

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 261**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2016 PCT/EP2016/056190**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16150930**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2016 E 16714304 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 3274716**

54 Título: **Procedimiento y péptidos para la detección de Chlamidia suis**

30 Prioridad:

24.03.2015 EP 15160478

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.12.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)
Sint-Pietersnieuwstraat 25
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

VANROMPAY, DAISY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 734 261 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y péptidos para la detección de *Chlamidia suis*.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar y diagnosticar infecciones por *Clamidia suis* en un sujeto, y un kit de diagnóstico para ello.

Antecedentes de la invención

Las especies *Chlamydiaceae* son agentes patógenos bien conocidos, y causan una amplia variedad de síntomas tanto en animales como en humanos (Longbottom y Coulter 2003). Al lado del potencial zoonótico bien documentado de *Chlamydia (C). abortus* y *C. psittaci*, sólo recientemente, pocos estudios informan sobre el aislamiento de cepas *C. suis* de ojos humanos (Dean *et al.*, 2013b; De Puyseleir *et al.*, 2014a). La fuente de una infección zoonótica de *C. suis* es el cerdo, el único anfitrión animal para esta bacteria. Aunque se considera que *C. suis* es la especie clamidial más frecuente, los cerdos también pueden llegar a ser infectados por *C. pecorum*, *C. abortus* y *C. psittaci* (Schautteet y Vanrompay 2011b). Las infecciones clamidiales en porcino no siempre están asociadas con los síntomas, pero si es así, conducen a importantes pérdidas económicas debidas a artritis, pericarditis, poliserositis, neumonía, conjuntivitis, enteritis, diarrea y fracaso reproductivo (Zahn *et al.*, 1995; Andersen y Rogers 1998; Eggemann *et al.*, 2000). Las infecciones diagnosticadas se tratan comúnmente con antibióticos de tetraciclina, sin embargo, están surgiendo más y más cepas de *C. suis* resistentes a la tetraciclina (Andersen y Rogers 1998; Schautteet *et al.*, 2010; Di Francesco *et al.*, 2011; Borel *et al.*, 2012; Schautteet *et al.*, 2013). La transferencia *in vitro* de los genes resistentes a los antibióticos entre las especies clamidiales es mostrada por Suchland *et al.*, (Suchland *et al.*, 2009). Estos hallazgos plantean otro punto de preocupación asociado con el posible carácter zoonótico de *C. suis*. La co-infección de un individuo humano con una *C. suis* resistente a la tetraciclina (Tc^R) y el patógeno humano *C. trachomatis* estrechamente relacionado, crea el entorno ideal para la transferencia del gen de resistencia y la aparición de una cepa Tc^R de *C. trachomatis*. Para evitar la creación de cepas multirresistentes, se requiere un conocimiento exhaustivo sobre la epidemiología y la biología de la infección por *C. suis*. Se hicieron esfuerzos recientes para desarrollar ensayos moleculares específicos de *C. suis* (de Puyseleir *et al.*, 2014b; Lis *et al.*, 2014) y aplicar estos análisis para investigar la presencia de *C. suis* en una población humana de riesgo (de Puyseleir *et al.*, 2014a). Sin embargo, la detección de bacterias viables de *C. suis* en muestras animales o humanas no proporciona ninguna información sobre la presencia de una infección existente de este microbio. Los ensayos serológicos para detectar la presencia de anticuerpos anti-*C. suis* son capaces realmente de demostrar la presencia de una respuesta inmunológica y, por ello, de una infección. Desafortunadamente, en la actualidad, no se dispone de ningún ensayo para el serodiagnóstico específico de *C. suis*.

Se publican numerosos ensayos serológicos que tienen como objetivo antígenos clamidiales o anticuerpos anti-clamidiales (Sachse *et al.*, 2009). Los ensayos basados en la detección de anticuerpos dirigidos contra la superficie expuesta de lipopolisacáridos (LPS) (Wittenbrink *et al.*, 1991) o el neoglicoconjugado sintético que contiene el trisacárido de alfaKdo(2→4)alfaKdo(2→4)alfaKdo (Kdo, ácido 3-desoxi-D-manno-oct-2-ulopiranosónico) que representa una estructura de lipopolisacárido (LPS) (Brade *et al.*, 2000) y contra las proteínas o péptidos de longitud completa de la principal proteína de la membrana externa (MOMP) (Vanrompay *et al.*, 2004; Medac, Wedel, Alemania), proteínas polimórficas de la membrana externa (PMPS) (Longbottom *et al.*, 2001; Longbottom *et al.*, 2002) o de la totalidad de las preparaciones del cuerpo elemental (EB) (Di Francesco *et al.*, 2006; De Clercq *et al.*, 2014), se desarrollaron con diversos grados de éxito en términos de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en algunos casos, la reactividad cruzada entre las especies de *Chlamydia* puede dificultar la interpretación de los resultados (Donati *et al.*, 2009). Hoelzle *et al.*, demostraron la idoneidad de las proteínas MOMP recombinantes de longitud completa de *C. suis*, *C. abortus* y *C. pecorum* en ensayos ELISA para identificar las especies clamidiales infectantes (Hoelzle *et al.*, 2004). Sin embargo, hasta ahora, este enfoque no se ha verificado más en animales en el terreno. Además, un fragmento de proteína recombinante del Pmp90 se usó con éxito para el diagnóstico serológico de infecciones por *C. abortus* (Longbottom *et al.*, 2001). Las Pmp son consideradas como importantes factores de virulencia y varios estudios demostraron la inducción de respuestas inmune (Grimwood y Stephens 1999; Niessner *et al.*, 2003; Wehr *et al.*, 2004) e incluso inmunidad protectora (Cevenini *et al.*, 1991). Tan *et al.*, (2009) demostraron que las Pmp provocan varias respuestas serológicas en pacientes infectados con *C. trachomatis*. Sin embargo, se observaron diferencias en las resistencias y especificidades de la reactividad de anticuerpos específicos de subtipo de Pmp relacionada con el género y el resultado clínico. Esto indica que la familia del gen Pmp forma la base de un mecanismo de variación antigénica. La proteína PmpD de *C. abortus* fue reconocida como un antígeno importante utilizando sueros de ovejas infectadas experimentalmente. Además, también la proteína MOMP y la proteína de reclutamiento de actina translocalizada (Tarp) fueron identificadas como proteínas reactivas en este estudio (Marques *et al.*, 2010; Forsbach-Birk *et al.*, 2013). WO2014146663 divulga polipéptidos de unidades repetitivas de fragmentos inmunogénicos de regiones expuestas en la superficie de proteínas de membrana exterior de *Chlamydia* sp. y vacunas que comprenden estas proteínas de fusión. La proteína Tarp se reconoce también predominantemente por los anticuerpos de los seres humanos infectados con *C. trachomatis* (Wang *et al.*, 2009).

5 Detección específica de anticuerpos anti-*C. suis* pueden proporcionar la evidencia de una infección existente en cerdos y en seres humanos, un factor esencial en el estudio de la transferencia zoonótica de este microbio. Desafortunadamente, hasta la fecha, no se dispone de un ensayo específico sensible de *C. suis* para serodiagnóstico animal o humano y, hasta hoy, no se han publicado estudios para identificar los principales antígenos reactivos de *C. suis*. De hecho, los estudios de seroprevalencia en cerdos se basan en la detección de anticuerpos contra LPS, MOMP y la totalidad de preparaciones de EB y aparecen reacciones cruzadas serológicas con anticuerpos contra otras especies clamidiales u otros patógenos (Schautteet y Vanrompay 2011).

Así, todavía existe en la actualidad una necesidad de péptidos antigénicos que sean útiles en la detección o diagnóstico de *Chlamydia suis* en un sujeto.

10 Sumario de la invención

La presente invención abarca un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de anticuerpos de *Chlamydia suis* en un sujeto, que comprende:

- proporcionar una muestra biológica del sujeto, y
- analizar en la muestra la presencia de anticuerpos contra un péptido de 8 a 30 aminoácidos de longitud, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o una secuencia que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1; y/o contra un péptido de 8 a 30 aminoácidos de longitud, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 (SQSSIAS) o una secuencia que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 2.

20 En una forma de realización de dicho procedimiento, la presencia de anticuerpos contra uno o ambos péptidos es indicativa de una infección pasada, temprana o tardía de *Chlamydia suis* en el sujeto.

En otra forma de realización, la muestra biológica del sujeto es un fluido corporal, preferiblemente una secreción mucosa o sangre, en particular suero.

En otra forma de realización, los anticuerpos detectados son del tipo IgA, IgM y/o IgG.

En otra forma de realización, el sujeto es un mamífero, en particular un cerdo.

25 En otra forma de realización, la presencia de anticuerpos se detecta mediante el uso de un inmunoensayo, en particular un ensayo de inmunofluorescencia (IF), radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA o ELISA), ensayo de inmunotransferencia marcado con enzima (LIA, inmunotransferencia, mancha de transferencia, y ensayo de inmunotransferencia recombinante), o luminiscencia (bioluminiscencia y quimioluminiscencia).

En otra forma de realización, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

30 La invención proporciona además un péptido aislado de 8 a 30 aminoácidos de longitud, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o por SEQ ID NO: 2 (SQSSIAS), o una secuencia al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO 2.

En una forma de realización, dicho péptido es un péptido antigénico.

