagion
 124

Table 1. Some characteristics of important *Chlamydomphila pneumoniae* antigens.

Antigens	Size	Function	Presence	Immunogenicity	pl*
LPS [9]	NS	Structural integrity	EBs and RBs	Genus-specific immunogenic	NS
Associated with outer membrane					
MOMP [10]	39.5 kDa	Porin structural integrity	EBs and RBs	No immunodominant	6.1
OmcA [10]	9 kDa	Adhesin Structural integrity	EBs	NS	6.1
OmcB [10]	2 × 60 kDa	Periplasmic adhesin	EBs	Genus-specific immunogenic	5.6
Pmps 1 – 21 [11]	180 – 94 kDa	Autotransporter proteins	EBs and RBs	Immunogenics	5 – 7
OmpH [10]	17.3 kDa	Unknown	Unknown	Unknown	4.7
Omp85 [11]	74 kDa	Unknown	Unknown	Immunogenic	8.3
76 kDa protein [10,12]	68.2 kDa	Unknown	EBs	Species-specific immunogenic	4.9
Associated with cellular processes					
IncA [13]	NS	Developed and mediators of the inclusion membrane	IM	NS	NS
IncB [13]	NS	"	IM	NS	NS
IncC [13]	NS	"	IM	NS	NS
Hsp60 [11]	58 kDa	Chaperone	EBs and RBs	Immunogenic	5.3
Hsp70 [10]	71 kDa	Chaperone	EBs and RBs	Immunogenic	5.6
Low calcium response E protein [10,14]	43 kDa	Regulator type III secretion system	Unknown	Immunogenic	5
Associated with metabolism					
Enolase [10]	46 kDa	Tissue invasion Coagulation	Unknown	Immunogenic	4.7

*Theoretic pl [10,11].

EB: Elementary body; IM: Inclusion membrane; NS: Not specified; pl: Isoelectric point; RB: Reticulate body.

125 by this pathogen and the wide inter-individual variability in the immune response.

130 Clinical manifestations of atherosclerosis vary from coronary artery disease (CAD) to cerebrovascular disease. Several infectious agents have been related to atherosclerosis so far, including cytomegalovirus, herpes simplex virus, *Helicobacter pylori* and *C. pneumoniae*, which is the most widely studied pathogen in this context [20-22]. These relationships may help to explain cases that cannot be attributed to conventional risk factors, including tobacco, hypertension and high serum lipid levels.

135 *C. pneumoniae* has been detected using electron microscopy, immunohistochemistry or PCR in several atheromatous vessels [1,2,23] but not in healthy arteries [24].

140 The presence of viable bacteria in atheromas was demonstrated by reverse transcriptase PCR and confirmed by culture of isolates from coronary and carotid artery samples [25,26]. The culture of *C. pneumoniae* from

atheromatous tissue has only rarely been achieved [25-27], which may be because it is in a latent phase with low metabolic activity, generating forms that are difficult to culture.

145 The effect of *C. pneumoniae* infection in atherosclerosis seems to derive from the persistent presence of the pathogen in cardiovascular tissue, inducing an inflammatory response that initiates or exacerbates the disease. The inflammation of vessel walls plays an essential role in the initiation and progress of atherosclerosis, although there are several routes by which the infectious agent could influence the pathogenesis of this disease.

150 Serological, immunohistochemical and nucleic acid amplification techniques have been used to explore the relationship between infection with *C. pneumoniae* and atherosclerosis, and numerous studies have yielded inconsistent findings. These methods are not standardized, and results vary widely according to the diagnostic method used and even among

161 laboratories using the same methods. There is a need for
a gold-standard method to be established the link between
C. pneumoniae and atherosclerosis.

165 4. *C. pneumoniae* and chronic respiratory disease

Several studies have suggested that there is a direct association
between *C. pneumoniae* infection and the pathogenesis of
170 chronic respiratory disease, such as chronic obstructive
pulmonary disease or asthma [28-30]. Many of the results
in this field have been inconsistent, dividing specialists.
This may be due to differences in study populations,
epidemiologic variations, and limitations of the main
175 diagnostic techniques, for example, serology and PCR. Thus,
the possible role of *C. pneumoniae* in the pathogenesis of
chronic obstructive pulmonary disease remains controversial,
and the consequences of chronic tissue infection with
C. pneumoniae are not clear [31].

180 5. Diagnosis

With respect to serology techniques, the detection of current
disease is hampered by the high prevalence of IgG in adults
185 owing to repeated asymptomatic infections, and by the
absence of IgM in some cases of primary infection [32].
Continuous cell culture remains the prevailing gold standard
for demonstrating current infection by *C. pneumoniae* and
for establishing viability and infectivity, but this technique is
190 complex and has limited sensitivity [33]. According to the
Centers for Disease Control (CDC), a positive result should
only be declared if the strain is propagated by subsequent
passage or is confirmed by another technique, for example,
PCR [32]. Nucleic acid amplification techniques are the most
195 sensitive and have the potential to improve *C. pneumoniae*
detection [34]. However, although they are in wide use to
diagnose *C. pneumoniae* infection, some validation and
standardization issues remain unresolved [35,36].

200 5.1 Cell culture

Cell culture used to be the most widely used technique.
However, the use of culture for the detection of
C. pneumoniae is problematic because of the difficulty of
its growth in cell cultures, especially from tissue samples.
205 Despite the methodological difficulties, it remains in use
to test for current infection by *C. pneumoniae*, characterize
clinical isolates, and establish viability and infectivity.

The results of vascular tissue cultures are not always
reproducible. Some researchers regularly recovered viable
210 *C. pneumoniae* [20,27], whereas other groups reported low
isolation indices [37,38]. The use of culture to detect *C. pneumoniae*
is problematic due to the difficulty of *C. pneumoniae* growth
in cell culture, especially from vascular tissue samples [32].

A highly sensitive culture system was developed by
215 Maass *et al.* [27], who examined 70 samples of coronary

arteries to determine the presence of viable *C. pneumoniae* 216
and *C. pneumoniae* DNA by cell culture and nested PCR,
respectively. Among patients with positive culture, 82% were
positive for PCR in the three independently tested segments
220 of coronary artery and 18% were positive in two of these
three segments. All culture-positive patients were PCR-
positive and six isolates could be permanently propagated by
serial subcultures. The study showed that viable *C. pneumoniae*
can be isolated from samples of atherosclerotic coronary
225 arteries by using a sensitive culture system with several
passages and serum-free medium [39].

5.2 PCR

Numerous molecular amplification techniques based on
genomic sequences have been applied to detect and 230
differentiate *Chlamydia* species, including DNA hybridization
with genomic DNA probes, polymorphic analysis of
restriction fragments of PCR-amplified products and nested
PCR, among others. These techniques have shown a higher
235 sensitivity in comparison to culture and other diagnostic
tests for the detection of *Chlamydia* infection in certain
tissues and respiratory samples [40].

Various in-house PCR assays using different *C. pneumoniae*-
specific oligonucleotides directed against a specific sequence 240
of the bacteria have been developed for its detection in
respiratory, vascular tissue, serum and peripheral blood mono-
nuclear cell samples [32]. The first tests to emerge were the
single-step PCR and the nested PCR. A multiplex format
was recently introduced to detect promoters of community
245 acquired pneumonia, along with different techniques for
visualizing the amplicons [41]. Nevertheless, there is no
commercially available standardized assay that has been
approved by the FDA for the detection in respiratory or
other specimens.

Real-time PCR (RT-PCR) was recently used as a 250
quantitative gene amplification technique to detect bacteria
and viruses associated with respiratory tract diseases [42-46].
The results obtained have been promising, and the sensitivity
and specificity has proved to be higher than those of other
255 assays. In the future, RT-PCR may become a standard
diagnostic method for the quantitative detection of respiratory
infections and perhaps of other infections by *C. pneumoniae*.
Kuoppa *et al.* [46] reported that RT-PCR appeared to be a
more sensitive detection method than nested PCR. Although
260 nested PCR was previously validated as a sensitive and specific
detection method for *C. pneumoniae* compared with other
methods, such as cell culture [46], it does not have the capacity
to be a quantitative measure. Moreover, there is a high risk
of contamination, which can be impossible to avoid [35,36].

Nucleic acid amplification is used to achieve a higher 265
sensitivity of *C. pneumoniae* detection in vascular tissue than
that offered by conventional diagnostic methods. PCR can
detect the DNA or RNA of microorganisms that are present
in small numbers or are not viable or show a low growth
270 rate, and it can be used in tissues not available for culture.

271 Several difficulties remain to be overcome, however,
 mostly in relation to tissue sensitivity and specificity and to
 the validation of new tests. The main reason for this variation
 275 may be the use of different DNA extraction processes and
 PCR protocols. DNA extraction varies considerably according
 to the type of sample, with differences between respiratory
 samples (sputum, nasopharyngeal, throat) and serum or vascular
 tissue samples. With regard to respiratory samples, some
 280 authors obtained larger amounts of DNA of *C. pneumoniae*
 from sputum specimens than from nasopharyngeal and
 throat specimens [46] but there is no consensus on the type
 of sample to be used [35]. Protocols also vary widely, with
 different target genes, distinct types of PCR for the amplification
 and diverse detection methods. Consequently, even if samples
 285 are from the same patient and are analyzed by different
 laboratories, the variation in results can be significant [36].

Apfalter *et al.* [36] conducted a multi-center study on
 different PCR methods used for *C. pneumoniae* detection in
 vascular tissue. All laboratories received aliquots of 20 samples
 290 with the same composition. The maximum concordance was
 25% for one carotid artery sample. There was no consistent
 pattern of positive results among laboratories, and the
 positivity index for individual tests was not correlated with
 their sensitivity values. These findings suggest that the
 295 variability of PCR-detected *C. pneumoniae* prevalence in
 vascular tissue can largely be explained by the different
 methodologies used rather than by distinct quantities of
 microorganisms in the tissue.

Only two multi-center studies have compared different
 300 PCR tests in respiratory samples for the detection of
C. pneumoniae. The first compared an industrial PCR
 kit with 5 in-house PCR assays [47] and the second
 performed quality controls in two different years on 16 and
 18 in-house PCR tests, respectively [48]. Both studies
 305 reported wide variations.

A further shortcoming of PCR is that it yields false
 negatives and false positives. False negatives may result from
 degradation of the DNA by the release of endonucleases [49]
 or the presence of inhibitors, for example, blood or mucus
 310 components [50] and some reagents [51]. The nature of most
 inhibitors in clinical samples remains unknown, hindering
 the development of techniques for their removal. Proposals
 have included the use of alternative methods of sample
 treatment and the introduction of positive internal controls [32].
 315 False positives can result from contamination during laboratory
 processing and sampling or from deficiencies in technique.
 It is important to test for contamination by running negative
 controls subjected to the same handling as the samples, and
 a correct technique is vital. Ieven *et al.* [52] reviewed
 320 investigations of *C. pneumoniae* DNA in a total of 3551
 samples, of which 2688 were found to be negative and 863
 (24.3%) positive. The reported prevalence of *C. pneumoniae*
 in atherosclerotic vessels ranged extremely widely from
 0 to 100%. However, > 6.5% of control arteries were also
 325 PCR-positive and this high positivity in control arteries has

raised doubts about the technique and the selection of 326
 negative control samples.

There are major inter-laboratory variations and it is
 difficult to compare data with the results of other techniques
 because they detect different components (DNA, antibodies, 330
 bacteria viability). Moreover, PCR tests can detect DNA in
 patients without antibodies or with low titers and frequently
 fail to detect DNA in patients with high antibody titers [52].
 For these reasons, among others, standardized tests are not
 yet available. 335

5.3 Serological methods

Infection by *C. pneumoniae* induces IgG, IgA and IgM
 responses that can be detected by serological methods. The
 CDC have established diagnostic criteria for acute infection 340
 by *C. pneumoniae* [32].

Serological testing most often provides only a retrospective
 diagnosis of acute infection because a convalescent serum
 specimen is needed to show a fourfold increase in titer. An
 accurate diagnosis requires paired serum samples, and single 345
 IgG titers lack clinical relevance. There is no reference test
 for validating persistent infection.

The methods used to measure *C. pneumoniae*-specific
 antibodies vary from laboratory to laboratory, and there is a
 need for the improvement, simplification and standardization 350
 of the methods to be used [53].