35 En otra forma de realización, el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

La presente invención también proporciona un kit para su uso en el diagnóstico de una infección por *Chlamydia suis*, que comprende uno o ambos de los péptidos anteriores, donde dicho péptido o péptidos son inmovilizados en un soporte sólido.

En una forma de realización, dicho kit es un inmunoensayo, en particular un ELISA.

40 En otra forma de realización, dicho kit es un ensayo DIVA.

La invención proporciona además el uso de dicho kit o de uno o más de los péptidos anteriores en el procedimiento *in vitro* divulgado en el presente documento para detectar la presencia de anticuerpos de *Chlamydia suis* en un sujeto.

45 La invención también divulga el uso de dicho procedimiento, uno o más de los péptidos o el kit proporcionado en el presente documento, para diferenciar un sujeto vacunado de un sujeto infectado de forma natural, así como un procedimiento de preparar dicho péptido o kit.

Descripción de la invención

50 Como se utiliza en el presente documento, las formas en singular "un", "una", y "el" incluyen los referentes singular y plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los términos "comprendiendo", "comprende" y "comprendido por" como se utilizan en el presente documento son sinónimos de "incluyendo", "incluye" o

"conteniendo", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen miembros adicionales, no citados, elementos o etapas de procedimiento. El término "aproximadamente" tal como se utiliza en el presente documento cuando hace referencia a un valor medible como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similar, está destinado a abarcar variaciones de +/-20% o menos, preferiblemente de +/-10% o menos, más preferiblemente de +/-5% o menos, de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas para realizar en la invención divulgada. Se debe entender que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" es él mismo, también, específica y preferiblemente, divulgado. Aunque los términos "uno o más" o "al menos uno", como uno o más o al menos un miembro de un grupo de miembros, es claro *per se*, por medio de una ejemplificación adicional, el término abarca, entre otros, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o a dos cualquiera o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera >3, >4, >5, >6 o >7, etc. de dichos miembros, y hasta todos dichos miembros. A menos que se determine lo contrario, todos los términos utilizados en la divulgación de la invención, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que entiende normalmente un experto corriente en la técnica a la que pertenece esta invención. Por medio de información adicional, se incluyen definiciones de los términos para apreciar mejor las enseñanzas de la presente invención.

La presente invención se refiere a un péptido aislado de 8 a 30 aminoácidos de longitud, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o por SEQ ID NO: 2 (SQQSSIAS), o una secuencia al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, a un kit que comprende dichos péptidos y a un procedimiento que utilice dichos péptidos para diagnosticar o detectar la infección por *Chlamydia suis* en un sujeto. El procedimiento se basa en la detección de anticuerpos que reconocen específicamente dichos péptidos inmunorreactivos derivados de la proteína principal de la membrana externa (MOMP) y/o de la proteína C polimórfica de membrana (PmpC) de *Chlamydia suis*.

La detección de anticuerpos en las infecciones clamidiales en animales tiene múltiples finalidades, es decir, la confirmación de la enfermedad clínica o la confirmación de la presencia o ausencia de infección, los resultados de investigaciones epidemiológicas para estimar la prevalencia de la infección, o la determinación del estado inmunitario después de la vacunación.

Dado que *C. suis* y *C. trachomatis* están estrechamente relacionadas filogenéticamente y la disponibilidad de la información de secuencia de *C. suis* es bastante limitada, la selección de un antígeno específico es bastante compleja. Por lo tanto, la presente divulgación se centró en la identificación de los antígenos de péptidos de ocho aminoácidos para minimizar las reacciones cruzadas con otros patógenos. El análisis *in silico* de la fosfoproteína de reclutamiento de la actina translocalizada (Tarp) de la *C. suis* y la proteína polimórfica de la membrana (Pmp) se basaba en las secuencias de dos cepas, y el análisis *in vitro* se ejecutó con sueros de otras 3 cepas. La metodología analiza péptidos que son antígenos representativos de todas las cepas de *C. suis* utilizadas y condujeron a la selección de tres péptidos (un Tarp, un PmpC y un MOMP) para ensayos adicionales utilizando sueros de control positivos y negativos generados experimentalmente. Por primera vez se demostró en la presente divulgación que los antígenos de péptidos MOMP y PmpC identificados son particularmente útiles en el serodiagnóstico de *C. suis*, particularmente en porcino.

Por ello, la presente invención se refiere a epítomos derivados de la MOMP y de la PmpC de *C. suis* que son reconocidos específicamente por los anticuerpos, por lo que dichos epítomos consisten en una secuencia de aminoácidos idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o SEQ ID NO: 2 (SQQSSIAS).

En otra forma de realización, la invención se refiere a un péptido, en particular un péptido reactivo inmunitario, que comprende los epítomos de la presente invención. Como se utiliza en el presente documento "péptidos reactivos inmunitarios" o "antígenos de péptidos" se refieren a (poli)péptidos de 8 a 30 aminoácidos de longitud, en particular de 8 a 25 aminoácidos, más en particular de 8 a 20, e incluso más particular de 8 a 15 aminoácidos de longitud, incluyendo todos los números enteros entre ambos. Los péptidos reactivos inmunitarios tal como se divulgan en el presente documento se pueden utilizar individualmente o combinados. En una forma de realización preferida, la presente invención abarca un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos divulgada en las SEQ ID NO: 1 o 2, y el uso de los mismos. Los péptidos de la invención pueden utilizarse solos o, preferiblemente, en combinación.

La persona experta comprenderá que, dentro de la secuencia de aminoácidos definida en el presente documento, la sustitución y/o supresión de uno o posiblemente más de los aminoácidos se puede hacer sin excesiva disminución en reactividad y/o especificidad. Estas variantes, que son funcionalmente equivalentes a los presentes epítomos pero contienen ciertos residuos de aminoácidos que pueden ser no naturales, modificados y/o sintéticos, están dentro del alcance de la presente invención, si son reconocidos por los anticuerpos específicos para *C. suis*. La persona experta sería consciente de que puede determinarse la capacidad de unión de anticuerpos de los análogos de epítomo que contienen, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos individuales, utilizando una técnica de escaneado adecuada. En una forma de realización, los péptidos pueden modificarse con el fin de facilitar la conjugación con un portador. Por ejemplo, puede ser deseable para algunos procedimientos de conjugación química incluir una cisteína terminal.

Una secuencia "sustancialmente idéntica" (denominada opcionalmente "variante") es una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de referencia solo por una o más sustituciones conservadoras, como se comenta en el

- presente documento, o por una o más sustituciones no conservadoras, eliminaciones o inserciones situadas en las posiciones de la secuencia que no destruyen la función biológica de la molécula de aminoácidos. Tal secuencia puede ser cualquier número entero de 75% a 99%, o más generalmente al menos 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, o 95%, o tanto como 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico al nivel de aminoácido o nucleótido con la
- 5 secuencia utilizada para la comparación utilizando, por ejemplo, FASTA. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación puede ser de al menos 5, 10 o 15 aminoácidos, y hasta 20, 25, 30 o 40 aminoácidos (incluidos todos los números enteros entre ellos). La identidad de secuencia se puede medir fácilmente utilizando software de análisis de secuencia disponible para el público (por ejemplo, software BLAST disponible a través de la National Library of Medicine).
- 10 Alternativamente, las variantes pueden identificarse modificando una de las anteriores secuencias de epítomos y evaluando las propiedades antigénicas, la estructura secundaria y/o la naturaleza hidropática del péptido modificado utilizando, por ejemplo, los procedimientos representativos descritos en el presente documento. Una "sustitución conservadora" es aquella en la que un aminoácido es sustituido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que una persona experta en la técnica esperaría que la naturaleza del péptido esté sustancialmente sin
- 15 cambios. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. En una forma de realización específica, una secuencia sustancialmente idéntica se deriva o aísla de una cepa de *Chlamydia suis*.
- 20 Determinar la presencia de anticuerpos contra los péptidos o epítomos derivados de la MOMP y/o de la pmpC de la presente invención es indicativo de la infección por *C. suis*. Más específico, la presencia de dichos anticuerpos en un sujeto puede ser indicativa de una infección pasada (por lo que la infección está curada), temprana o tardía. Además, la detección de anticuerpos contra el péptido o péptidos de la presente invención puede ser útil en la diferenciación serológica entre anticuerpos inducidos por vacuna y anticuerpos contra la cepa de campo ("DIVA" significa Diferenciación entre animales infectados y vacunados), si los antígenos de la vacuna difieren específicamente de los
- 25 péptidos de la presente invención. Un ensayo de marcadores de este tipo puede detectar anticuerpos contra las proteínas o péptidos que están ausentes en la vacuna. En esencia, los animales infectados de forma natural pueden ser detectados en una población vacunada.
- En una forma de realización específica, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de anticuerpos de *Chlamydia suis* en un sujeto, que comprende:
- 30 – proporcionar una muestra biológica del sujeto, y
– analizar en la muestra la presencia de anticuerpos contra un péptido de 8 a 30 aminoácidos de longitud, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o una secuencia que sea al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1; y/o contra un péptido de 8 a 30 aminoácidos de longitud, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 (SQQSSIAS) o una
- 35 secuencia que sea al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 2. En una forma de realización específica, los anticuerpos que se detectarán son del tipo IgA, IgM y/o IgG. Como tal, la detección cualitativa y cuantitativa de anticuerpos en la muestra biológica dirigida contra *Chlamydia suis* es posible y se recomienda para apoyar en el diagnóstico y/o diferenciación de infecciones pasadas (IgM/IgG), agudas, recientes (IgM) y/o crónicas (IgG).
- 40 En particular, se demuestra en el presente documento que determinar la presencia de anticuerpos contra los péptidos de la invención permite un diagnóstico específico de infección por *C. suis*. Hasta hoy, no se dispone de ninguna ensayo diagnóstica para la infección por *C. suis*.
- El término "sujeto" se refiere a los seres humanos u otros mamíferos, en particular cerdos o puercos, incluidos cerdas, jabalíes y lechones.
- 45 La expresión "muestra biológica" como se utiliza en el presente documento se refiere a una muestra que puede ser extraída, no tratada, tratada, aislada, y concentrada de un sujeto. Adecuadamente, la muestra biológica se selecciona de cualquier parte del cuerpo del sujeto, pero particularmente se prefiere que la muestra biológica sea un fluido corporal, preferiblemente sangre o secreciones mucosas, como un hisopo de mucosa o un lavado de mucosa. Las superficies mucosas del cuerpo son barreras delgadas y permeables con el interior del cuerpo debido a sus actividades fisiológicas en el intercambio gaseoso (pulmones), la absorción de alimentos (intestino), las actividades sensoriales (ojos, nariz, boca y garganta), y la reproducción (útero y vagina). En particular, la muestra biológica es
- 50 suero del sujeto a diagnosticar.
- El término "diagnosticar" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a los procedimientos por los cuales una persona experta puede estimar e incluso determinar si, o no, un sujeto ha experimentado o está experimentando una determinada enfermedad, trastorno o afección. La persona experta hace el diagnóstico en función de uno o más
- 55 indicadores diagnósticos, a saber, los anticuerpos, la cantidad (incluida la presencia o ausencia) de los cuales es indicador de la presencia, gravedad, o ausencia de la afección. Además, los péptidos de la presente invención son especialmente útiles para desarrollar un ensayo fiable que pueda diferenciar entre sujetos infectados y sujetos vacunados (ensayo DIVA) en caso de que los antígenos de la vacuna difieran (sustancialmente) de los péptidos divulgados en el presente documento.