5.3.1 MIF test

According to the CDC microimmunofluorescence (MIF) is
 the serological method of choice for the diagnosis of acute 355
C. pneumoniae infection [32], but it requires time, is difficult
 to perform and must be subjectively interpreted by an expert
 operator with a fluorescence microscope. Although many
 commercial MIF tests have shown a good concordance,
 there have been reports of significant inter-laboratory 360
 variations. Thus, Littman *et al.* [54] used a standard MIF
 protocol in two laboratories that are leaders in the develop-
 ment of MIF tests and compared specific *C. pneumoniae*
 IgG and IgA titers in 392 individuals. They reported a
 percentage exact agreement of 38 and 55% for IgG and 365
 IgA, respectively, and a percentage agreement for a twofold
 dilution of 66 and 75%, respectively. Peeling *et al.* [55]
 also performed an inter-laboratory study on specific titers
 against *C. pneumoniae* using MIF. Fourteen laboratories were
 sent 10 serum sets for the determination of IgG and IgM, 370
 with each set containing two or three samples from the
 same individual. Globally, the percentage agreement with
 reference standard titers was 80%. Paldanius *et al.* [53]
 measured specific *C. pneumoniae* IgA using one commercial
 and seven in-house tests and an enzyme immunoassay, 375
 reporting a wide variation in the detection of IgA antibodies
 in sera.

Finally, the absence of MIF antibodies in individuals with
 culture-confirmed infection has been reported. This is rare
 in adults but may be more common in young children [56]. 380

381 5.3.2 ELISA

385 ELISAs were developed to overcome the shortcomings
 of MIF. Thus, they require less time, are more objective
 (photometric reading of results) and are easier to standardize
 because results are expressed in international units [57].
 390 ELISAs can be prepared using *C. pneumoniae* EBs with LPS,
C. pneumoniae EBs without LPS or *C. pneumoniae*-specific
 recombinant immune antigens [58]. Although some kits are
 commercially available, none of them have been approved
 by the CDC or the FDA.

In a study of sera from 80 apparently healthy individuals,
 Hermann *et al.* [59] found a high degree of variation in
 the sensitivity of serodiagnostic tests. However, in a
 subsequent investigation by the same group, they reported
 395 that ELISA tests had high specificity and sensitivity and
 showed a good correlation with MIF tests in sera from
 patients with respiratory tract diseases and from control
 children. Antibody titers determined by quantitative ELISA
 also showed an acceptable correlation with those determined
 400 by MIF [60].

ELISA is commonly used in seroepidemiological studies
 because it is less expensive and easier to use on a large scale.
 However, MIF continues in wide use for individual diagnoses,
 when there is no need to process numerous samples. The
 405 higher sensitivity and specificity of ELISA makes it useful
 for disease diagnosis when there is a major increase in IgG
 between two samples [61].

Both MIF and ELISA can produce false positives due to
 crossreactivity with other species of the *Chlamydiaceae* family.
 Thus, in *Chlamydia*, the major genus epitopes locate in
 the LPS and are responsible for most of the serological
 crossreactions. Although LPS has been used in ELISA tests
 to detect IgG, IgA or IgM, alone or in combination, there is
 no definitive consensus on its clinical utility [61]. Serological
 415 studies carried out with EB proteins have mainly employed
 MOMP. On the other hand, the 98 kDa protein, an
 abundant constituent of EB MOMP, shows an important
 species-specific reactivity in immunoblot. Thus, many of the
 EB antigens studied by western blot are essentially species-
 specific, and their application would present a negligible
 420 unspecific reactivity.

Conversely, Hermann *et al.* [60] obtained false negatives
 with ELISA in the samples with the lowest titers (1:64) in
 MIF, whereas true findings were recorded for all samples
 with medium (1:256 and 1:512) and high (1:1024) titers
 425 in MIF.

Findings on the relationship between seropositivity for
C. pneumoniae and atherosclerotic diseases are influenced by
 the serological test used, as they vary widely in sensitivity
 and specificity. Hence, the selection of test has important
 430 implications in epidemiological investigations and in studies
 on *C. pneumoniae* seropositivity as a cardiovascular risk
 factor [57]. There are important inter- and intra-laboratory
 variations in this field and a poor relationship has been
 435 found among the different *C. pneumoniae* tests [62].

5.4 Diagnosis related patents 436

Several different diagnostic methods have been patented that
 use peptides for the *in vitro* detection of *C. pneumoniae*-
 specific infections. Thus, the patent application by Sayvon
 Diagnostics [63] describes a system with a peptide derived
 440 from the variable domain of *C. pneumoniae* MOMP protein.
 Another recent method patented by Sirs Lab GMBH [64]
 can detect antibodies against dnaJ protein and/or a
 hydrolase/phosphatase homologue protein of *C. pneumoniae*.

There are different patents for PCR-related methods
 445 based on the differential diagnosis of representatives of
Chlamydiaceae family. Thus, Ehjdel *et al.* [65] used RT-PCR
 with a single pair of primers of *ompA* gene, which encodes
 for MOMP, and four probes for each of the *Chlamydia*
 species. Other methods are based on PCR differential diagnosis,
 450 using 10 types of the pathogenic bacteria that cause
 respiratory tract infection, and comprise primers of genes
 encoding the 16S rRNA of *C. pneumoniae* and the other
 bacteria [66]. More recently, Gen-Probe, Inc. [67] patented
 a primer set that can amplify a target sequence in the
 455 16S rRNA without using a different primer set for each of
 the bacteria species. Other oligonucleotides that are useful
 for determining whether *C. pneumoniae* is present in a test
 sample are described in a patent application by Cantor
 Colburn LLP [68], which preferentially hybridizes to a target
 460 region present in nucleic acid derived from 23S ribosomal
 nucleic acid of *C. pneumoniae* and not to nucleic acid
 derived from *C. trachomatis* or *C. psittaci*.

6. Prevention 465

The first attempts to develop a vaccine for the *Chlamydia*
 genus were against *C. trachomatis*. These initial vaccines
 were tested with dead or inactivated organisms and, although
 some of them produced a reasonable degree of protection,
 470 the immunization sometimes led to a greater progression of
 the disease. Vaccines with the whole pathogen were abandoned
 for human vaccination, and a vaccine with components of
 the organism was developed thanks to a greater knowledge
 of the structure and pathogenesis of the *Chlamydia* genus.
 475 Most vaccines are immunogenic preparations that induce
 antibody production in animals but offer only partial or no
 protection. Numerous antigens have been proposed as possible
 candidate vaccines to offer partial or temporary immune
 protection, and it has also been suggested that several antigens
 480 be combined to induce an optimal protective response [69].

Some studies indicate that a vaccine capable of inducing
 a Th1 type immune response, characterized by the release
 of IFN- γ , would be effective to eliminate infection by
C. pneumoniae. The role of humoral immunity in protection
 485 against *Chlamydia* infections is probably less important than
 the role of cell-mediated immunity [70].

However, the use of vaccines with live or attenuated
 microorganisms is not desirable because they may produce a
 pathological state. There have been attempts to develop
 490

491 DNA-based vaccines against *C. pneumoniae*. The advantage
of these vaccines is that the DNA will generate the expression
of the recombinant protein within the cell, and it can be
495 presented by the cell for recognition in a class I MHC
molecule response, thereby activating CD8 cells. This may
generate the same type of response as live or attenuated
vaccines but without the safety risk. It is increasingly
clear that DNA vaccines can induce different immune
responses (Th1 and Th2) according to the adjuvant used
500 in the preparation [71].

The protection conferred by DNA vaccines is generally
only partial. This is believed to be related to the weak
in vivo capacity of genes to disseminate within the host,
generating a poor antigenic expression in transfected cells [72].

505 An elevated expression of the antigen is necessary to
improve the immunogenicity of DNA vaccines. This may be
achieved by using stronger promoters or by stabilizing the
mRNA. An improvement in the efficacy of DNA vaccines
requires knowledge of the nature of the antigen, vaccine vector
510 and/or adjuvant and how an effective immune response
is generated [72].

6.1 Possible candidates as vaccines

6.1.1 MOMP

515 MOMP induces an immune response in the different
Chlamydia species, leading to the production of neutralizing
antibodies during infection. This antigen is not considered
immunodominant, although there is evidence of the production
of species-specific monoclonal antibodies that neutralize the
520 infection *in vitro* [73]. This may be advantageous for the
development of a vaccine against *C. pneumoniae* infection.
Numerous efforts have been made to characterize immuno-
dominant epitopes of MOMP but antibody production only
seems to occur under native conditions, because they are
525 conformational epitopes.

6.1.2 OmcB

530 The immune response to this protein is strong and genus-
specific [74]. Although it presents specific epitopes that
generate immunogenicity in its denaturalized form, it has
not been studied in-depth in its conformational form.

The correct selection of adjuvant is essential to develop
the immune response generated. Thus, when OmcB was
used in DNA and protein vaccines with adjuvants that
535 induce a Th2 type response, for example, Freund's complete
adjuvant (FCA), the susceptibility of mice to infection was
higher compared with non-vaccination. This harmful effect
of FCA–OmcB depended on the presence of both CD4 and
CD8 cells. It seems reasonable to think that immunization
540 with FCA–OmcB induces long-lasting memory immune
responses that facilitate *C. pneumoniae* survival or growth.
The enhanced bacterial load in FCA–OmcB-immunized
mice was linked to a markedly worse outcome of infection,
and no protection was offered by FCA as an adjuvant
545 for OmcB [71].

However, a partial protection against *C. pneumoniae* was
546 observed when FCA was replaced by oligodeoxynucleotides
that contain CpG immunostimulatory motifs mixed with
Freund's incomplete adjuvant. The distinct effects on the
infection of the different adjuvants seem to be related
550 to the different responses they induce (Th1 or Th2) and
their stimulation of different cytokines [71]. Similar findings
were also observed after immunization with FCA–Hsp60
of *Chlamydia* [71].

6.1.3 Hsps

Heat-shock proteins (Hsps) are dominant antigens in
555 numerous infections by pathogens, and their potential use
as a vaccine has been proposed. Thus, various vaccination
strategies have been used, inducing a significant protection
560 against different infectious agents, including *H. pylori* [75],
Hioplasma capsulatum [76] and *Mycobacterium tuberculosis* [77].
However, the use of Hsps in DNA or protein vaccines
should be approached with caution because they may induce
565 a crossed immune response, generating autoantibodies, due
to the similarity of sequences between Hsps of *C. pneumoniae*
and humans [78].

6.1.4 Pmps

570 Polymorphic outer membrane proteins (Pmps) are antigens
with considerable potential as vaccines because they are
species-specific with a surface localization and are, therefore,
accessible to antibodies and can induce a humoral response.
Nonetheless, dominant epitopes of Pmps seem to be
575 conformational [79,80]. Therefore, any vaccine based on Pmp
must produce folded Pmps to obtain antibodies that will
bind to native Pmps of *C. pneumoniae*.

Although they are not yet well known and are inadequately
characterized, Pmps stimulated both immune and innate
580 defense during infection in mice with *C. pneumoniae* [81].
It has also been verified that Pmp2 and Pmp10 can induce
neutralizing antibodies that eliminate infection by *C. pneumoniae*
in hamsters [69].

A current research line supports the utilization of
585 multi-antigen combinations to induce an optimal
protective response.

6.1.5 Type III secretion system

590 Type III secretion system in Gram-negative bacteria is
usually related to their pathogenesis, making it attractive for
vaccine design [82]. Thus, another interesting candidate
would be low-calcium-response protein E. This seems to be
present on the surface of EBs and accessible to antibodies,
595 according to Montigiani *et al.* [10], inducing activation of
T CD4 and CD8 cells with cytokine secretion and antibody
neutralization, proving completely effective in the elimination
of the infection [14]. It is, therefore, a candidate as a vaccine
because it is related to the type III secretion system, and an
600 effective blockade of this system may permanently inhibit
the *C. pneumoniae* infectious process [10].

Table 2. *Chlamydomphila pneumoniae* candidate antigens for vaccines and corresponding DNA patented.

Candidate vaccines	Publication number	Applicant	Patents
Outer membrane protein	US2005220805	Aventis Pasteur	[115]
76 kDa protein	US2005202048	Aventis Pasteur	[116]
60 kDa cysteine-rich membrane protein (OmcB)	US2005186266	Aventis Pasteur	[117]
Inclusion membrane protein C	US2004228874	Murdin <i>et al.</i>	[118]
Pomp91B	US2004022801	Murdin <i>et al.</i>	[119]
ATPase	US2003225017	Aventis Pasteur	[120]
98 kDa putative outer membrane protein	US2003170259	Mintz Levin Cohen Ferris Glovs	[121]
Outer membrane protein P6 precursor	US2003161833	Aventis Pasteur	[122]
CPN100149 polypeptide	US2003147924	Aventis Pasteur	[123]
5'-truncated and 3'-truncated 76 kDa protein	US2003095973	Murdin <i>et al.</i>	[124]
CPN100605 polypeptide	US2002150591	Mintz Levin Cohen Ferris Glovs	[125]
Glutamate-binding protein	US2002094965	Murdin <i>et al.</i>	[126]
Lorf2 protein	US2002091096	Murdin <i>et al.</i>	[127]
Transmembrane protein	US2002082402	Murdin <i>et al.</i>	[128]
ATP/ADP translocase	US2002081682	Aventis Pasteur	[129]
89 – 101 kDa and 56.1 kDa proteins family	US7264941	Birkelund <i>et al.</i>	[130]
54 kDa protein	US2004029806	Neutec Pharma PLC	[131]
Proteins encoded by open reading frames	US6822071	California University	[83]
Combinations of immunogenic molecules	WO2005084306	Chiron Corp	[84]
Genomic sequence and nucleotide sequences	US2007053927	Serono Genetics Inst SA	[85]

OmcB: Outer membrane complex protein B.

601 6.1.6 Other components

605 *In vitro*, OmpH and enolase can induce neutralizing antibodies and have shown capacity to inhibit the spread of *C. pneumoniae* in hamsters. These proteins are, therefore, immunoaccessible in EBs and are of research interest as candidate components for vaccines [69].

610 6.2 Prevention related patents

615 Patents have recently been registered for the nucleic acids of these antigens proposed as possible candidate vaccines and other nucleic acids encoding immunogenic proteins (Table 2). These patents describe methods with nucleotide sequences for immunizing a host, including humans, against disease caused by *C. pneumoniae*.

620 *C. pneumoniae*-specific multi-antigen combinations have also been patented. Both polypeptides can be used to prepare pharmaceutical compositions for the prevention of disease, as reflected in patent applications by California University [83] and by Chiron Corp. [84]. The genomic sequence and nucleotide sequences encoding polypeptides of *C. pneumoniae* appear in a patent application by Serono Genetics Institute SA [85].

7. Treatment

623 *C. pneumoniae* is sensitive to macrolides, tetracyclines, 625 quinolones and rifamycins in *in vitro* studies [86-90]. Macrolides are the most widely used antibiotics for *C. pneumoniae* infections. They are effective for acute *C. pneumoniae* infections of the upper respiratory tract owing to their anti-inflammatory and antimicrobial properties, which should 630 be monitored. These antibiotics have an efficacy of around 80% in respiratory tract infections by *C. pneumoniae*. According to these studies, persistence does not seem to be related to the development of resistance to the antibiotics, because the isolates were susceptible to them. One possible 635 explanation may be that the dosage, duration or pharmacokinetics of the treatments were not optimal.

It has been demonstrated that the live respiratory pathogen can be disseminated by monocytes through the systemic circulation and cannot be eliminated from the monocytes by 640 standard antichlamydial treatment. It seems that the persistent state can be spontaneously induced. This state seems to be typical of chlamydiae ingested by human monocytes under *in vitro* culture conditions and is not induced by antibiotics because 644

Table 3. Relevant prospective antibiotic trials performed in humans for CAD and ACS secondary prevention.

Study	Ref.	No. of cases	Clinical cases	Antibiotic	Duration (treatment/follow-up)	Results	
						Differences serologic markers	Differences clinical end points
Gupta <i>et al.</i> (1997)	[98]	60	Post-MI (CAD)	Azithromycin	3 – 6 days/18 months	NO	NO
ROXIS (1999)	[99]	202	Acute non-Q-wave coronary syndromes (ACS)	Roxithromycin	1 month/6 months	NO	NO
ACADEMIC (2000)	[101]	302	Post-MI > 50% stenosis coronary artery (CAD)	Azithromycin	3 months/2 years	NO	NO
STAMINA (2002)	[102]	325	Acute MI unstable angina (ACS)	Azithromycin or amoxicillin	1 week/1 year	NO	SI
CLARIFY (2002)	[103]	148	Acute non-Q-wave MI unstable angina (ACS)	Clarithromycin	3 months/1.5 years		SI
ANTIBIO (2003)	[104]	872	Acute MI (ACS)	Roxithromycin	6 weeks/1 year		NO
WIZARD (2003)	[105]	7747	Post-MI (CAD)	Azithromycin	3 months/3 years	NO	NO
ACES (2005)	[106]	4012	Stable CAD (CAD)	Azithromycin	12 months/4 years		NO
AZACS (2003)	[107]	1439	Acute MI unstable angina (ACS)	Azithromycin	5 days/6 months		NO
PROVE-IT (2005)	[108]	4162	ACS	Gatifloxacin	2 weeks + 10 days each month/2 years	NO	NO

ACS: Acute coronary syndrome; CAD: Coronary artery disease; MI: Myocardial infarction.

645 it occurs without any antibiotic supplementation. The inclusions and their content were morphologically different from what is found in the acute infection of epithelial cells.

650 *Chlamydiae* can survive an antichlamydial therapy within monocytes *in vitro* and *in vivo*. Optimal regimens for chlamydial eradication from monocytes are not known. In fact, this may seriously affect the current efforts made in large prospective trials to alleviate clinical CAD symptoms by antichlamydial treatment [91].

655 7.1 Studies in animal models

660 Numerous studies have suggested an association between various pathogens and CAD. These pathogens can stimulate inflammatory responses, and the pathogens and inflammation together may contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. The presence of herpes simplex virus, cytomegalovirus, *C. pneumoniae*, *H. pylori* and dental pathogens has been reported in patients with this disease. These agents have been studied in animal models to explore this possible relationship but a positive association was only found with

665 *C. pneumoniae* and cytomegalovirus. A study on the interaction between *C. pneumoniae* and murine cytomegalovirus in normocholesterolemic mice indicated that further interacting mechanisms participate in the development of chronic arterial diseases [92].

670 *C. pneumoniae* pathogenicity in cardiovascular diseases was demonstrated by several studies in white New Zealand (NZ) rabbits intranasally injected with *C. pneumoniae* [93-95]. These rabbits can develop atherosclerosis if fed with a cholesterol-rich diet. Early atherosclerosis was observed in infected animals fed with a normal diet [93,94]. Among NZ 675 rabbits fed a cholesterol-rich diet, infected animals showed a faster development of atherosclerosis and larger lesions in comparison to non-infected animals [95].

680 In studies on mice deficient in LDL and apolipoprotein E, a group infected with *C. pneumoniae* developed hypercholesterolemia, inducing atherosclerotic disease [96,97].

7.2 Trials with antibiotics

685 Based on *in vitro* and animal study results, numerous investigations have been conducted in humans to determine the benefits of antibiotic therapy in the treatment of cardiovascular events (Table 3).

690 The first small pilot trials on antibiotic therapy for secondary prevention of cardiovascular events seemed to show that the administration of macrolides was of benefit. Gupta *et al.* [98] reported lower IgG anti-*C. pneumoniae* titers in an azithromycin-treated group than in a control group at 6 months after the end of treatment. However, subsequent studies found no significant effects on cardiovascular mortality or serologic markers. The 694

695 ROXIS (the Roxithromycin in Ischemic Syndromes)
study [99] used roxithromycin and found no changes in
anti-*C. pneumoniae* titers between treated and control
groups. The authors reported a clinical benefit in preventing
death and reinfarction for at least 6 months after initial
700 treatment, although significance was not reached.

In the light of the above findings, studies with larger sample
sizes and longer follow-up periods were conducted. Thus, a
randomized study of 302 *C. pneumoniae*-seropositive patients
with CAD treated for 3 months with azithromycin showed no
705 reduction in secondary cardiovascular events after a 6-month
follow-up [100]. However, there was a reduction in four inflam-
matory markers (C-reactive protein, IL-1, IL-6 and TNF- α)
in the treated group. After 2 years of follow-up, there remained
no differences between the treated and non-treated groups [101].

710 Encouraging results were reported by the STAMINA
(South Thames Trial of Antibiotics in Myocardial Infarction
and Unstable Angina) study [102], which compared outcomes
in acute coronary syndrome (ACS) patients receiving antibiotics
against *C. pneumoniae* and *H. pylori* with those in ACS patients
without this treatment. At 12 weeks, patients under antibiotic
715 treatment showed 36% fewer major events (cardiac-related
death or new ACS) compared with the placebo group. The
effect of antibiotic therapy in the secondary prevention of
ACS was also assessed in the CLARIFY (Clarithromycin in
Acute Coronary Syndrome Patients in Finland) study [103],
720 in which a group of 148 patients with acute non-Q-wave
coronary syndrome or unstable angina were randomly assigned
to clarithromycin or placebo treatment for 3 months. The
results of these two studies were not sufficiently conclusive
725 to confirm the benefits of clarithromycin treatment.

The ANTIBIO (Antibiotic Therapy in Acute Myocardial
Infarction) study [104] found that a 6-week course of
roxithromycin showed no benefits in 872 patients with acute
myocardial infarction after a 1-year follow-up.

730 The WIZARD (Weekly Intervention with Zithromax for
Atherosclerosis and its Related Disorders) study [105] was the
first large randomized placebo-controlled trial to examine
the role of antibiotics in the prevention of CAD. More than
7000 *C. pneumoniae*-seropositive patients with a history of
735 stable myocardial infarction underwent a 3-month treatment
with placebo or azithromycin. The drug treatment only
produced a 7% reduction in myocardial infarction incidence,
hospitalization for unstable angina or need for revascularization
at 3 years. Nonetheless, a possible benefit was indicated
740 during and up to 6 months after treatment, with a 33%
reduction in death and myocardial infarction. These outcomes
raised questions about the clinical benefits of prolonged
antimicrobial therapy.

745 The ACES (Azithromycin and Coronary Events Study)
trial [106] was conducted in 4000 adults with stable CAD.
Patients were randomly treated with azithromycin or placebo
for 1 – 12 months. After 4 years, no difference in cardio-
vascular end points was found between the azithromycin- and
749 placebo-treated groups.

The AZACS (Azithromycin in Acute Coronary Syndrome) 750
study [107] of 1450 patients with ACS included patients who
were serologically positive or negative for *C. pneumoniae*.
They were treated with azithromycin for only 5 days and
followed up for 6 months, finding no ischemic benefits. The
AZACS study indicates with reasonable power and certainty 755
that short-term azithromycin treatment is of no benefit and
does not reduce the development of recurrent events in
patients with ACS.

The PROVE-IT (Pravastatin or Atorvastatin Evaluation
and Infection therapy) study [108] enrolled 4162 patients 760
with ACS. Subjects received gatifloxacin or placebo daily
during an initial 2-week course of therapy that began
2 weeks after randomization, followed by a 10-day course
every month for the duration of the trial (mean duration,
765 2 years). No benefits were observed in secondary end points
or in patients with elevated titers for *C. pneumoniae* or
C-reactive protein.

The encouraging results of preliminary studies with
antibiotics have not been repeated in large trials. Controversial
questions include the selection of antibiotic (bacteriostatic 770
or bactericide) and the need for a combination of antibiotics,
as used in tuberculosis treatments. In a study of great interest,
Gieffers *et al.* [91] reported that *C. pneumoniae* infects
circulating monocytes and that antibiotics cannot inhibit its
growth within them. The elimination of vascular infection 775
with antibiotics may be difficult if the *C. pneumoniae*
residing in monocytes, which can disseminate the pathogen,
is resistant to antibiotics [109].

7.3 Treatment related patents 780

Antibiotics or combinations of antibiotics from antibiotic
families commonly used to treat *C. pneumoniae* infection
have been shown to combat atherosclerosis. These include
azithromycin, a macrolide antibiotic, included in a patent
application by Pfizer, Inc. [110], and azithromycin administered 785
in combination with a glycogen phosphorylase inhibitor in
synergistic effective amounts. This method was discovered
by Pfizer, Inc. [111].