El término "determinar" o "analizar" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a evaluar la presencia, ausencia, número, nivel o cantidad de los anticuerpos respectivos dentro de la muestra derivada del sujeto, incluidos los niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de dichas sustancias.

5 En el procedimiento que se divulga en el presente documento, detectar, determinar o analizar de la presencia de anticuerpos en la muestra incluye unir anticuerpos con el antígeno del péptido o epítipo tal como se divulga en el presente documento, y luego detectar el acontecimiento de unión o la presencia del anticuerpo aislado de la muestra biológica. Cualquier procedimiento conocido se puede utilizar para la detección de anticuerpos de unión a péptido en una muestra tal como fluidos corporales. Los procedimientos considerados son, a modo de ejemplo no limitativo, 10 cromatografía, espectrometría de masas (y combinaciones de los mismos), ensayos enzimáticos, electroforesis y ensayos basados en anticuerpos, tales como pero sin limitarse a EIA (ensayos inmunoenzimáticos), RIA (radioinmunoensayo), inmunotransferencia, ELISA (ensayo por inmovilización ligada a enzimas), CLIA (inmunoensayo quimioluminiscente), CEDIA (inmunoensayo de donantes de enzimas clonadas), CMIA (inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscentes), MEIA (inmunoensayo enzimático de micropartículas), FPIA (inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada), GLORIA (inmunoensayo rápido, de lectura óptica y marcado con oro), análisis de micromatrices, inmunoensayos totalmente automatizados o robóticos y ensayos de 15 aglutinación de látex.

El contacto con la muestra biológica con el péptido en condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente que permita la formación de complejos inmunológicos, es generalmente una cuestión de añadir la composición a la muestra e incubar la mezcla durante un período de tiempo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunitarios con el péptido presentado. Dicha mezcla de anticuerpos de los péptidos puede ser detectada por medios y procedimientos conocidos. Es decir, la detección de la formación de complejos inmunitarios de anticuerpo de péptido puede lograrse mediante la aplicación de numerosos enfoques. Estos procedimientos se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marcador, como cualquiera de los indicadores o marcadores radioactivos, fluorescentes, biológicos o enzimáticos de uso estándar en la técnica. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales a través del uso de un ligando de unión secundario, como un segundo anticuerpo o una disposición de unión a ligando de biotina/avidina (estreptavidina) como se conoce en la técnica.

Como ejemplo típico, el procedimiento de detección comprende una o más de las siguientes etapas. En una primera etapa, la muestra biológica se pone en contacto y se incuba con un reactivo de captura (o cobertura) inmovilizado, es decir, el péptido o péptidos de la invención. La inmovilización se logra, convencionalmente, insolubilizando el reactivo de captura, ya sea antes del procedimiento de ensayo, como por adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua o acoplamiento no covalente o covalente (por ejemplo, utilizando reticulación con glutaraldehído o carbodiimida, con o sin activación previa del soporte con, por ejemplo, ácido nítrico y un agente reductor, o posteriormente, por ejemplo, por inmunoprecipitación).

30 La fase sólida utilizada para la inmovilización puede ser cualquier soporte o portador inerte que sea esencialmente insoluble en agua y útil en ensayos inmunométricos, incluidos soportes en forma de, por ejemplo, superficies, partículas, matrices porosas, etc. Ejemplos de soportes comúnmente utilizados incluyen hojas pequeñas, Sephadex, poli(cloruro de vinilo), perlas de plástico, y placas de ensayo o tubos de ensayo fabricados de polietileno, polipropileno, poliestireno, y similares, que incluyen placas de microtitulación de 96 o 384 pocillos, así como materiales en partículas tales como papel de filtro, agarosa, dextrano reticulado, y otros polisacáridos. Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua como los carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos se emplean adecuadamente para la inmovilización de los reactivos de captura. En una forma de realización el péptido (o péptidos) inmovilizado se recubre sobre una placa de microtitulación, y en particular la fase sólida preferida utilizada es una placa de microtitulación de múltiples pocillos que se puede utilizar para analizar varias muestras a la vez, por ejemplo, una placa ELISA de microensayos de 96 o 384 pocillos. 45

La fase sólida se recubre con el reactivo de captura tal como se ha definido anteriormente, que puede estar ligado mediante una interacción no covalente o covalente o enlace físico, según se desee. En dicha aplicación, los péptidos pueden contener un grupo acetilo N-terminal y están unidos en el C terminal a pines de polietileno a través de la incorporación de una cisteína extra. Si es covalente, la placa u otra fase sólida es incubada con un agente de reticulación junto con el reactivo de captura en condiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, durante 1 hora a temperatura ambiente. Los agentes de reticulación comúnmente utilizados para unir el reactivo de captura con el sustrato de fase sólida incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, imidoésteres homobifuncionales y maleimidias bifuncionales. Agentes derivados como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio]propioimidato producen intermedios fotoactivables capaces de formar entrecruzamientos en presencia de luz. 50 55

Las placas recubiertas se tratan después típicamente con un agente bloqueante que se une no específicamente a los sitios de unión y los satura para evitar la unión no deseada del ligando libre con los sitios sobrantes en los pocillos de la placa. Ejemplos de agentes de bloqueo apropiados para este fin incluyen, por ejemplo, gelatina, seroalbúmina bovina, albúmina de huevo, caseína y leche descremada. El tratamiento de bloqueo se lleva a cabo generalmente en condiciones de temperatura ambiente durante aproximadamente 1-4 horas, preferiblemente de aproximadamente 1 a 3 horas, o durante la noche. Después de cubrir y bloquear, la muestra biológica a analizar, 60

adecuadamente diluida, se añade a la fase inmovilizada. Normalmente, la concentración final del reactivo de captura se determinará empíricamente para maximizar la sensibilidad del ensayo en el intervalo de interés. Las condiciones para la incubación de la muestra y el reactivo de captura inmovilizado se seleccionan para maximizar la sensibilidad del ensayo y minimizar la disociación. Preferiblemente, la incubación se realiza a temperaturas bastante constantes, que varían desde aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C, preferiblemente de aproximadamente 20 a 37 °C. El tiempo de incubación depende principalmente de la temperatura, no siendo en general superior a aproximadamente 10 horas para evitar un ensayo con falta de sensibilidad. Preferiblemente, el tiempo de incubación es de aproximadamente 0,5 a 3 horas, y más preferiblemente 1,5-3 horas para maximizar la unión.

En esta etapa, el pH de la mezcla de incubación estará normalmente en el intervalo de aproximadamente 4-9,5, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 6-9, más preferiblemente de aproximadamente 7-8, y lo más preferiblemente el pH del diluyente del ensayo (ELISA) es pH 7,4. El pH del tampón de incubación se escoge para mantener un nivel significativo de unión específica. Se pueden emplear varios tampones que permitan la unión específica de un anticuerpo a un epítipo y generalmente incluyen sistemas tampón acuoso o soluciones acuosas a pH y fuerza iónica fisiológicos. Tales tampones son, a modo de ejemplo no limitante, tampón de carbonato, solución salina tamponada de fosfato, sistemas tampón de fosfato sódico, tampón Tris/HCl, tampón de glicina o tampón de acetato. El pH del tampón debe variar entre 5 y 10. Las concentraciones de sal se definen entre 0 y 250 mmol/l utilizando cloruro sódico o una sal equivalente. Los tampones pueden completarse con altas concentraciones de sal de hasta 1 M para evitar interacciones no deseadas. El tampón particular empleado no es crítico para la invención, pero en los ensayos individuales puede preferirse un tampón sobre otros.