Alternative treatments against acute lower respiratory tract
infections due to *C. pneumoniae* have been developed, such 790
as thiamphenicol, patented by Zambon Group SPA [112],
which represents an alternative to clarithromycin, and Rifalazil,
a rifamycin, patented by Kaneka Corp. [113] and developed
to replace rifampin. It has superior antimicrobial activity
and high intracellular levels. 795

Recently, Innate Pharmaceuticals Ab [114] patented a
method of treating respiratory infection and atherosclerosis
that comprises a pharmacologically effective amount of a
type III secretion blocker. 800

8. Conclusions

C. pneumoniae is a pathogen that infects most population
throughout their lives. Although primary infection is usually 804

805 subclinical, it can cause pneumonia, bronchitis, pharyngitis
and sinusitis. A rapid and unequivocal diagnosis is very
important but hampered by the lack of standardized
diagnostic methods for serology and PCR and by inter- and
intra-laboratory variations.
810 PCR is a promising tool for the diagnosis of primary or
chronic *C. pneumoniae* infections and other *C. pneumoniae*-
associated infections. Although our knowledge of *C. pneumoniae*
proteomics is at a very initial stage, its study will decisively
improve our understanding of the final pathogenic mechanisms
815 that produce the disease in humans and will assist the
development of vaccines.

9. Expert opinion

820 The past decade has seen controversial reports on the
relationship between *C. pneumoniae*, responsible for respiratory
diseases, and atherosclerosis.

Numerous PCR tests have been developed to detect this
pathogen in respiratory samples, providing improved and
825 faster results. Each type of PCR offers different advantages
and disadvantages that must be taken into account before
their utilization in clinical practice. RT-PCR has shown high
sensitivity and specificity, and multiplex yields savings in
time and costs, and a combination of the two methods offers
830 a promising approach. Work is already in progress on a real
time multiplex polymerase chain reaction or duplex RT-PCR
for *C. pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*, which cause
the majority of atypical community pneumonias.

The main difficulty with the diagnosis of *C. pneumoniae*
835 infection in atherosclerosis is the lack of standardized tests,
reflected in the wide variation in results among studies.
Further prospective studies on atherosclerosis are warranted
because there is at present no serodiagnostic tool available to
838

detect persistent infections. Serological tests that differentiate 839
between past and persistent infections may offer the key to 840
resolving its possible role in CAD. Proteomics has much
to contribute in this respect, obtaining selective antigens or
combinations of antigens associated with persistent infection
and improving the serodiagnosis in these infected patients.
Another research line of interest is the role in the genesis 845
of CAD played by novel biomarkers such as neopterin
or lactoferrin.

Although antimicrobial therapy is relatively effective in
acute infections, clinical trials on CAD prevention have not
found it to be effective in chronic infections. Because mono- 850
cytes can be infected and antibiotics cannot fully inhibit
chlamydial growth, antibiotic therapy may not be sufficient
to prevent or eliminate infection of vascular tissue. For this
reason, new approaches should be adopted in the design of 855
assays and therapies against atherosclerosis associated with
chronic infection.

The development of an effective vaccine is another challenge
that has yet to be overcome, due to lack of knowledge on
the immune host response and antigenic proteins. The ideal
strategy would be to obtain a long-lasting protective immunity 860
with a contribution from both humoral and cell immunity,
although the latter seems to be more important. Proteomic
studies have not yet identified a highly immunogenic and
specific protein that could be a target for a vaccine, although
865 novel candidates have recently been proposed, including
Pmps. The use of preparations with several antigens may
lead to the development of an effective vaccine.

Declaration of interest

The authors state no conflict of interest and have received 870
no payment in preparation of this manuscript. 872

Bibliography

Papers of special note have been highlighted
as either of interest (•) or of considerable
interest (••) to readers.

<p>1. Grayston JT, Kuo CC, Coulson AS, et al. Chlamydia pneumoniae (TWAR) in atherosclerosis of the carotid artery. <i>Circulation</i> 1995;92:3397-400</p> <p>2. Kuo CC, Shor A, Campbell LA, et al. Demonstration of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic lesions of coronary arteries. <i>J Infect Dis</i> 1993;167:841-9</p> <p>3. Saikku P, Leinonen M, Mattila K, et al. Serological evidence of an association of a novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. <i>Lancet</i> 1988;2:983-6</p> <p>4. Kuo CC, Chen HH, Wang SP, et al. Identification of a new group of Chlamydia</p>	<p>psittaci strains called TWAR. <i>J Clin Microbiol</i> 1986;24:1034-7</p> <p>• First study in the literature reporting <i>C. pneumoniae</i> as a new species.</p> <p>5. Villegas E, Sorlózano A, Camacho A, Gutiérrez J. Chlamydia pneumoniae: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. <i>Enferm Infecc Microbiol Clin</i> 2008; In press</p> <p>6. Hogan RJ, Mathews SA, Mukhopadhyay S, et al. Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm. <i>Infect Immun</i> 2004;72(4):1843-55</p> <p>7. Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, et al. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. <i>Infect Immun</i> 1994;62:3705-11</p> <p>8. Geisler WM, Suchland RJ, Rockey DD, Stamm WE. Epidemiology and clinical</p>	<p>manifestations of unique Chlamydia trachomatis isolates that occupy nonfusogenic inclusions. <i>J Infect Dis</i> 2001;184:879-84</p> <p>9. Peterson EM, de la Maza LM, Brade L, Brade H. Characterization of a neutralizing monoclonal antibody directed at the lipopolysaccharide of Chlamydia pneumoniae. <i>Infect Immun</i> 1998;66(8):3848-55</p> <p>10. Montigiani S, Falugi F, Scarselli M, et al. Genomic approach for analysis of surface proteins in Chlamydia pneumoniae. <i>Infect Immun</i> 2002;70:368-79</p> <p>•• Excellent study analyzing and identifying a large number of <i>C. pneumoniae</i> proteins.</p> <p>11. Vandahl BB, Birkelund S, Demol H, et al. Proteome analysis of the Chlamydia</p>
--	---	---

- pneumoniae elementary body. Electrophoresis 2001;22:1204-23
- **Excellent study making major contribution to *C. pneumoniae* proteomics, identifying and describing numerous proteins.**
12. Perez Melgosa M, Kuo CC, Campbell LA. Isolation and characterization of a gene encoding a Chlamydia pneumoniae 76-kilodalton protein containing a species-specific epitope. Infect Immun 1994;62(3):880-6
 13. Bannantine JP, Griffiths RS, Viratyosin W, et al. A secondary structure motif predictive of protein localization to the chlamydial inclusion membrane. Cell Microbiol 2000;2(1):35-47
 14. Thorpe C, Edwards L, Snelgrove R, et al. Discovery of a vaccine antigen that protects mice from Chlamydia pneumoniae infection. Vaccine 2007;25(12):2252-60
 15. Molestina RE, Klein JB, Millar RD, et al. Proteomic analysis of differentially expressed Chlamydia pneumoniae genes during persistent infection of HEp-2 cells. Infect Immun 2002;70(6):2976-81
 16. Shor A, Kuo CC, Patton DL. Detection of Chlamydia pneumoniae in coronary arterial fatty streaks and atheromatous plaques. S Afr Med J 1992;82:158-61
 17. Thomas M, Wong Y, Thomas D, et al. Relation between direct detection of Chlamydia pneumoniae DNA in human coronary arteries at postmortem examination and histological severity staining of associated atherosclerotic plaque. Circulation 1999;99(21):2733-6
 18. Bloemenkamp DG, Mali WP, Visseren FL, van der Graaf Y. Meta-analysis of sero-epidemiologic studies of the relation between Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: does study design influence results? Am Heart J 2003;145(3):409-17
 19. Puolakkainen M, Kuo CC, Shor A, et al. Serological response to Chlamydia pneumoniae in adults with coronary arterial fatty streaks and fibrolipid plaques. J Clin Microbiol 1993;31:2212-4
 20. Bartels C, Maass M, Bein G, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae but not cytomegalovirus in occluded saphenous vein coronary artery bypass grafts. Circulation 1999;99:879-82
 21. Choussat R, Montalescot G, Collet J, et al. Effect of prior exposure to Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, or cytomegalovirus on the degree of inflammation and one-year prognosis of patients with unstable angina pectoris or non-Q-wave acute myocardial infarction. Am J Cardiol 2000;86:379-84
 22. Espinola-Klein C, Rupprecht HJ, Blankenberg S, et al. Are morphological or functional changes in the carotid artery wall associated with Chlamydia pneumoniae, Helicobacter pylori, cytomegalovirus, or herpes simplex virus infection? Stroke 2000;31:2127-33
 23. Kuo CC, Gown AM, Benditt EP, Grayston JT. Detection of Chlamydia pneumoniae in aortic lesions of atherosclerosis by immunocytochemical stain. Arterioscler Thromb 1993;13:1501-4
 24. Fong IW. Emerging relations between infectious diseases and coronary artery disease and atherosclerosis. CMAJ 2000;163(1):49-56
 25. Ramirez JA. Isolation of Chlamydia pneumoniae from the coronary artery of a patient with coronary atherosclerosis. The Chlamydia pneumoniae/Atherosclerosis Study Group. Ann Intern Med 1996;125(12):979-82
 26. Jackson LA, Campbell LA, Kuo CC, et al. Isolation of Chlamydia pneumoniae from a carotid endarterectomy specimen. J Infect Dis 1997;176:292-5
 27. Maass M, Bartels C, Engel PM, et al. Endovascular presence of viable Chlamydia pneumoniae is a common phenomenon in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 1998;31:827-32
 28. Paldanius M, Juvonen R, Leinonen M, et al. Asthmatic persons are prone to the persistence of Chlamydia pneumoniae antibodies. Diagn Microbiol Infect Dis 2007;59:117-22
 29. Black PN, Scicchitano R, Jenkins CR, et al. Serological evidence of infection with Chlamydia pneumoniae is related to the severity of asthma. Eur Respir J 2000;15:254-9
 30. Miyashita N, Niki Y, Nakajima M, et al. Chlamydia pneumoniae infection in patients with diffuse panbronchiolitis and COPD. Chest 1998;114:969-71
 31. Droemann D, Rupp J, Goldmann T, et al. Disparate innate immune responses to persistent and acute Chlamydia pneumoniae infection in chronic obstructive pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med 2007;175(8):791-7
 32. Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing Chlamydia pneumoniae assays: recommendations from the centers for disease control and prevention (USA) and the laboratory centre for disease control (Canada). Clin Infect Dis 2001;33:492-503
 - **Current recommendations for standardizing *C. pneumoniae* diagnostic assays.**
 33. Boman J, Hammerschlag MR. Chlamydia pneumoniae and atherosclerosis: critical assessment of diagnostic methods and relevance to treatment studies. Clin Microbiol Rev 2002;15:1-20
 - **Paper extensively analyzing *C. pneumoniae* diagnostic methods related to atherosclerosis.**
 34. Boman J, Gaydos CA, Quinn TC. Molecular diagnosis of Chlamydia pneumoniae infection. J Clin Microbiol 1999;37:3791-9
 35. Kumar S, Hammerschlag MR. Acute respiratory infection due to Chlamydia pneumoniae: current status of diagnostic methods. Clin Infect Dis 2007;44(4):568-76
 36. Apfalter P, Blasi F, Boman J, et al. Multicenter comparison trial of DNA extraction methods and PCR assays for detection of Chlamydia pneumoniae in endarterectomy specimens. J Clin Microbiol 2001;39:519-24
 37. Kuo CC, Coulson AS, Campbell LA, et al. Detection of Chlamydia pneumoniae in atherosclerotic plaques in the walls of arteries of lower extremities from patients undergoing bypass operation for arterial obstruction. J Vasc Surg 1997;26:29-31
 38. Weiss SM, Roblin PM, Gaydos CA, et al. Failure to detect Chlamydia pneumoniae in coronary atheromas of patients undergoing atherectomy. J Infect Dis 1996;173:957-62
 39. Maass M, Harig U. Evaluation of culture conditions used for isolation of Chlamydia pneumoniae. Am J Clin Pathol 1995;103:141-8
 40. 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;38:1085-93
 41. Carrillo JA, Gutierrez J, Garcia F, et al. Reliability of multiplex test to detect atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood. Clin Microbiol Infect 2009; In press
 42. Morozumi M, Nakayama E, Iwata S, et al. Simultaneous detection of pathogens in

- clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *J Clin Microbiol* 2006;44:1440-6
43. Loens K, Beck T, Goossens H, et al. Development of conventional and real-time nucleic acid sequence-based amplification assays for detection of *Chlamydomphila pneumoniae* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2006;44:1241-4
 44. Hardick J, Maldeis N, Theodore M, et al. Real-time PCR for *Chlamydia pneumoniae* utilizing the Roche Lightcycler and a 16S rRNA gene target. *J Mol Diagn* 2004;6:132-6
 45. Apfalter P, Barousch W, Nehr M, et al. Comparison of a new quantitative *ompA*-based real-time PCR TaqMan assay for detection of *Chlamydia pneumoniae* DNA in respiratory specimens with four conventional PCR assays. *J Clin Microbiol* 2003;41:592-600
 46. Kuoppa Y, Boman J, Scott L, et al. Quantitative detection of respiratory *Chlamydia pneumoniae* infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2273-4
 47. Chernesky M, Smieja M, Schachter J, et al. Comparison of an industry-derived LCx *Chlamydia pneumoniae* PCR research kit to in-house assays performed in five laboratorios. *J Clin Microbiol* 2002;40:2357-62
 48. Loens K, Beck T, Ursi D, et al. Two quality control exercises involving nucleic acid amplification methods for detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydomphila pneumoniae* and carried out 2 years apart (in 2002 and 2004). *J Clin Microbiol* 2006;44(3):899-908
 49. Meijer A, van der Vliet JA, Roholl PJM, et al. *Chlamydia pneumoniae* in abdominal aortic aneurysms-abundance of membrane components in the absence of heat shock protein 60 and DNA. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2680-6
 50. Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(2):242-56
 51. Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology; 1993
 52. Ieven MM, Hoymans VY. Involvement of *Chlamydia pneumoniae* in atherosclerosis: more evidence for lack of evidence. *J Clin Microbiol* 2005;43:19-24
 53. Paldanius M, Bloigu A, Leinonen M, Saikku P. Measurement of *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin A (IgA) antibodies by the microimmunofluorescence (MIF) method: comparison of seven fluorescein-labeled anti-human IgA conjugates in a in-house MIF test using one commercial MIF and one enzyme immunoassay kit. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:8-12
 54. Littman AJ, Jackson LA, White E, et al. Interlaboratory reliability of microimmunofluorescence test for measurement of *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin A and G antibody titers. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11(3):615-7
 55. Peeling RW, Wang SP, Grayston JT, et al. *Chlamydia pneumoniae* serology: interlaboratory variation in microimmunofluorescence assay results. *J Infect Dis* 2000;181(Suppl 3):S426-9
 56. Kutlin A, Roblin PM, Hammerschlag MR. Antibody response to *Chlamydia pneumoniae* infection in children with respiratory illness. *J Infect Dis* 1998;177(3):720-4
 57. Hoymans VY, Bosmans JM, Van Renterghem L, et al. Importance of methodology in determination of *Chlamydia pneumoniae* seropositivity in healthy subjects and in patients with coronary atherosclerosis. *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4049-53
 - **Interesting study comparing different serologic methods (MIF and ELISA) in diagnosis of *C. pneumoniae* infection.**
 58. Kutlin A, Tsumura N, Emre U, et al. Evaluation of *Chlamydia* immunoglobulin M (IgM), Ig G, and Ig A ELISAs Medac for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997;4:213-6
 59. Hermann C, Graf K, Groh A, et al. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol* 2002;40:1603-9
 60. Hermann C, Gueinzus K, Oehme A, et al. Comparison of quantitative and semiquantitative enzyme-linked immunosorbent assays for immunoglobulin G against *Chlamydomphila pneumoniae* to a microimmunofluorescence test for use with patients with respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2476-9
 - **Interesting study comparing different serologic methods (MIF and ELISA) in diagnosis of *C. pneumoniae* infection in patients with respiratory tract infections.**
 61. Gutiérrez J, Mendoza J, Fernández F. ELISA test to detect *Chlamydomphila pneumoniae* IgG. *J Basic Microbiol* 2002;42:13-8
 62. Gutiérrez J, de Dios Luna J, Linares J, et al. Relationship between peripheral arterial occlusive disease (PAOD) and chronic *Chlamydomphila* (*Chlamydia*) *pneumoniae* infection. A meta-analysis. *Thromb Haemost* 2005;93(6):1153-60
 63. Sayvon Diagnostics. WO9857981; 1998
 64. Sirs Lab GmbH. WO2007085459; 2007
 65. Ehjdel IA, Ehjdel MV, Narezkina AD. RU2241042; 2004
 66. Meiji Seika Kaisha. JP2005110545; 2005
 67. Gen-Probe Inc. US2007059735; 2007
 68. Cantor Colburn Llp. US2006246473; 2006
 69. Finco O, Bonci A, Agnudei M, et al. Identification of new potential vaccine candidates against *Chlamydia pneumoniae* by multiple screenings. *Vaccine* 2005;23(9):1178-88
 70. Penttilä T. Induction of immunity against experimental *Chlamydia pneumoniae* infection. Helsinki: University of Helsinki; 2004
 71. Bandholtz L, Kreuger MR, Svanholm C, et al. Adjuvant modulation of the immune responses and the outcome of infection with *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Exp Immunol* 2002;130(3):393-403
 72. Bergmann-Leitner ES, Leitner WW. Danger, death and DNA vaccines. *Microbes Infect* 2004;6:319-27
 73. Puolakkainen M, Parker J, Kuo CC, et al. Further characterization of *Chlamydia pneumoniae* specific monoclonal antibodies. *Microbiol Immunol* 1995;39:551-4
 74. Mygind P, Christiansen G, Persson K, Birkelund S. Analysis of the humoral immune response to *Chlamydia* outer membrane protein 2. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:313-8
 75. Ferrero RL, Thilberge JM, Kansau I, et al. The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against

- mucosal infection in mice. Proc Natl Acad Sci 1995;92:6499-503
76. Gomez FJ, Allendoerfer R, Deepe GS Jr. Vaccination with recombinant heat shock protein 60 from *Histoplasma capsulatum* protects mice against pulmonary histoplasmosis. Infect Immun 1995;63:2587-95
 77. Silva CL, Lowrie DB. A single mycobacterial protein (hsp65) expressed by a transgenic antigen-presenting cell vaccinates mice against tuberculosis. Immunology 1994;82:244-8
 78. Zugel U, Kaufmann SH. Role of heat shock proteins in protection from and pathogenesis of infectious diseases. Clin Microbiol Rev 1999;12:19-39
 79. Christiansen G, Ostergaard L, Birkelund S. Molecular biology of the *Chlamydia pneumoniae* surface. Scand J Infect Dis Suppl 1997;104:5-10
 80. Knudsen K, Madsen AS, Mygind P, et al. Identification of two novel genes encoding 97- to 99-kilodalton outer membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae*. Infect Immun 1999;67:375-83
 81. Mygind T, Vandahl B, Pedersen AS, et al. Identification of an in vivo CD4+ T cell mediated response to polymorphic membrane proteins of *Chlamydia pneumoniae* during experimental infection. FEMS Immunol Med Microbiol 2004;40(2):129-37
 82. Cornelis GR, Van Gijsegem F. Assembly and function of type III secretory systems. Ann Rev Microbiol 2000;54:735-74
 83. Univ California. US6822071; 2004
 84. Chiron Corp. WO2005084306; 2005
 85. Serono Genetics Inst SA. US2007053927; 2007
 86. Roblin PM, Montalban G, Hammerschlag MR. Susceptibilities to clarithromycin and erythromycin of isolates of *Chlamydia pneumoniae* from children with pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1994;38(7):1588-9
 87. Roblin PM, Hammerschlag M. Microbiologic efficacy of azithromycin and susceptibilities to azithromycin of isolates of *Chlamydia pneumoniae* from adults and children with community-acquired pneumonia. Antimicrob Agents Chemother 1998;42(1):194-6
 88. Hammerschlag MR, Roblin PM. Microbiologic efficacy of moxifloxacin for the treatment of community-acquired pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*. Int J Antimicrob Agents 2000;15(2):149-52
 89. Hammerschlag MR, Roblin PM. Microbiological efficacy of levofloxacin for treatment of community-acquired pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2000;44(5):1409
 90. Gieffers J, Solbach W, Maass M. In vitro susceptibilities of *Chlamydia pneumoniae* strains recovered from atherosclerotic coronary arteries. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2762-4
 91. Gieffers J, Füllgraf H, Jahn J, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in circulating human monocytes is refractory to antibiotic treatment. Circulation 2001;103:351-6
 92. Burian K, Berencsi K, Endresz V, et al. *Chlamydia pneumoniae* exacerbates aortic inflammatory foci caused by murine cytomegalovirus infection in normocholesterolemic mice. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8(6):1263-6
 93. Fong IW, Chiu B, Viira E, et al. Rabbit model for *Chlamydia pneumoniae* infection. J Clin Microbiol 1997;35:48-52
 94. Laitinen K, Laurila A, Pyhala L, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection induces inflammatory changes in the aortas of rabbits. Infect Immun 1997;65:4832-5
 95. Muhlestein JB, Anderson JL, Hammond EH, et al. Infection with *Chlamydia pneumoniae* accelerates the development of atherosclerosis and treatment with azithromycin prevents it in a rabbit model. Circulation 1998;97:633-6
 96. Hu H, Pierce GN, Zhang G. Atherogenic effects of *Chlamydia* are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. J Clin Invest 1999;103:747-53
 97. Moazed TC, Campbell LA, Rosenfield ME, et al. *Chlamydia pneumoniae* infection accelerates the progression of atherosclerosis in alipoprotein E-deficient mice. J Infect Dis 1999;180:238-41
 98. Gupta S, Leathan EW, Carrington D, et al. Elevated *Chlamydia pneumoniae* antibodies, cardiovascular events and azithromycin in male survivors of myocardial infarction. Circulation 1997;96:404-7
 99. Gurfinkel C, Bozovich G, Beck E, et al. Treatment with the antibiotic roxithromycin in patients with acute non-Q-wave coronary syndromes. The final report of the ROXIS Study. Eur Heart J 1999;20:121-7
 100. Anderson JL, Muhlestein JB, Carlquist J, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease and serological evidence for *Chlamydia pneumoniae* infection. Circulation 1999;99:1540-7
 101. Muhlestein JB, Anderson JL, Carlquist JF, et al. Randomized secondary prevention trial of azithromycin in patients with coronary artery disease: primary clinical results of the ACADEMIC study. Circulation 2000;102:1755-60
 102. Stone AF, Mendall MA, Kaski JC, et al. Effect of treatment for *Chlamydia pneumoniae* and *Helicobacter pylori* on markers of inflammation and cardiac events in patients with acute coronary syndromes: south thames trial of antibiotics in myocardial infarction and unstable angina (STAMINA). Circulation 2002;106:1219-23
 103. Sinisalo J, Mattila K, Valtonen V, et al. Effect of 3 months of antimicrobial treatment with clarithromycin in acute non-Q-wave coronary syndrome. Circulation 2002;105:1555-60
 104. Zahn R, Schneider S, Frilling B, et al. Antibiotic therapy after acute myocardial infarction: a prospective randomized study. Circulation 2003;107:1253-9
 105. O'Connor CM, Dunne MW, Pfeffer MA, et al. Investigators in the WIZARD [Weekly Intervention with Zithromax for Atherosclerosis and its Related Disorders] Study. Azithromycin for the secondary prevention of coronary heart disease events: the WIZARD study: a randomized controlled trial. JAMA 2003;290:1459-66
 106. Grayston JT, Kronmal RA, Jackson LA, et al. ACES Investigators. Azithromycin for the secondary prevention of coronary events. N Engl J Med 2005;352:1637-45
 107. Cercek B, Shah PK, Noc M, et al. AZACS Investigators. Effect of short-term treatment with azithromycin on recurrent ischaemic events in patients with acute coronary syndrome in the Azithromycin in Acute Coronary Syndrome (AZACS) trial: a randomised controlled trial. Lancet 2003;361:809-13
 108. Cannon CP, Braunwald E, McCabe CH, et al. Antibiotic treatment of *Chlamydia pneumoniae* after acute coronary

- syndrome. *N Engl J Med* 2005;352(16):1646-54
109. Anderson JL, Muhlestein JB. Antibiotic trials for coronary heart disease. *Tex Herat Inst J* 2004;31(1):33-8
- **Interesting summary of antibiotic trials in patients with coronary heart disease who are seropositive for *C. pneumoniae*.**
110. Pfizer. US6281199; 2001
111. Pfizer Inc. US2004082614; 2004
112. Zambon Group S.p.A. US2003100614; 2003
113. Kaneka Corporation. US6566354; 2003
114. Innate Pharmaceuticals Ab. WO2006132583; 2006
115. Aventis Pasteur. US2005220805; 2005
116. Aventis Pasteur. US2005202048; 2005
117. Aventis Pasteur. US2005186266; 2005
118. Murdin AD, Oomen RP, Dunn PL. US2004228874; 2004
119. Murdin AD, Oomen RP, Dunn PL. US2004022801; 2004
120. Aventis Pasteur. US2003225017; 2003
121. Mintz Levin Cohen Ferris Glovs. US2003170259; 2003
122. Aventis Pasteur. US2003161833; 2003
123. Aventis Pasteur. US2003147924; 2003
124. Murdin AD, Oomen RP, Dunn PL. US2003095973; 2003
125. Mintz Levin Cohen Ferris Glovs. US2002150591; 2002
126. Murdin AD, Oomen RP, Wang J. US2002094965; 2002
127. Murdin AD, Oomen RP, Dunn PL. US2002091096; 2002
128. Murdin AD, Oomen RP, Wang J. US2002082402; 2002
129. Aventis Pasteur. US2002081682; 2002
130. Birkelund S, Christiansen G, Pedersen AH, et al. US7264941; 2007
131. Neutec Pharma PLC. US2004029806; 2004

Affiliation

Enrique Villegas¹ PhD, Ana Camacho² PhD, Antonio Sorlózano¹ MD PhD, José Rojas³ PhD & José Gutiérrez^{†1} MD PhD

[†]Author for correspondence

¹University of Granada, School of Medicine, Department of Microbiology, Avda de Madrid 11, E-18012 Granada, Spain
Tel: +34 958 24 20 71; Fax: +34 958 24 61 19;

E-mail: josegf@ugr.es

²Laboratory Vircell, Department of Molecular Biology, Granada, Spain

³Management D&R, Laboratory Vircell, Granada, Spain

Development and evaluation of a multiplex test for the detection of atypical bacterial DNA in community-acquired pneumonia during childhood

J. A. Carrillo¹, J. Gutiérrez², F. García³, A. Muñoz³, E. Villegas², J. Rojas¹, A. Sorlózano² and A. Rojas¹

1) Laboratory Vircell, Santa Fe, Granada, 2) Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada and

3) Departamento de Pediatría, Hospital Universitario San Cecilio, Granada, Spain

Abstract

An incorrect or late diagnosis can lead to an increase in the morbidity and mortality caused by pneumonia, and the availability of a rapid and accurate microbiological test to verify the aetiology is imperative. This study evaluated a molecular test for the identification of the bacterial cause of atypical community-acquired pneumonia (ACAP). Fifty-four children with pneumonia were studied using bacteriological cultures, *Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae* and *Legionella* spp. serology, and *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella* antigens. Simultaneously, the presence of bacterial and fungal DNA was tested for in respiratory secretion samples using the Vircell SL kit, including multiplex PCR and amplicon detection by means of line blots. There were 14 cases of ACAP caused by *M. pneumoniae*, with positive kit results for 13 of them, and two cases of Q-fever, with negative kit results for *Coxiella burnetii*. The test was negative in the remaining 38 cases (one staphylococcal pneumonia, 20 *Streptococcus pneumoniae* pneumonias, and 17 probable viral pneumonias). The sensitivity of the test for the detection of *M. pneumoniae* was 92.8% and the specificity was 100%. The Vircell SL kit allows detection of *M. pneumoniae* DNA in respiratory secretion samples from children with ACAP.

Keywords: *Chlamydomphila pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Legionella* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, pneumonia

Original Submission: 17 April 2008; **Revised Submission:** 16 July 2008; **Accepted:** 25 August 2008

Editor: G. Pappas

Clin Microbiol Infect

Corresponding author and reprint requests: José Gutiérrez, Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Avda de Madrid 11, E-18012 Granada, España
E-mail: josegf@ugr.es

Introduction

Community-acquired pneumonia (CAP) is associated with a high morbidity. Its initial treatment, which is currently empirical, has a decisive influence on the prognosis. The incidence and the clinical relevance of the microorganisms considered to be responsible for the disease, and designated 'atypical' (*Mycoplasma pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Chlamydomphila pneumoniae*, and *Legionella* spp.), are controversial [1–3].

Primary infection with *C. pneumoniae* is frequent in children, increases in frequency with age, and is considered to represent c.10% of all CAPs [4]. The detection of the disease is hampered by the high prevalence of anti-*C. pneumoniae* IgG in adults, repeated asymptomatic infections, and the absence of IgM in some cases of primary infection [5]. The

diagnosis of *M. pneumoniae* infection is similarly problematic: the culture is not reliable [6], there is a high prevalence of anti-*M. pneumoniae* IgG in adults, and IgM can be absent in some primary infection cases [7].

Most cases of *Legionella* pneumonia (85%) are caused by *Legionella pneumophila* [8], which is diagnosed by culture, immunofluorescence, or serology. Culture requires approximately 2 weeks, and false-negative results are frequent. Immunofluorescence on sputum is fast and specific but has low sensitivity [9]. Serological tests have a sensitivity of 80%, but the diagnosis is delayed, and false-positive results are obtained when there is infection with other bacteria [10]. Moreover, seroconversion can be absent in *Legionella* infections diagnosed by other methods [11]. Other shortcomings are that a negative serology result in the acute phase does not rule out infection, that a positive result in two consecutive sera without seroconversion is not a reliable diagnostic criterion, and that the sensitivity is limited if serum is obtained too early in the convalescence phase [12].

Available tests for the detection of *Legionella* antigen in urine have a sensitivity of 60–85%, but mainly reveal

infections with *L. pneumophila* of serogroup 1 [13]. Finally, antigenuria can persist for many months, and must therefore be interpreted with caution, especially in patients with a possible history of infection with this pathogen [12].

Coxiella burnetii causes Q-fever and chronic endocarditis. Rapid diagnosis of infection with this bacterium can markedly reduce its severity [14]. Serological tests are not useful for detecting infection in an early phase, when antibodies cannot be detected, and it is difficult to discriminate between current and past infections, owing to the presence of the corresponding IgG in the healthy population [15].

The emergence of new molecular techniques has considerably enhanced the possibility of accurate diagnosis of CAP [16–18]. Vircell SL (Santa Fe, Granada, Spain) has developed a kit (not yet commercially available) to detect *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, the genus *Legionella* and *L. pneumophila* in respiratory tract samples using PCR and line blot. This study prospectively analysed the diagnostic capacity of this procedure in clinical samples from children with pneumonia and contaminated respiratory secretions. The aim of the study was to test the performance of the kit.

Materials and Methods

Human samples

Between January 2006 and April 2007, we studied 54 children (<1–13 years old; 32 males, 22 females) referred to the San Cecilio University Hospital in Granada on the basis of clinical and radiological suspicion of CAP (characterized by the presence of newly evident infiltrates on chest X-rays with suggestive clinical and analytical data, cough, purulent expectoration (in older patients), fever, pleuritic chest pain and/or leukocytosis). Patients with possible nosocomial pneumonia and immunodepressed patients were excluded. Patients diagnosed with CAP had their complete clinical history recorded, and underwent physical examination, including chest X-rays; basic laboratory tests were performed. Antibiotic treatment was given according to criteria established in consensus documents [19,20]. Age, sex and associated morbidity factors were systematically recorded for all patients, following appropriate clinical, analytical, functional and pathological criteria. Radiological signs were categorized as lobular or multilobular, and the presence of pleural effusion was recorded. In hospitalized patients, studies included blood cultures, Gram staining and culture of sputum (when there was expectoration), culture of pleural liquid (when there was effusion), and a search for antigens of *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella* in urine.

CAP aetiology was attributed to atypical bacteria if the corresponding IgG titres increased four-fold between serological determination in the acute phase and a second determination in the convalescence phase (separated by an average interval of 2 weeks) and if specific IgM or *Legionella* spp. antigen was detected in urine in the acute phase (Binax NOW, Leti, Spain). ELISA (Vircell SL) was used to detect anti-*M. pneumoniae* IgG and IgM, and indirect immunofluorescence (Vircell SL) to detect anti-*Coxiella*, anti-*C. pneumoniae*, anti-*Chlamydomphila psittaci* and anti-*Legionella* IgG and IgM, following the manufacturers' instructions.

Viral pneumonia was suspected when no bacteria responsible for atypical CAP (ACAP) were isolated and no antibodies induced by these bacteria were detected in patients with compatible clinical findings (lymphocytosis and/or monocytosis, C-reactive protein <7 µg/L) who failed to respond to antibiotic treatment in the first 48 h [19,20]. Viral cultures were not performed.

Nasopharyngeal swabs or aspirates of secretions were obtained from all patients for the detection of *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Coxiella burnetii*, *Legionella* genus and *L. pneumophila* DNA by using the Vircell SL kit. Fifty-five throat swabs from asymptomatic adults were also analysed. Samples were taken using a sterile swab, resuspended in transport medium for *Chlamydia* (Vircell SL), and kept at –20°C until DNA extraction.

DNA extraction

The QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen, Turn berry Lane Valencia, CA, USA) was used to extract DNA from all respiratory secretions, and 200-µL samples were processed according to the manufacturer's instructions.

DNA was also extracted from bacterial suspensions of *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Coxiella burnetii* and *Legionella* spp., including *L. pneumophila* (all serotypes), *Legionella dumoffii*, *Legionella longbeachae*, *Legionella jordanis*, *Legionella gormanii*, *Legionella micdadei* and *Legionella bozemanii* (Table 1), all of which may cause ACAP.

Ten serial dilutions of 5 ng of this DNA were used to spike the pharyngeal secretion samples from the 55 asymptomatic individuals. Bacterial suspensions (1.28×10^6 CFU/mL for *Legionella* species and 5.59×10^6 CFU/mL for *M. pneumoniae*) were diluted into 800 µL of Tris (0.2 M)/EDTA (0.1 M) (pH 8). Then, SDS (final concentration 0.5%) and proteinase K (final concentration 0.1 g/L) were added, and the solution was incubated at 37°C for 4 h. Two phenol extraction steps were performed with one volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) and one volume of chloroform/isoamyl alcohol (24 : 1); DNA was precipitated with two volumes of ethanol and 5 M NaCl. DNA concentra-

TABLE 1. Strains used in the assays with the Vircell SL kit

<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ATCC VR-1356
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531
<i>Coxiella burnetii</i>	ATCC VR-616
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 11286
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 11191
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 11231
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 11286
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 11424
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 12006
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 12007
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 12008
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 12009
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 12024
<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	NCTC 12098
<i>L. pneumophila</i> serogroup 2	ATCC 33154
<i>L. pneumophila</i> serogroup 3	ATCC 33155
<i>L. pneumophila</i> serogroup 4	ATCC 33156
<i>L. pneumophila</i> serogroup 5	ATCC 33215
<i>L. pneumophila</i> serogroup 6	ATCC 33216
<i>L. pneumophila</i> serogroup 7	NCTC 11984
<i>L. pneumophila</i> serogroup 8	NCTC 11985
<i>L. pneumophila</i> serogroup 9	NCTC 11986
<i>L. pneumophila</i> serogroup 10	NCTC 12000
<i>L. pneumophila</i> serogroup 11	NCTC 12179
<i>L. pneumophila</i> serogroup 12	NCTC 12180
<i>L. pneumophila</i> serogroup 13	NCTC 12181
<i>L. pneumophila</i> serogroup 14	NCTC 12174
<i>Legionella bozemanii</i>	NCTC 11368
<i>Legionella dumoffii</i>	NCTC 11370
<i>Legionella gormanii</i>	NCTC 11401
<i>Legionella jordanis</i>	NCTC 11533
<i>Legionella longbeachae</i>	NCTC 11477
<i>Legionella micdadei</i>	NCTC 11371
<i>Haemophilus influenzae</i>	Clinical isolate
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSM 13661
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Clinical isolate
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Clinical isolate
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619
<i>Streptococcus epidermidis</i>	Clinical isolate
<i>Streptococcus crista</i>	Clinical isolate
<i>Enterococcus faecalis</i>	Clinical isolate
<i>Acholeplasma oculi</i>	Kindly provided by M. Duran (LCSA, Santa Fe, Granada)
<i>Mycoplasma mycoides</i>	Kindly provided by M. Duran (LCSA, Santa Fe, Granada)
<i>Chlamydomphila pecorum</i>	Kindly provided by M. Duran (LCSA, Santa Fe, Granada)
<i>Chlamydomphila trachomatis</i>	ATCC VR-398B
<i>Chamydomphila psittaci</i>	ATCC VR-125
<i>Bordetella pertussis</i>	ATCC 8467
<i>Bordetella parapertussis</i>	NCTC 5952
<i>Candida albicans</i>	NCPF 3153
<i>Aspergillus fumigatus</i>	ATCC 204305
<i>Escherichia coli</i>	NCTC 50001
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	NCTC 13144
<i>Listeria monocytogenes</i>	NCTC 4885
<i>Neisseria meningitis</i> serogroup A	NCTC 10025
<i>N. meningitis</i> serogroup B	NCTC 10026
<i>N. meningitis</i> serogroup C	NCTC 8554

tion was determined spectrophotometrically at $A_{260\text{ nm}}$, and DNA was considered to be pure at an $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ratio of 1.8–2. Extraction was always performed in a biologically secure laboratory.