En una etapa más, que es opcional, la muestra biológica se separa (preferiblemente por lavado) del reactivo de captura inmovilizado para eliminar las moléculas no capturadas. La solución utilizada para el lavado es generalmente un tampón ("tampón de lavado") con un pH determinado utilizando las consideraciones y tampones descritos anteriormente para la etapa de incubación, con un intervalo de pH preferible de aproximadamente 6-9. El lavado se puede hacer tres o más veces. La temperatura de lavado varía generalmente desde la de frigorífico hasta temperaturas moderadas, con una temperatura constante mantenida durante el período de ensayo, típicamente de aproximadamente 0-40 °C, más preferiblemente de aproximadamente 4-30 °C. Por ejemplo, el tampón de lavado se puede colocar en hielo a 4 °C en un depósito antes del lavado, y se puede utilizar un lavavajillas para esta etapa.

En una siguiente etapa, el reactivo de captura inmovilizado se pone en contacto con anticuerpos detectables, preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 20-40 °C, más preferiblemente de aproximadamente 20-37 °C, con la temperatura y el tiempo exactos para contactar dependiendo los dos principalmente de los medios de detección empleados. Por ejemplo, cuando se utilizan estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'-tetrametil-benzidina como medio para la detección, por ejemplo, en una forma de realización, el contacto se lleva a cabo (por ejemplo, aproximadamente 1 hora o más) para amplificar la señal al máximo. Este anticuerpo es detectable directa o indirectamente. El anticuerpo detectable puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. También el anticuerpo detectable puede ser directamente detectable, y en una forma de realización tiene una etiqueta colorimétrica, y en otra forma de realización tiene una etiqueta fluorométrica. Más preferiblemente, el anticuerpo detectable es biotinilado y el medio de detección es avidina o estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'-tetrametil benzidina. La lectura de los medios de detección puede ser fluorométrica o colorimétrica.

En una última etapa del procedimiento, el nivel de anticuerpo que está ahora ligado al reactivo de captura se mide utilizando un medio de detección para el anticuerpo detectable.

En un ejemplo, los péptidos tal como se divulgan en el presente documento se depositan en un portador o fase sólida y se exponen a sangre, suero, plasma u otro fluido corporal que contenga anticuerpos, tal como secreciones mucosas o frotis. En consecuencia, las composiciones así preparadas pueden ser empleadas para identificar y/o caracterizar una respuesta antigénica de un sujeto frente a péptidos específicos, y opcionalmente evaluar el tipo de respuesta, por ejemplo, la identificación de infección aguda, primaria reciente, tardía, persistente o crónica, así como la eficacia de la terapia, etc.

La cobertura directa a través de la adsorción pasiva a la superficie de poliestireno de las microplacas en condiciones alcalinas es menos eficiente para los antígenos de péptidos en comparación con las proteínas de longitud completa. Sin embargo, varias soluciones técnicas, como la síntesis de conjugados péptidos-dextrano (Bocher *et al.*, 1997), el uso de un sistema de péptidos estreptavidina-biotinilada (Ivanov *et al.*, 1992), péptidos ligados al plástico de los pines de polietileno o el uso de un anticuerpo de captura (ELISA sándwich), se han desarrollado para resolver estas dificultades de cobertura. Como ya se ha mencionado, los ensayos diagnósticos contemplados en el presente documento pueden basarse en numerosas formas bien conocidas de detección, incluidas ELISA (fase basada en placas o sólida; sándwich o no sándwich), pinELISA, ELISA competitivo, anticuerpos anti-idiotípicos, ensayo de anticuerpos de fluorescencia directa (DFA), etc., en la que todas las reacciones colorimétricas y fotométricas conocidas (p. ej., fluorescencia, luminiscencia, etc.) o radiométricas se consideran adecuadas para su uso.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una composición, kit o kit de diagnóstico que comprende uno o ambos de los péptidos divulgados en el presente documento, en donde dichos péptidos son inmovilizados en un soporte sólido. Preferiblemente, el kit comprende instrucciones sobre cómo usar el kit. En la forma de realización preferida dicho kit de ensayo es un ELISA.

Típicamente, el kit comprenderá uno o ambos de los péptidos divulgados en el presente documento, opcionalmente en combinación con otros péptidos o proteínas, en contenedor o contenedores apropiados, ligados a un soporte sólido, como por ejemplo una placa de microtitulación, una membrana, perlas, palillos de inmersión o similares. Alternativamente, el soporte puede ser proporcionado como un elemento separado del kit.

5 Opcionalmente, el kit según la presente invención incluye además al lado del péptido o péptidos divulgados en el presente documento, un agente de detección para anticuerpos que pueden ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, etc. Si es necesario, el kit comprende además el sustrato y otros medios para permitir la reacción con una enzima utilizada como etiqueta para el agente de detección, que puede ser un anticuerpo. El agente de detección del kit puede incluir una etiqueta detectable que está asociada o ligada al agente de detección dado, en particular, el anticuerpo de detección. También se contemplan etiquetas detectables que están asociadas o unidas a un ligando secundario de unión. Las etiquetas detectables incluyen tintes, moléculas luminiscentes o fluorescentes, biotina, radioetiquetas o enzimas. Ejemplos típicos de etiquetas adecuadas incluyen moléculas fluorescentes normalmente conocidas, como rodamina, fluoresceína, proteína fluorescente verde o luciferasa, o fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante como ejemplos de enzimas adecuadas.

10 Opcionalmente, el kit comprende además controles positivos y negativos para verificar los resultados obtenidos al usar el kit. Los componentes del kit se pueden envasar en medio acuoso o en forma liofilizada y, además, el kit puede comprender uno o más contenedores que permiten realizar la detección. Además, el kit de ensayo comprende instrucciones para el uso del kit.

15 En otra forma de realización, la presente invención se refiere a el uso del péptido o péptidos o del kit divulgado en el presente documento en un procedimiento *in vitro* para diagnosticar o detectar la infección por *C. suis*. Los péptidos se pueden utilizar solos o combinados, y la combinación puede ser de un uso simultáneo, separado o secuencial en un procedimiento como el descrito en el presente documento.

20 La invención también se refiere a un procedimiento para preparar el péptido o péptidos divulgados en el presente documento. El péptido de la invención se puede elaborar utilizando técnicas estándares de química sintética, como mediante el uso de un equipo de síntesis automatizado. En la alternativa, el péptido se puede elaborar a partir de un polipéptido más largo, que el polipéptido comprende típicamente la secuencia del péptido. El péptido puede derivarse del polipéptido, por ejemplo, hidrolizando el polipéptido, como mediante el uso de una proteasa; o rompiendo físicamente el polipéptido. El péptido también se puede elaborar en un procedimiento que comprende la expresión de un polinucleótido. El polipéptido expresado puede procesarse posteriormente para producir el péptido de la invención. Así, el péptido puede elaborarse en un procedimiento que comprende el cultivo de una célula transformada o transfectada con un vector de expresión en condiciones que proporcionen la expresión del péptido o un polipéptido del que se puede elaborar el péptido.

25 Los siguientes ejemplos se exponen a continuación para ilustrar los procedimientos, las composiciones y los resultados según el objeto divulgado. Estos ejemplos no pretenden incluir todos los aspectos del objeto divulgado en el presente documento, sino que más bien ilustran procedimientos, composiciones y resultados representativos.

Ejemplos

Este estudio fue financiado por el Federal Public Service of Health, Safety of the Food Chain and Environment.

1. Material y procedimientos

Cepas bacterianas

40 Las siguientes cepas se utilizaron para la producción de sueros experimentales en lechones de 4 semanas de edad: cepas S45, R19 y H7 de *C. suis*; *C. abortus* (S26/3); *C. psittaci* (98AV2129); *C. pecorum* (1710S). Las bacterias se cultivaron en células McCoy tratadas con cicloheximida según la metodología estándar. *Chlamydiae* fueron liberadas de las monocapas infectadas por congelación y descongelación antes de tratamiento de ultrasonificación (Bransonic 12, BIOMEDevice, San Pablo, CA, EE.UU.). La cosecha de cultivo celular se centrifugó durante 10 min (1.000×g, 4 °C) y *Chlamydiae* se concentraron posteriormente por ultracentrifugación durante 45 minutos (50.000×g, 4 °C). Las bacterias se volvieron a suspender en 2 ml de tampón de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG, sacarosa 218 mM, KH₂PO₄ 38 mM, K₂HPO₄ 7 mM, ácido L-glutámico 5 mM) y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

Sueros de cerdo

50 Los sueros utilizados se derivan de cerdos no infectados, infectados de forma natural y cerdos infectados/inmunizados de forma experimental. Para la infección experimental de cerdos SPF de cuatro semanas de edad, se utilizaron 10⁶ bacterias para infectar lechones mediante aerosoles, la vía oral e intravaginal. Dos cerdos fueron infectados con la cepa S45 de referencia de *C. suis*. Además, un cerdo fue infectado por cada una de las cepas H7 y R19 de *C. suis*, la cepa S26/3 de *C. abortus* y la cepa 98AV2129 de *C. psittaci*. Los cerdos fueron sometidos a eutanasia cuatro semanas después de la infección.