This method was also used to extract 50 ng of DNA from different microorganisms in order to verify the specificity of the kit. For this purpose, PCR was performed with DNA from the following pathogens (isolated in our hospital by reference techniques or from culture collections): *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus crista*, *Enterococcus faecalis*, *Acholeplasma oculi*, *Mycoplasma mycoides*, *Chlamydomphila pecorum*, *Chlamydomphila trachomatis*, *C. psittaci*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, and *Neisseria meningitis* serogroups A, B, and C (Table 1).

Vircell SL prototype kit

Multiplex PCR. Five pairs of oligonucleotides (Table 2) were required to detect the agents of interest. A 383-bp fragment of the 16S rRNA gene was amplified to detect the *Legionella* genus, and a 289-bp fragment of *dnaj* to detect *L. pneumophila* [21]. *Coxiella burnetii* was detected by amplifying a 438-bp fragment of the COM-I gene [22]. Finally, for detection of *M. pneumoniae*, a 481-bp fragment of the PI gene was amplified [23], and for detection of *C. pneumoniae*, a 350-bp fragment of the major outer membrane protein gene *ompA* was amplified [24]. After selection of the oligonucleotides, single PCRs were optimized for each microorganism. A pair of oligonucleotides for the amplification of an 817-bp fragment of the human mitochondrial cytochrome oxidase subunit III gene was included in the multiplex PCR as an extraction and amplification control.

TABLE 2. Oligonucleotides used for amplification by PCR and detection by line blot of a specific fragment from the microorganisms included in the test and the internal control

Microorganism	Oligonucleotides for PCR		Oligonucleotides for the generation of specific probes	
	Oligonucleotide name	Sequence	Oligonucleotide name	Sequence
<i>Legionella</i> genus	Lsp-F	5'-AGCATKGTCTAGCTTGCTAG-3'	Lsp-int-F	5'-GGCGAGTGCGCAACGG-3'
	Lsp-R	5'-ACCTCCCCACTGAAAGTG-3'	Lsp-int-R	5'-CAGGCCTTCTTCACACAC-3'
<i>Legionella pneumophila</i>	LPN-F	5'-CAGGTGGTTTTGGCGGATTTG-3'	LPN-int-F	5'-TTTGGTGACGTTTTTGAAG-3'
	LPN-R	5'-TGTTGAATCTGACTTGCC-3'	LPN-int-R	5'-CCTGGCATGTTTTCACAAG-3'
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MPN-F	5'-ACTCGGAGGACAATGGTCAG-3'	MPN-int-F	5'-TGATCTCGCCAACGCTC-3'
	MPN-R	5'-AACCCGGCTTTTCGTTATCC-3'	MPN-int-R	5'-ACCGTCTGCCCGCCATC-3'
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	CPN-F	5'-CACTAATGTCAGGCTTCATTGCC-3'	CPN-int-F	5'-CATTGGGATCGCTTTGATG-3'
	CPN-R	5'-TGTTTACAGAGAATTGCGATACG-3'	CPN-int-R	5'-CAGATCACATTAAGTTCTTC-3'
<i>Coxiella burnetii</i>	CBU-F	5'-CGCAACAAGAAGAACACGCTC-3'	CBU-int-F	5'-CGACCTGCATCACCAC-3'
	CBU-R	5'-CTAATTGGAAGTTATCACGCAG-3'	CBU-int-R	5'-GGATAGCAGGATTATCC-3'
Internal control	IC-F	5'-CCACCAATCACATGCCTATCA-3'	IC-int-F	5'-CCTCTCAGCCCTCCTAATG-3'
	IC-R	5'-TAAATTGGAAGTTAACGGTACTA-3'	IC-int-R	5'-AAATGCCAGTATCAGGCGG-3'

To avoid loss of sensitivity in the multiplex PCR, each sample was simultaneously amplified with two multiplex PCR mixtures. The first contained oligonucleotides for the amplification of *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Coxiella burnetii* at a final concentration in the PCR of 0.5 μM for each pair of oligonucleotides. The second multiplex PCR was optimized for *L. pneumophila*, *Legionella* genus and the human gene (internal control), with final oligonucleotide concentrations of 0.2, 1.2 and 0.25 μM , respectively. PCRs were optimized with respect to the concentration of oligonucleotides, dNTPs and MgCl_2 , and the conditions of the PCR programme. The oligonucleotides were labelled with biotin at the 5'-end to be subsequently detectable by line blot hybridization. Each PCR was performed in a final volume of 25 μL , using 10 μL of sample. Final concentrations of dNTPs and MgCl_2 were 150 μM and 3 mM, respectively; 1 U of Taq polymerase (Bioline, S Main St Randolph, MA, USA) was used per PCR. PCR was carried out in an Eppendorf gradient thermocycler (Eppendorf, Madrid, Spain) under the following conditions: a first denaturation step at 92°C for 2 min, 40 amplification cycles (92°C, 20 s; 55°C, 30 s; 72°C, 30 s), and a final extension step at 72°C for 3 min.

Probe synthesis. For detection of the microorganisms, specific probes were generated by single PCR using the internal oligonucleotide pair of each one of the fragments amplified in the multiple PCRs (Table 2). For these PCRs, the six internal fragments were cloned in a pGEM-T vector (Promega, Seville, Spain). Each clone was used as template DNA for amplification of the corresponding probe. A final volume of 50 μL containing 5 ng of plasmid was used for each PCR. Final concentrations of dNTPs and MgCl_2 were 200 and 3 mM, respectively; 1 U of Taq polymerase (Bioline) was used per PCR. The PCR was carried out in an Eppendorf gradient thermocycler (Eppendorf) under the following conditions: a first denaturation step at 92°C for 1 min, 40 amplification cycles (92°C, 20 s; 55°C, 30 s; 72°C, 30 s), and a final extension step at 72°C for 3 min. The six PCR products were used as probes to draw lines on a nylon membrane.

The probes were denatured with NaCl (1.5 M) and NaOH (1.5 M) for 10 min, neutralized with Tris-HCl (1 M) and NaCl (1.5 M) (pH 7.4), and fixed on the membrane with UV light for 2 min.

Line blot hybridization. PCR-generated amplicons were visualized by line blot hybridization. The line blot was formed by a nylon membrane strip onto which six DNA probes (Table 2) were placed: five probes were DNA fragments specific for each pathogen under study, and the other probe was a fragment specific for the amplified human DNA fragment

(extraction and PCR control). The line blot also included a control line to react with the conjugate that was subsequently used in the colorimetric detection. The seven probes were dosed (0.3 $\mu\text{L}/\text{cm}$) using a Bio-Dot line dispenser, model ZX1000 (Bio-Dot, Irvine, CA, USA).

The strip with biotinylated PCR product was hybridized in a specially designed tray. The two biotinylated PCR products for each sample were each denatured by adding 20 μL of solution (NaOH (0.25 M), NaCl (0.75 M)) to the PCR tube and incubating them for 10 min at room temperature. Then, 1 mL of hybridization solution was added (*N*-lauryl sarcosine (2.4 g/L), SDS (0.02%), 6 \times SSC, salmon sperm DNA (100 mg/L), skimmed milk powder (2%), Tris-HCl (0.2 M), NaCl (0.3 M) (pH 7.4)) and preheated in the hybridization tray with the strip and two denatured PCR products. This mixture was incubated for 1 h at 50°C under agitation (80 r.p.m.) in a hybridization oven. Then, the strip was washed twice for 10 min at 50°C with a stringent wash solution (0.1 \times SSC, SDS (1%)). Finally, colorimetric detection was performed by incubating with 1 mL of conjugate (streptavidin-peroxidase (Caltag, San Francisco, CA, USA)) dissolved (1/4000) in conjugate stabilizer (Vircell SL) for 10 min under agitation (40 r.p.m.). After two washes with washing solution (phosphate-buffered saline at pH 7.2, Tween-20 (0.05%)), the strip was incubated with TMB (Neogen Corp., Lansing, MI, USA) for 5 min to visualize the signal. After washing of the strip with water, results were interpreted using an interpretation card.

Results

In preliminary assays using the Vircell SL kit with a multiplex PCR, a loss of sensitivity was found with a mix of the six pairs of primers. Therefore, the multiplex PCR was optimized by testing different combinations and concentrations of primers and different PCR conditions to avoid this loss of sensitivity. The assay results suggested the preparation of two PCR mixes, one for *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* and *Coxiella burnetii*, and the other for *L. pneumophila*, genus *Legionella* and the internal amplification control, at the concentrations shown in Materials and Methods. With these combinations of oligonucleotides, no loss of sensitivity was detected with respect to the individual PCRs.

Among the 54 children in the study, 14 (26%) had ACAP due to *M. pneumoniae*, based on serology, with two showing IgM in the first serum sample. In the other 12 cases, a second serum sample was required to observe seroconversion of IgM and IgG, delaying the diagnosis. A further two children (3.7%) had Q-fever, based on serology, one (1.9%) had

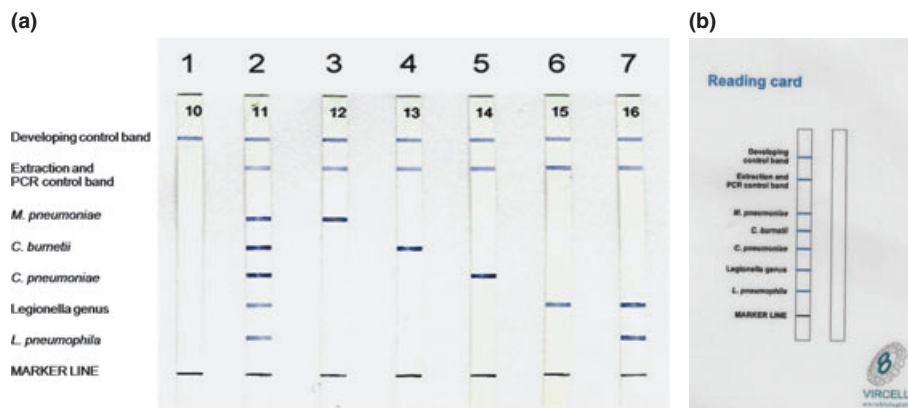


FIG. 1. Hybridization results for samples positive for each microorganism of interest in the following order: 1, negative PCR control; 2, positive PCR control; 3, *Mycoplasma pneumoniae*; 4, *Coxiella burnetii*; 5, *Chlamydomphila pneumoniae*; 6, *Legionella* sp.; 7, *Legionella pneumophila*. (b) Reading card for the interpretation of results.

S. aureus pneumonia and 20 (37%) had *Streptococcus pneumoniae* pneumonia, based on culture and/or on antigen testing, and viral CAP was suspected in the remaining 17 patients (31%). Vircell SL kit results were interpreted using the reading card designed for the test (Fig. 1b).

Patient samples

For both children with Q-fever, the Vircell SL test result was negative for *Coxiella burnetii*, and for all of those with ACAP due to *M. pneumoniae*, except one, the Vircell SL test results were positive. The test result was negative in the remaining cases (one *S. aureus* pneumonia, 20 *Streptococcus pneumoniae* pneumonias and 17 viral CAPs). No positive results were obtained for *C. pneumoniae* and *Legionella* spp. using the Vircell SL kit. Globally, therefore, the kit yielded 13 (24%) positive results for *M. pneumoniae* in this population of children with CAP. Line blots were clearly visible and easily interpreted using the reading card. The absence of PCR inhibitors was verified in all cases, as an intense signal was obtained for the DNA extraction and PCR control in all samples. Finally, the test sensitivity for the detection of *M. pneumoniae* was 92.8% and the specificity was 100%.

DNA was also extracted from serum from the two patients who were positive for *Coxiella burnetii* by serology; Vircell SL test results were negative for *Coxiella burnetii* in both cases.

Samples from asymptomatic individuals

Test specificity was assessed by performing the Vircell SL test with the 55 respiratory tract samples from asymptomatic individuals. None of these samples yielded a positive signal.

Analytical sensitivity studies were performed with artificial samples generated with serially diluted purified DNA of the

microorganisms to be detected. A specific hybridization was obtained for each, with no signal observed in the remaining lines. A single intense signal was seen in the reaction, extraction and PCR controls (Fig. 1a). The limit of detection was established by performing PCRs on replicas of dilutions in triplicate, with this limit being considered to be the lowest level at which all three dilutions gave a positive result. The limit of detection was 5 pg of DNA for *C. pneumoniae*, *Coxiella burnetii* and the genus *Legionella*, and 0.5 pg for *L. pneumophila* and *M. pneumoniae*. Because we selected highly conserved regions of the *mip* gene among different *L. pneumophila* serogroups and of the 16S rRNA gene in the genus *Legionella*, no differences in sensitivity were observed among the species.

The reproducibility of the test was evaluated by using three different serial dilutions of each microorganism in intra-assay and inter-assay experiments carried out by two examiners. Identical dilution limits were obtained in these experiments. The technique took 3.5 h to complete: 1.5 h for the PCR, and 2 h for the line blot development. With the primer combinations selected for the multiplex PCRs, their reproducibility was the same as found for the individual PCRs.

Other specificity studies

The absence of cross-reactions was assessed by performing the test with 50 ng of DNA of each of the 23 microorganisms described above. No false-positive results were obtained.

Discussion

This study evaluated a multiplex molecular test to determine the bacterial cause of ACAP in 54 children (14 due to *M. pneumoniae*, two cases of Q-fever, one staphylococcal

pneumonia, 20 *Streptococcus pneumoniae* pneumonias, and 17 probable viral pneumonias). The test identified 13 cases of ACAP due to *M. pneumoniae*, and was negative in the remaining 41 cases.

Among earlier molecular biology approaches, DNA hybridization techniques with labelled probes and polymorphism analyses of restriction fragments were used to detect DNA of atypical respiratory tract bacteria [25]. However, techniques based on nucleic acid amplification should offer faster and improved pathogen detection, allowing earlier diagnosis and treatment. Over the past few years, numerous PCR tests have been optimized for the detection of different pathogens implicated in pneumonia, e.g. *C. pneumoniae* [26], *M. pneumoniae* [27], *Coxiella burnetii* [22], *L. pneumophila*, and the genus *Legionella* [21]. In the design of these PCRs, authors used primers for specific genes of the bacteria of interest, to avoid false-positive results. These are commonly designed for genes of membrane-specific antigens, e.g. the PI gene for *M. pneumoniae* [23,24] or the *mip* gene for *L. pneumophila* [9]. Ribosomal RNA genes or intergenic spacers are also considered as PCR targets, mostly for the design of genus-specific primers [21].

Although there are numerous single PCR systems for microorganism detection, multiplex PCR protocols are less common, despite the savings that they offer in time and cost. Multiplex PCR systems are available that include some of the microorganisms investigated in the present study, e.g. *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* [28], *C. pneumoniae*, *C. psittaci* and *M. pneumoniae* [29], *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and *L. pneumophila* [30], and *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae* and genus *Legionella* [24]. Others include *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae* with *Streptococcus pneumoniae* and *H. influenzae* [23]. In these systems, results are sometimes interpreted by using agarose gels or ELISA. The test evaluated in this article offers a direct visual reading, adding to its value in the clinical setting.

The proposed test showed excellent performance in the detection of ACAP caused by *M. pneumoniae*. In one patient with positive serology for *M. pneumoniae*, no signal was obtained with the Vircell SL kit, and no PCR inhibitors were detected in this sample. This false-negative result can be attributed to a more advanced phase of the disease. In this case, seroconversion was not accompanied by the presence of bacterial DNA in the respiratory tract sample. This factor should be taken into account in the clinical interpretation of results.

Serology gave positive results for *Coxiella burnetii* in the two samples studied, but a negative result was obtained with the Vircell SL kit in both respiratory tract samples. In general, *Coxiella burnetii* has been detected by PCR with DNA

extracts of serum samples [22,31]. Therefore, PCR was also performed with serum samples that were positive for *Coxiella burnetii* by indirect immunofluorescence, yielding negative results in both cases. False-negative results are frequently reported in the detection of *Coxiella burnetii* using PCR with serum samples. Thus, Zhang *et al.* [22] obtained 14.8% false-negative results in a nested PCR with specific plasmids of *Coxiella burnetii* in serum samples, and Fenollar *et al.* [32] obtained only 64% sensitivity with sera of patients with endocarditis or vascular infection.

Fournier and Raoult [31] found the sensitivity to be low (26%) in samples collected during the first 2 weeks after onset of the disease, when antibodies could not yet be detected. The sensitivity was even lower (5%) in samples drawn after the first 2 weeks, when antibodies could be detected [30]. Low PCR sensitivity with serum samples is due to the scant amount of DNA present, limiting the detection of *Coxiella burnetii* by PCR.

Our serological study suggests that the two samples positive for *Coxiella burnetii* were from patients who had contracted the disease more than 2 weeks earlier, when DNA detection in serum has the lowest diagnostic value [31]. A larger number of *Coxiella burnetii*-positive serum samples are required to assess the validity of the technique. Nevertheless, it is possible that this test is not effective in Q-fever patients, who are often asymptomatic and are only diagnosed using serology. In these cases, it is possible that a higher diagnostic accuracy could be obtained at the onset of the disease by analysing peripheral blood or lower respiratory tract samples.

We believe that this new PCR kit offers a clear advantage over serological techniques for the diagnosis of ACAP caused by *M. pneumoniae*, cases in which there are frequent losses of the second serum sample, especially when there is clinical improvement, meaning that the causal agent often remains unknown. So, in adults, owing to the high seroprevalence of IgG [33], re-infection with any of the microorganisms produces elevated titres of IgG in the first sample, preventing demonstration of seroconversion. By contrast, direct diagnosis using the Vircell SL kit allows immediate and specific detection of the pathogen in the acute phase of the disease in a single sample.

In conclusion, a highly reproducible technique has been optimized. The multiplex PCR test, in conjunction with a line blot used in the Vircell SL kit, has high sensitivity for the detection of *M. pneumoniae* in upper respiratory tract secretions from patients with ACAP. There were no false-positive results when respiratory samples from asymptomatic individuals were analysed, and no cross-reactions were detected for the microorganisms studied.

Transparency Declaration

This study was supported by grants from the Department of Innovation, Science and Business of the Regional Government of Andalusia and from the CDTI (Spanish Centre for Industrial Technological Development) for Laboratory Vircell SL, Granada, Spain. Three of the authors hold posts in the company that manufactures the kit (Vircell SL): J. A. Carrillo Ávila (Head of Molecular Biology Department), J. Rojas González (Research and Development Director), and A. Rojas González (Managing Director). The other five authors are independent researchers at the University of Granada and San Cecilio University Hospital, Granada, Spain, and do not have a conflict of interest.

References

- Fernández R, Suárez I, Rubinos G, Medina A, Gullón JA, González I. Neumonía adquirida en la comunidad por gérmenes atípicos: tratamiento y evolución. *Arch Bronconeumol* 2006; 42: 430–433.
- Saldias PF, Pérez CC. National consensus for management of community acquired pneumonia in adults. *Rev Chilena Infectol* 2005; 22 (suppl 1): 7–10.
- Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K et al. The pneumoplex assay, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* (*Chlamydophila*) *pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei* and *Bordetella pertussis*, and its real-time counterpart. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 565–571.
- Messmer TO, Skelton SK, Moroney JF, Daugharty H, Fields BS. Application of a nested, multiplex PCR to psittacosis outbreaks. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2043–2046.
- Dowell SF, Peeling RW, Boman J et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the centers for disease control and prevention (USA) and the laboratory centre for disease control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001; 33: 492–503.
- Jonas D, Bosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1247–1252.
- Uldum SA, Jensen JS, Sondergard-Andersen J, Lind K. Enzyme immunoassay for detection of immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1198–1204.
- Munder RU. Other *Legionella* species. In: Mdell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*, 5th edn, Vol. 2. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone, 2000; 2435–2441.
- Hayden RT, Uhl JR, Qian X et al. Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of Lightcycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence, antigen detection and culture. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2618–2626.
- Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 506–526.
- Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am J Med* 2001; 110: 41–48.
- Rodríguez JC, Masiá M, Gutiérrez F, Royo G. *Legionella pneumophila* en la neumonía adquirida en la comunidad: interpretación de las pruebas microbiológicas. *Med Clin (Barc)* 2004; 112: 277–278.
- Dominguez J, Gali N, Matas L et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic assay for the detection of *Legionella* antigen in urine samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 896–898.
- Raoult F, Urvolgyi J, Etienne J, Roturier M, Puel J, Chaudet H. Diagnosis of endocarditis in acute Q-fever by immunofluorescence serology. *Acta Virol* 1988; 32: 70–74.
- Dupuis G, Péter O, Peacock M, Burgdorfer W, Haller E. Immunoglobulin responses in acute Q fever. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 484–487.
- Diederer BM, de Jong CM, Marmouk F, Kluytmans JA, Peeters MF, Van der Zee A. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol* 2007; 1: 94–101.
- Gouriet F, Drancourt M, Raoult D. Multiplexed serology in atypical bacterial pneumonia. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1078: 530–540.
- Stralin K, Korsgaard J, Olcen P. Evaluation of a multiplex PCR for bacterial pathogens applied to bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J* 2006; 28: 568–575.
- Del Castillo Martin F, García Miguel MJ, García S. Manejo racional de la neumonía aguda de la comunidad. *An Esp Pediatr* 1999; 51: 609–616.
- Brines Solanes J, Hernández Marco R. Neumonías agudas en la infancia. In: Cruz Hernández M, ed. *Tratado de pediatría*, 9th edn, Vol. 2. Madrid: Ergón, 2006; 1323–1339.
- Liu H, Li Y, Huang W, Kawamura Y, Ezaki T. Use of the *dnaj* gene for the detection and identification of all *Legionella pneumophila* serogroups and description of the primers used to detect 16S rDNA gene sequences of major members of the genus *Legionella*. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 859–869.
- Zhang GQ, Nguyen SV, To H et al. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 77–80.
- Stralin K, Backman A, Holmberg H, Fredlund H, Olcen P. Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* to be used on sputum samples. *APMIS* 2005; 113: 99–111.
- Ginevra C, Barranger C, Ros A et al. Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. *J Clin Microb* 2005; 43: 3247–3254.
- Meijer TO, Kwakkel GJ, de Vries A, Schouls LM, Ossewaarde JM. Species identification of *Chlamydia* isolates by analyzing restriction fragment length polymorphism of the 16S–23S rRNA spacer region. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1179–1183.
- 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.
- Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4366–4371.
- Corsaro D, Valassina M, Venditti D, Venard V, Le Faou A, Valensin PE. Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 105–108.
- Tong CYW, Donnelly C, Harvey G, Sillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J Clin Pathol* 1999; 52: 257–263.
- Pinar A, Bozdemir N, Kocagoz T, Alacam R. Rapid detection of bacterial atypical pneumonia agents by multiplex PCR. *Cent Eur J Public Health* 2004; 12: 3–5.

31. Fournier PE, Raoult D. Comparison of PCR and serology assays for early diagnosis of acute Q fever. *J Clin Microb* 2003; 41: 5094–5098.
32. Fenollar F, Fournier PE, Raoult D. Molecular detection of *Coxiella burnetii* in the sera of patients with Q fever endocarditis or vascular infection. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4919–4924.
33. Petitjean-Lecherbonnier J, Vabret A, Gouarin S, Dina J, Legrand L, Freymuth F. *Mycoplasma pneumoniae* infections: retrospective study in Basse-Normandie, 1997–2005. Epidemiology—diagnostic utility of serology and PCR for a rapid diagnostic. *Pathol Biol* 2006; 54: 603–611.