Para la inmunización de lechones SPF de cuatro semanas de edad, 10^6 bacterias (de la cepa S26/3 de *C. abortus* o 1710S de *C. pecorum*) se mezclaron con volúmenes iguales de adyuvante completo de Freund (CFA; Sigma, Diegem, Bélgica) e inyectados por vía subcutánea. Dos semanas después, se repitió la inmunización para aumentar la producción de anticuerpos utilizando el adyuvante incompleto de Freund (Sigma, Diegem, Bélgica). Los cerdos fueron sometidos a eutanasia tres semanas después de la inmunización de refuerzo y se recogieron muestras de sangre. Los sueros de control negativos utilizados se obtuvieron a partir de lechones SPF de cuatro semanas de edad. Se tomaron muestras de cerdos infectados de forma natural en un matadero belga de cerdos. Se recogieron sangre e hisopos rectales de 83 animales, procedentes de 8 granjas diferentes. No se disponía de información relativa al estado de salud ni al tratamiento antibiótico de los cerdos muestreados. Los hisopos se almacenaron en tampón de estabilización de ADN/ARN (Roche, Bruselas, Bélgica) a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análisis por PCR. La extracción de ADN se realizó utilizando el mini kit de extracción total de ADN de G-spin (Goffin Molecular Biotechnologies, Beek, Holanda) según las instrucciones del fabricante. El extracto de ADN resultante se analizó utilizando la PCR en tiempo real específica de *C. suis* (de Puyssleyley *et al.*, 2014b), para confirmar la presencia de *C. suis* en los cerdos muestreados. Además, como sueros de control negativos se utilizaron un conjunto de 10 sueros procedentes de lechones de SPF de 4 semanas de edad.

Todas las muestras de sangre fueron incubadas durante la noche a temperatura ambiente. Los sueros se recogieron, se inactivaron por calor durante 30 minutos a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se trataron con caolín para reducir la lectura de fondo (Novak *et al.*, 1993). Se añadieron cuatro volúmenes de una suspensión de caolín (25% (p/v) en PBS; pH 7,4) a un volumen de suero y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Las muestras fueron centrifugadas ($5.500\times g$ durante 10 min) y el sobrenadante se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se probaron todos los sueros para detectar la presencia de anticuerpos anti-MOMP en un ELISA directo utilizando MOMP recombinante de *C. trachomatis* (ELISA MOMP_r CT) como antígeno (Schautteet *et al.*, 2011). El ensayo permite la detección de anticuerpos MOMP específicos de la familia, ya que el epítipo específico de la familia se encuentra en la región conservada de MOMP (Stephens *et al.*, 1998). El valor de corte positivo se calculó como la media de los valores de DO de los sueros de cerdos de control negativos, mas dos veces la desviación estándar.

Identificación de las secuencias de la Pmp en el genoma de MD56 de *C. suis*

Las secuencias putativas de Pmp de *C. suis* se extrajeron del genoma MD56 utilizando modelos ocultos de Márkov (HMM). Estos HMM fueron construidos usando un conjunto de semillas de secuencias, consistentes en Pmp manualmente curadas de 7 genomas secuenciados *C. psittaci* (Ca10, 6BC, RD1, 01DC11, 02DC15, 08DC60 y C1998). Los alineamientos Clustal individuales se ejecutan de forma independiente en cada familia Pmp dentro del conjunto de semillas y se revisaron manualmente para concluir que no era necesario recortar. La herramienta hmmbuild del paquete HMMER (Finn *et al.*, 2011) se utilizó para generar un modelo separado para cada familia de pmp. Se revisaron los resultados y se dividieron las secuencias en sub-semillas para permitir la generación de modelos específicos de sub-familias. Todos los HMM fueron validados, utilizando de nuevo el paquete HMMER (hmmsearch), contra un conjunto más grande de secuencias de *C. psittaci* y *C. caviae*.

Selección de los péptidos

Pmp C

Para determinar la proteína Pmp que es el mejor candidato para suministrar antígenos específicos de *C. suis*, las secuencias de aminoácidos de las nueve proteínas Pmp MD56 de *C. suis* se compararon con las secuencias de las cepas de referencia A/har-13 y L2/434/BU (*C. trachomatis*). El programa Omega de Clustal se utilizó para construir múltiples alineamientos de secuencias, utilizando parámetros por defecto (Thompson *et al.*, 1997). Se seleccionaron nueve regiones (Tabla 1) como moldes para la producción de 152 péptidos sintéticos, que fueron elaborados por Pepscan Systems (Lelystad, Países Bajos). Los péptidos tenían una longitud de ocho residuos de aminoácidos, con un solapamiento de seis residuos. Todos los péptidos contenían un grupo acetilo N-terminal y se unieron a un C terminal con pines de polietileno a través de la incorporación de una cisteína extra a una cantidad de $100\text{ }\mu\text{g}$ por pin. Los pines recubiertos con péptido se ensamblaron en un portador de polietileno en un 'formato de 96 pocillos'. Esto permite el uso de los pines para un ensayo ELISA en una microplaca de 96 pocillos (conocida como 'pinELISA').

MOMP y Tarp

La identificación de las regiones específicas de *C. suis* utilizando alineamientos de secuencias de aminoácidos se combinó con una predicción de epítipo de las secuencias identificadas, para la selección de un péptido específico e inmunogénico. Los alineamientos se construyeron con el programa Omega de Clustal utilizando parámetros por defecto (Thompson *et al.*, 1997). Las cepas utilizadas para crear los alineamientos de MOMP y Tarp se enumeran en la Tabla 2.

La predicción del epítipo de células B de las regiones identificadas específicas de *C. suis* se realizó mediante herramientas proporcionadas por el recurso de análisis de la Base de datos de Epítipos Inmunitarios (recurso de análisis IEDB). Este proveedor ofrece una colección de seis herramientas para la predicción de epítipos lineales a partir de secuencias de proteínas (Chou y Fasman Beta-Turn (Chou y Fasman 1978), Emini surface Accessibility (Emini *et al.*, 1985), Karplus and Schulz Flexibility (Karplus y Schulz, 1985), Kolaskar and Tongaonkar Antigenicity

(Kolaskar y Tongaonkar, 1990), Parker Hydrophilicity (Parker *et al.*, 1986) y Bepipred Linear Epitope prediction (Larsen *et al.*, 2006)).

PinELISA

Sueros experimentales

5 Los pines fueron bloqueados con tampón de bloqueo (PBS* 0,01 M [Na₂HPO₄ 7,5 mM, NaCl 145 mM, NaH₂PO₄·2 H₂O 3,25 mM; pH = 7,2] complementado con 0,1% Tween 20 y 5% BSA) durante 3 horas, a temperatura ambiente (RT) y 100 rpm. Posteriormente, los pines se lavaron tres veces (tampón de lavado [PBS* 0,01 M, 0,1% Tween 20], 10 min, 100 rpm). Los sueros se diluyeron en el tampón de dilución (0,01 M PBS*, 3% BSA, 0,1% Tween 20) y se incubaron durante la noche a 4 °C y 100 rpm. Después de otra etapa de lavado, los pines se incubaron en una dilución de 1.000 veces de anticuerpo de IgG (H+L) anti-porcino conjugado de HRP policlonal (Bethyl Laboratories, Montgomery, EE.UU.) durante 1 hora a temperatura ambiente y 100 rpm. Después de una etapa de lavado final, la densidad óptica (DO) a 405 nm se midió tras la adición de peróxido de hidrógeno y sustrato de ABTS (KPL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). La separación de los anticuerpos unidos después de la medición permitió reutilizar los péptidos pines. Por lo tanto, los pines se sometieron a sonicación (70 °C, 40 kHz) durante 1 hora en solución tampón de interrupción (Na₂HPO₄·2 H₂O 0,1 M, SDS 35 mM, 0,1% de 2-mercapto-etanol; pH 7,2) seguido por 30 minutos de sonicación en agua ultra pura. Los péptidos pines se almacenaron a -20 °C.

Para su uso en el pinELISA, los sueros experimentales se diluyeron a la concentración mínima necesaria para exceder el valor de corte positivo en el ELISA MOMPr CT. Así, todos los sueros experimentales se utilizaron aproximadamente a la misma concentración de anticuerpos anti-clamidiales, para reducir los resultados falso positivo debido a la lectura de fondo.

Interpretación de los datos

25 Todos los datos obtenidos con sueros experimentales se corrigieron en cuanto a la señal de fondo utilizando los valores del suero de control negativo. Con el fin de encontrar un antígeno específico e inmunogénico de *C. suis*, los péptidos se seleccionaron con altos valores de DO para los sueros experimentales anti-*C. suis* y bajos valores de DO para los sueros de los animales infectados/inmunizados con *C. abortus*, *C. psittaci* o *C. pecorum*.

Sueros de campo

30 El protocolo pinELISA fue ligeramente alterado para probar el conjunto de "sueros de campo", obtenido mediante la toma de muestras sobre lechones SPF y cerdos a sacrificio (matadero). La etapa de bloqueo se amplió a una incubación durante la noche, y los sueros fueron incubados durante 1 hora a 37 °C en lugar de a 4 °C durante la noche. Todos los sueros de campo se ensayaron en dos diluciones: 1/100 y 1/500. El valor de corte positivo se calculó como la media de los valores de DO de los sueros de los cerdos de control negativo, más dos veces la desviación estándar y resultó que era 0,5.

2. Resultados

Selección *in silico* de péptidos específicos de *C. suis*

35 Pmp

Las nueve secuencias de Pmp MD56 de *C. suis* se compararon con las de las cepas *C. trachomatis* A/HAR-13 y L2/434/Bu para investigar secuencias específicas de *C. suis*. La homología de la secuencia global varió entre 70 y 80%, a excepción de la PmpC, con una similitud de 58%. La menor homología de las secuencias se debió en parte a la presencia de insertos específicos de *C. suis*. Además, un gen de codificación PmpC estaba ausente en los genomas de referencia *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum*. Por lo tanto, el PmpC fue considerado el mejor candidato de la Pmp para la selección de un antígeno específico. Los alineamientos de secuencia de aminoácidos se utilizaron para la investigación de las secuencias de *C. suis* con la divergencia más alta en comparación con *C. trachomatis*. Nueve 'regiones específicas de *C. suis*' fueron ordenadas solapando péptidos pines (ocho aminoácidos de longitud con un solapamiento de seis aminoácidos) para posteriores ensayos de especificidad *in vitro* (Tabla 1). El péptido derivado de la PmpC es valioso para el serodiagnóstico en cerdos, así como en seres humanos negativos para *C. trachomatis*.

ES 2 734 261 T3

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos y ubicación de las nueve regiones seleccionadas 'específicas de *C. suis*'.

La proteína PmpC de la cepa MD56 contiene 2.141 aminoácidos.

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO	Posición en la secuencia de proteínas
SFSNISEEIQEPSSTPEQEENEETDEDSSLDSRNTETPPSPSSETQEDD	3	67-117
QPQNNAIALRSFLYSLQTET	4	147-167
GAILGESTVITITGVDLTLFSKNAVKVTFVDKSETQNPSSGGSGTGDSSDSEAEAGSSGSSND SANNSSGGDSNGVSAQAQAFAFRFLSASTSTDPQPGEAENTDSTLNVKLGCGGGIYSK	5	267-387
PTDQEQGSQGTQDSQEGSPGSTGSQESATNSASSQSSIASARLTQLSL	6	447-497
GGGSSSPTSPQSPTTEVIKPVVGRGGAVYT	7	587-617
GNGQDQEQPGAEGGASEEDSNADSGQEVTV	8	905-935
VRSSSEDRAQEAGSDSTPSS	9	995-1.015
EGDSESAEAS	10	1.115-1.125
AIGLVAGAIPADNNSVTATVSDSGTPSTTP	11	1.278-1.308

MOMP

- 5 De forma similar al enfoque utilizado para la PmpC, se buscaron secuencias de aminoácidos para las regiones específicas de *C. suis*, utilizando alineamientos. La similitud de la secuencia MOMP en parejas entre las cepas *C. suis* consideradas (Tabla 2) varió de 76% a 100%. Como era de esperar, *C. suis* se encuentra entre todas las especies relacionadas principalmente con *C. trachomatis*, con porcentajes de homología observados que varían entre 64 y 86%. La similitud de la secuencia global para las cinco especies clamidiales consideradas varió de 59 a 85%.

10 El alineamiento de múltiples secuencias permitió la selección de una región de 52 aminoácidos (residuo 247 a 299) que se conserva entre las cepas consideradas de *C. suis* y contiene una alta concentración de residuos de aminoácidos específicos de *C. suis*. En la predicción de epitopo *in silico* permitió la identificación de un péptido MOMP de ocho residuos (GTKDASID; SEQ ID NO: 1) que contiene 3 aminoácidos específicos de *C. suis* (subrayados), capaces de discriminar *C. suis* de la especie *Chlamydia* que aparecen en los cerdos. Sin embargo, era inviable seleccionar un antígeno péptido MOMP para distinguir *C. trachomatis* de todas las secuencias disponibles de *C. suis*. Por lo tanto, el péptido MOMP sólo es valioso para el serodiagnóstico en cerdos. Así como los péptidos PmpC, este péptido MOMP fue adquirido de Pepscan (Lelystad, Países Bajos) en un formato pinELISA para posteriores ensayos de especificidad *in vitro*.

- 20 Tabla 2: Descripción general de las cepas clamidiales utilizadas para construir el alineamiento de la secuencia de aminoácidos para identificar las regiones específicas de *C. suis* en la proteína MOMP y Tarp.

MOMP		
Especie	Cepa	Fuente
<i>C. suis</i>	H7, R16, R1, R33, H5, R19, S45, datos no publicados R24, 130 Rogers, R27, R22, R28	
<i>C. psittaci</i>	6BC	Genbank: Q46203.1
<i>C. pecorum</i>	E58	GenBank: ACH42158.1
<i>C. abortus</i>	S26/3	Genbank: YP_219480.1
<i>C. trachomatis</i>	A/HAR-13 y 434/Bu	Genbank: AAX50959.1 y YP_007851996.1
Tarp		
Especie	Cepa	Fuente
<i>C. suis</i>	S45	datos no publicados

<i>C. psittaci</i>	6BC	Genbank: WP_006342845.1
<i>C. pecorum</i>	MC Marsbar	Genbank: AEF01186
<i>C. abortus</i>	S26/3	Genbank:WP_011096873.1
<i>C. trachomatis</i>	A/HAR-13 y 434/Bu	Genbank: AAX50730.1 y Q6GX35.1

Tarp

5 El alineamiento de todas las 158 secuencias Tarp disponibles de *C. trachomatis* muestra una alta conservación de la secuencia, con identidades de secuencia en pares que varían entre 91 y 100%. Al comparar el Tarp S45 de *C. suis* y *C. trachomatis*, un promedio del 60% de la secuencia es idéntica. La secuencia Tarp de *C. pecorum*, *C. psittaci* y *C. abortus* mostró una similitud de secuencia promedio del 33% con *C. suis* y *C. trachomatis*. Los resultados de los alineamientos de la secuencia de proteínas, combinados con la predicción de epítomos, permitieron la selección de los ocho péptidos de aminoácidos con la secuencia 'GSSTPTAS' (SEQ ID NO: 12; residuos de aminoácidos 417 a 424 de la proteína de 842 residuos).

10 Selección *in vitro* de un péptido PmpC

Optimización de la dilución de sueros experimentales

La dilución óptima de los sueros experimentales para su uso en el pinELISA, se determinó mediante el análisis de una serie de dilución de dos veces en el ELISA MOMPr CT. Las diluciones óptimas obtenidas variaron de 1/3.5 a 1/896. Los resultados más detallados se representan en la Tabla 3.

15 *ELISA de péptido PmpC con sueros experimentales*

Los 152 péptidos PmpC fueron examinados en busca de sensibilidad y especificidad para *C. suis* con los sueros experimentales. Un péptido, con la secuencia SQQSSIAS (SEQ ID NO: 2), se seleccionó basado en los valores máximos de DO para antisueros de *C. suis* y valores mínimos de DO para antisueros de *C. abortus*, *C. psittaci* y *C. pecorum*.

20 Tabla 3. La dilución óptima de los sueros experimentales en función de los resultados del ELISA MOMPr de *C. trachomatis*.

Especie	Cepa	Título
<i>C. suis</i> [#]	S45_1	1/224
	S45_2	1/112
	H7	1/3.5
	R19	1/7
<i>C. abortus</i> [#]	S26/3_1	1/100
<i>C. abortus</i> [*]	S26/3_2	1/896
<i>C. pecorum</i> [*]	1710S	1/448
<i>C. psittaci</i> [#]	98AV2129	1/857

*: sueros obtenidos después de la inmunización de los cerdos; #: sueros obtenidos después de la infección

Ensayos de especificidad de péptidos MOMP y Tarp con sueros experimentales

25 Ambos péptidos no mostraron reacción cruzada con anticuerpos *C. abortus*, *C. pecorum* y *C. psittaci*. Además, todos los antisueros *C. suis* reaccionaron claramente con MOMP con valores de DO superiores al corte (0,5). Sin embargo, para el péptido Tarp, los valores de DO de los antisueros S45_1 y R19 de *C. suis* no alcanzaron el corte. Por lo tanto, el péptido Tarp ya no se consideró como un candidato de antígeno inmunogénico y se eliminó para otros experimentos.

30 Validación de los antígenos de péptidos MOMP y PmpC

Caracterización molecular de sueros de campo

Los sueros de campo, muestreados en el matadero, se caracterizaron molecularmente, utilizando dos ensayos. La presencia de bacterias *C. suis* en los cerdos muestreados se detectó mediante el examen de hisopos rectales

utilizando la PCR en tiempo real específica de *C. suis*. El ADN bacteriano se detectó en 69 de 83 hisopos. Además, para detectar anticuerpos anti-clamidia, todos los sueros se analizaron con una dilución de 1/100 utilizando el ELISA MOMPr CT. Sesenta y ocho de 83 muestras de suero fueron positivas. Según estos resultados, el conjunto de muestras de campo procedentes del matadero se dividió en tres grupos: el grupo A consistía en 64 sueros procedentes de cerdos que eran positivos tanto en la PCR en tiempo real como en ELISA MOMPr CT, el grupo B contenía 9 sueros y se subdividió en grupos B1 y B2. Los cuatro sueros del grupo B1 fueron muestreados a partir de cerdos negativos en la PCR y mostraron una respuesta clara en el ELISA MOMPr CT. Los cinco sueros del grupo B2, muestreados a partir de cerdos positivos en la PCR, no mostraron respuesta en el ELISA MOMPr CT. El grupo C comprende 10 sueros negativos en ambos ensayos.

10 *PinELISA*

Los sueros de los grupos A, B y C se utilizaron para validar el comportamiento de los péptidos seleccionados para su uso en la detección de anticuerpos anti-*C. suis*. Un grupo adicional (D) que contenía sueros de 10 animales SPF, sirvió como un grupo extra de control negativo. Todas las muestras de campo se ensayaron a diluciones 1/100 y 1/500. Sin embargo, la mayoría de los valores de DO de las diluciones a 100 veces alcanzaron el límite superior de detección de la tecnología utilizada, posiblemente debido en parte a la lectura de fondo. Por lo tanto, las muestras de campo se ensayaron en una dilución de 500 veces en experimentos posteriores. El valor de corte se calculó en 0,5.

Todos los sueros de los grupos C y D de control negativo fueron negativos en los ELISA de los péptidos MOMP y PmpC. En 50 de 64 sueros del grupo A de control positivo, se mostraron anticuerpos tanto para el péptido PmpC como para el MOMP. Doce sueros contenían anticuerpos de péptidos anti-PmpC, pero no anticuerpos de péptido anti-MOMP. Los dos sueros restantes no mostraron respuesta para ambos antígenos candidatos. Todos los sueros del grupo B1 mostraron una respuesta clara al péptido MOMP y PmpC. De hecho, esto apunta a una infección previa ya que los anticuerpos estuvieron presentes, pero no se pudo mostrar ninguna bacteria. Para tres (de cinco) sueros del grupo B2, sólo se mostraron anticuerpos anti-PmpC. Los dos (de cinco) sueros restantes no mostraron respuesta a ambos péptidos candidatos. Esta observación podría atribuirse a resultados falsos positivos del ELISA MOMPr CT. Después de todo, la reacción cruzada con otros patógenos es normal cuando se utilizan proteínas de longitud completa como antígenos (Schautteet y Vanrompay 2011). Dado que el ELISA MOMPr CT es un ensayo específico de la familia, se detectan también los anticuerpos producidos en respuesta a infecciones con otras especies clamidiales. De hecho, las infecciones mixtas de las especies clamidiales aparecen regularmente en los cerdos (Szeredi *et al.*, 1996; Hoelzle *et al.*, 2000).

30 La Tabla 4 resume los resultados obtenidos de los sueros de campo.

Tabla 4. Resultados de la PCR en tiempo real de *C. suis*, ELISA MOMPr CT y POMP C de *C. suis* y ELISA del péptido MOMP en 83 sueros de campo.

Grupo	Número de sueros	Positivo en PCR en tiempo real en <i>C. suis</i>	Positivo en ELISA MOMPr de CT	Positivo en ELISA de péptido MOMP	Positivo en ELISA de péptido de <i>C. suis</i> PmpC
A	64	64	64	50 [0,77; 0,33]	62 [0,96; 0,34]
B1	4	0	4	4 [0,67; 0,08]	4 [1,16; 0,33]
B2	5	5	0	0	3 [0,67; 0,15]
C	10	0	0	0	0
D	10	NP	0	0	0

35 NP: no realizado; Los valores de las DO medias y desviaciones estándar asociadas se representan respectivamente entre corchetes.

Conclusión

El análisis de los sueros experimentales y de los sueros de campo caracterizados molecularmente demostró la idoneidad de los antígenos de péptido MOMP y Pmpc para su uso en el serodiagnóstico de *C. suis* en porcino. Además, el péptido PmpC apareció más sensible en comparación con el fragmento MOMP.

40

REFERENCIAS

- Andersen, A. A. and D. G. Rogers (1998). Resistance to tetracycline and sulfadiazine in swine *C. trachomatis* isolates. Ninth International Symposium on Human Chlamydial Infection, San Francisco, Calif.
- 5 Bocher, M., T. Boldicke, et al. (1997). "Synthesis of mono- and bifunctional peptide dextran conjugates for the immobilization of peptide antigens on ELISA plates: properties and application." *Journal of Immunological Methods* 208(2): 191-202.
- Borel, N., N. Regenscheit, et al.,(2012). "Selection for tetracycline-resistant *Chlamydia suis* in treated pigs." *Vet Microbiol* 156(1-2): 143-146.
- 10 Brade, L., Rozalski, A., Kosma, P., Brade, H. (2000). A monoclonal antibody recognizing the 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) trisaccharide α Kdo(2-->4) α Kdo(2-->4) α Kdo of *Chlamydia psittaci* 6BC lipopolysaccharide." *Journal of Endotoxin Research* 6(5): 36368.
- Cevenini, R., M. Donati, et al.,(1991). "Partial Characterization of an 89-Kda Highly Immunoreactive Protein from *Chlamydia-Psittaci a/22* Causing Ovine Abortion." *Fems Microbiology Letters* 81(1): 111-116.
- 15 Chou, P. Y. and G. D. Fasman (1978). "Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence." *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 47: 45-148.
- De Clercq et al (2014). "The immune response against *Chlamydia suis* genital tract infection partially protects against re-infection", *V Veterinary Research* 45:95.
- De Puyseleir, K., L. De Puyseleir, et al.,(2014a). "Evaluation of the presence and zoonotic transmission of *Chlamydia suis* in a pig slaughterhouse." *Bmc Infectious Diseases* 14:560.
- 20 De Puyseleir, K., L. De Puyseleir, et al.,(2014b). "Development and Validation of a Real-Time PCR for *Chlamydia suis* Diagnosis in Swine and Humans." *PloS one* 9(5): e96704.
- Dean, D., J. Rothschild, et al.,(2013). "Zoonotic Chlamydiaceae Species Associated with Trachoma, Nepal." *Emerging Infectious Diseases* 19(12): 1948-1955.
- 25 Di Francesco, A., R. Baldelli, et al.,(2006). "Seroprevalence to chlamydiae in pigs in Italy." *Veterinary Record* 159(25): 849-850.
- Di Francesco, A., M. Donati, et al.,(2011). "Seroepidemiologic Survey for *Chlamydia suis* in Wild Boar (*Sus scrofa*) Populations in Italy." *J of Wildlife Dis* 47(3): 709-712.
- Donati, M., A. Di Francesco, et al.,(2009). "In vitro detection of neutralising antibodies to *Chlamydia suis* in pig sera." *Veterinary Record* 164(6): 173-174.
- 30 Eggemann, G., M. Wendt, et al.,(2000). "Prevalence of *Chlamydia* infections in breeding sows and their importance in reproductive failure." *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 107(1): 3-10.
- Emini, E. A., J. V. Hughes, et al.,(1985). "Induction of Hepatitis-a Virus-Neutralizing Antibody by a Virus-Specific Synthetic Peptide." *Journal of Virology* 55(3): 836-839.
- 35 Finn, R. D., J. Clements, et al.,(2011). "HMMER web server: interactive sequence similarity searching." *Nucleic acids research* 39(Web Server issue): W29-37.
- Forsbach-Birk, V., C. Foddis, et al.,(2013). "Profiling Antibody Responses to Infections by *Chlamydia abortus* Enables Identification of Potential Virulence Factors and Candidates for Serodiagnosis." *PloS one* 8(11).
- Grimwood, J. and R. S. Stephens (1999). "Computational analysis of the polymorphic membrane protein superfamily of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia pneumoniae*." *Microbial & comparative genomics* 4(3): 187-201.
- 40 Hoelzle, L. E., K. Hoelzle, et al.,(2004). "Recombinant major outer membrane protein (MOMP) of *Chlamydia abortus*, *Chlamydia pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera." *Veterinary Microbiology* 103(1-2): 85-90.
- 45 Hoelzle, L. E., G. Steinhausen, et al.,(2000). "PCR-based detection of chlamydial infection in swine and subsequent PCR-coupled genotyping of chlamydial *omp1*-gene amplicons by DNA-hybridization, RFLP-analysis, and nucleotide sequence analysis." *Epidemiology and Infection* 125(2): 427-439.
- Ivanov, V. S., Z. K. Suvorova, et al.,(1992). "Effective Method for Synthetic Peptide Immobilization That Increases the Sensitivity and Specificity of Elisa Procedures." *Journal of Immunological Methods* 153(1-2): 229-233.

- Karplus, P. A. and G. E. Schulz (1985). "Prediction of Chain Flexibility in Proteins - a Tool for the Selection of Peptide Antigens." *Naturwissenschaften* 72(4): 212-213.
- Kolaskar, A. S. and P. C. Tongaonkar (1990). "A Semiempirical Method for Prediction of Antigenic Determinants on Protein Antigens." *Febs Letters* 276(1-2): 172-174.
- 5 Larsen, J. E., O. Lund, *et al.*,(2006). "Improved method for predicting linear B-cell epitopes." *Immunome research* 2:2.
- Lis, P., A. Kumala, *et al.*,(2014). "Novel locked nucleic acid (LNA)-based probe for the rapid identification of *Chlamydia suis* using real-time PCR." *Bmc Veterinary Research* 10.
- Longbottom, D. and L. J. Coulter (2003). "Animal chlamydioses and zoonotic implications." *Journal of Comparative Pathology* 128(4): 217-244.
- 10 Longbottom, D., S. Fairley, *et al.*,(2002). "Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydia abortus*." *Journal of Clinical Microbiology* 40(11): 4235-4243.
- Longbottom, D., E. Psarrou, *et al.*,(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 *Chlamydia abortus*." *Fems Microbiology Letters* 195(2): 157-161.
- 15 Marques, P. X., P. Souda, *et al.*,(2010). "Identification of immunologically relevant proteins of *Chlamydia abortus* using sera from experimentally infected pregnant ewes." *Clinical and vaccine immunology : CVI* 17(8): 1274-1281.
- Niessner, A., C. Kaun, *et al.*,(2003). "Polymorphic membrane protein (PMP) 20 and PMP 21 of *Chlamydia pneumoniae* induce proinflammatory mediators in human endothelial cells in vitro by activation of the nuclear Factor-kappa B pathway." *Journal of Infectious Diseases* 188(1): 108-113.
- 20 Novak, M., Z. Moldoveanu, *et al.*,(1993). "Murine Model for Evaluation of Protective Immunity to Influenza-Virus." *Vaccine* 11(1): 55-60.
- Parker, J. M. R., D. Guo, *et al.*,(1986). "New Hydrophilicity Scale Derived from High-Performance Liquid-Chromatography Peptide Retention Data - Correlation of Predicted Surface Residues with Antigenicity and X-Ray-Derived Accessible Sites." *Biochemistry* 25(19): 5425-5432.
- 25 Sachse, K., E. Vretou, *et al.*,(2009). "Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections." *Veterinary Microbiology* 135(1-2): 2-21.
- Schautteet, K., D. S. Beeckman, *et al.*,(2010). "Possible pathogenic interplay between *Chlamydia suis*, *Chlamydia abortus* and PCV-2 on a pig production farm." *The Veterinary record* 166(11): 329-333.
- 30 Schautteet, K., E. De Clercq, *et al.*,(2013). "Tetracycline-resistant *Chlamydia suis* in cases of reproductive failure on Belgian, Cypriote and Israeli pig production farms." *Journal of medical microbiology* 62: 331-334.
- Schautteet, K., E. Stuyven, *et al.*,(2011). "Protection of pigs against *Chlamydia trachomatis* challenge by administration of a MOMP-based DNA vaccine in the vaginal mucosa." *Vaccine* 29(7): 1399-1407.
- Schautteet, K. and D. Vanrompay (2011). "Chlamydiaceae infections in pig." *Veterinary research* 42(1): 29.
- 35 Stephens, R. S., S. Kalman, *et al.*,(1998). "Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*." *Science* 282(5389): 754-759.
- Suchland, R. J., K. M. Sandoz, *et al.*,(2009). "Horizontal Transfer of Tetracycline Resistance among *Chlamydia* spp. In Vitro." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(11): 4604-4611.
- Szeredi, L., I. Schiller, *et al.*,(1996). "Intestinal *Chlamydia* in finishing pigs." *Veterinary pathology* 33(4): 369-374.
- 40 Tan, C., R. C. Hsia, *et al.*,(2009). "*Chlamydia trachomatis*-Infected Patients Display Variable Antibody Profiles against the Nine-Member Polymorphic Membrane Protein Family." *Infection and Immunity* 77(8): 3218-3226.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, *et al.*,(1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Research* 25(24): 4876-4882.
- 45 Vanrompay, D., T. Geens, *et al.*,(2004). "Immunoblotting, ELISA and culture evidence for Chlamydiaceae in sows on 258 Belgian farms." *Veterinary Microbiology* 99(1): 59-66.
- Verminnen, K., M. Van Loock, *et al.*,(2006). "Evaluation of a recombinant enzyme-linked immunosorbent assay for detecting *Chlamydia psittaci* antibodies in turkey sera." *Veterinary research* 37(4): 623-632.

ES 2 734 261 T3

Ser Phe Ser Asn Ile Ser Glu Glu Ile Gln Glu Pro Ser Ser Thr Pro
1 5 10 15

Glu Gln Glu Glu Asn Glu Glu Thr Asp Glu Asp Ser Ser Leu Asp Ser
20 25 30

Arg Asn Thr Glu Glu Thr Pro Pro Ser Pro Ser Ser Glu Thr Gln Glu
35 40 45

Asp Asp
50

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

5 <213> *Chlamydia suis*

<400> 4

Gln Pro Gln Asn Asn Ala Ile Ala Leu Arg Ser Phe Leu Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Gln Thr Glu Thr
20

<210> 5

<211> 120

10 <212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

<400> 5

Gly Ala Ile Leu Gly Glu Ser Thr Val Thr Ile Thr Gly Val Asp Thr
1 5 10 15

Leu Thr Phe Ser Lys Asn Ala Val Lys Val Thr Phe Val Asp Lys Ser
20 25 30

Glu Thr Gln Asn Pro Ser Gly Gly Ser Gly Thr Gly Asp Ser Ser Asp
35 40 45

Ser Ser Glu Ala Glu Gly Ser Ser Gly Ser Ser Asn Asp Ser Ala Asn
50 55 60

Asn Ser Ser Gly Gly Asp Ser Asn Gly Val Ser Ala Ala Ala Gln Ala
65 70 75 80

Ala Ala Phe Ser Arg Phe Leu Ser Ala Ser Thr Ser Thr Asp Pro Gln
85 90 95

Pro Gly Glu Ala Glu Asn Thr Asp Ser Thr Leu Asn Val Lys Leu Gly
100 105 110

Cys Gly Gly Gly Ile Tyr Ser Lys
115 120

ES 2 734 261 T3

<210> 6

<211> 50

<212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

5 <400> 6

Pro Thr Asp Gln Glu Gln Gly Ser Gln Gly Thr Glu Gln Asp Ser Gln
1 5 10 15

Glu Gly Ser Pro Gly Ser Thr Gly Ser Gln Glu Ser Ala Thr Asn Ser
20 25 30

Ala Ser Ser Gln Gln Ser Ser Ile Ala Ser Ala Arg Leu Thr Gln Leu
35 40 45

Ser Leu
50

<210> 7

<211> 30

10 <212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

<400> 7

Gly Gly Gly Ser Ser Ser Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Thr Thr Glu
1 5 10 15

Val Ile Lys Pro Val Val Gly Arg Gly Gly Ala Val Tyr Thr
20 25 30

<210> 8

15 <211> 30

<212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

<400> 8

Gly Asn Gly Gln Asp Gln Glu Gln Pro Gly Ala Glu Gly Gly Ala Ser
1 5 10 15

Glu Glu Asp Ser Asn Ala Asp Ser Gly Gln Glu Val Thr Gly
20 25 30

20 <210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

<400> 9

ES 2 734 261 T3

Val Arg Ser Ser Ser Glu Asp Arg Ala Gln Glu Ala Gly Ser Asp Ser
1 5 10 15

Thr Pro Ser Ser
20

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

5 <213> *Chlamydia suis*

<400> 10

Glu Gly Asp Ser Glu Ser Ala Glu Ala Ser
1 5 10

<210> 11

<211> 30

10 <212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

<400> 11

Ala Ile Gly Leu Val Ala Gly Ala Ile Pro Ala Asp Asn Asn Ser Val
1 5 10 15

Thr Ala Thr Val Ser Asp Ser Gly Thr Pro Ser Thr Thr Pro
20 25 30

<210> 12

15 <211> 8

<212> PRT

<213> *Chlamydia suis*

<400> 12

Gly Ser Ser Thr Pro Thr Ala Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de anticuerpos de *Chlamydia suis* en un sujeto, que comprende:
 - proporcionar una muestra biológica del sujeto, y
 - analizar la muestra para la presencia de anticuerpos contra un péptido de 8 a 30 aminoácidos de longitud, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o una secuencia que sea al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1; y/o contra un péptido de 8 a 30 aminoácidos de longitud, comprendiendo dicho péptido una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2 (SQSSIAS) o una secuencia que sea al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 2.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, por el cual la presencia de anticuerpos contra uno o ambos péptidos es indicativa de una infección pasada, temprana o tardía por *Chlamydia suis* en el sujeto.
3. El procedimiento según las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado por que la muestra biológica del sujeto es un fluido corporal, preferiblemente una secreción de mucosa o sangre, en particular suero.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que los anticuerpos detectados son del tipo IgA, IgM y/o IgG.
5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el sujeto es un mamífero, en particular un cerdo.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la presencia de anticuerpos se detecta mediante el uso de un inmunoensayo, en particular un ensayo de inmunofluorescencia (IF), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoenzimático (EIA o ELISA), ensayo de inmunotransferencia etiquetado con enzima (LIA, inmunotransferencia, mancha de transferencia y ensayo de inmunotransferencia recombinante), o luminiscencia (bioluminiscencia y quimioluminiscencia).
7. El procedimiento según la reivindicación 6, en donde el inmunoensayo es un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
8. Un péptido aislado de 8 a 30 aminoácidos de longitud, que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 (GTKDASID) o por SEQ ID NO: 2 (SQSSIAS), o una secuencia al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID no 2.
9. El péptido según la reivindicación 8, en donde dicho péptido es un péptido antigénico.
10. El péptido según la reivindicación 8, consistente en la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o una secuencia al menos 75% idéntica a SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
11. Un kit para uso en el diagnóstico de una infección por *Chlamydia suis*, que comprende uno o ambos de los péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en donde dicho péptido o péptidos son inmovilizados sobre un soporte sólido.
12. El kit según la reivindicación 11, siendo dicho kit un inmunoensayo, en particular un ELISA.
13. El kit según las reivindicaciones 11 o 12, en donde dicho kit es un ensayo DIVA.
14. Uso de un kit o de uno o más péptidos según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 en un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
15. Uso del procedimiento, uno o más péptidos o el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para diferenciar un sujeto vacunado de un sujeto infectado de forma natural.
16. Un procedimiento de preparación del péptido o el kit según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13.