



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

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

Fernando De-Jesús-Aldama<sup>1</sup>, Roberto Montes-de-Oca-Jiménez<sup>1\*</sup>  
and Beatriz Arellano-Reynoso<sup>2</sup>

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

Email: [romojimenez@yahoo.com](mailto:romojimenez@yahoo.com)

<sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria C.P. 04510 Coyoacán. Ciudad de México, México.

\*Corresponding author

### SUMMARY

**Background.** Ovine Enzootic Abortion is a contagious infectious disease caused by a Gram negative and obligate intracellular bacterium, *Chlamydia abortus*. For field diagnosis, commercial serological tests are used; however, some of these tests show low sensitivity and specificity rates, due to the cross-reactions that the antigens used have against other pathogens. For the most accurate diagnosis, it is necessary to develop tests with more specific antigens such as polymorphic membrane proteins (Pmp's), that allow to determine the presence of specific epitopes using new technologies. **Objective.** To determine *in silico* the presence of epitopes with specific immunogenic potential against *Chlamydia abortus* of two fragments of the PMP17G protein. **Methodology.** The cloning and sequencing of the fragments was carried out from a field isolate of *Chlamydia abortus*, and from the analysis of these sequences, with the help of two bioinformatics software's. **Results.** Several epitopes from *Chlamydia abortus* were found, rPOMP90-3 (eight epitopes) and rPOMP90-4 (one epitope). **Implications.** Bioinformatics analysis indicated that both fragments of the protein have the capacity to activate the immune system, which would be useful for the development of diagnostic kits and immunogens. **Conclusions.** The *in silico* analysis allowed to efficiently predict and identify specific epitopes against *Chlamydia abortus* in both fragments of the protein.

**Key words:** *Chlamydia abortus*; Ovine Enzootic Abortion; ELISA; epitopes; *in silico*; Polymorphic Membrane Protein.

### RESUMEN

**Antecedentes.** El aborto Enzootico Ovino es una enfermedad infectocontagiosa provocada por la bacteria Gram negativa e intracelular obligada *Chlamydia abortus*. Para el diagnóstico en campo, se emplean pruebas serológicas de uso comercial; sin embargo, algunas de estas pruebas tienen porcentajes de sensibilidad y especificidad bajos debido a las reacciones cruzadas que muestran los antígenos empleados frente a otros patógenos. Para el diagnóstico más certero, es necesario desarrollar pruebas con antígenos más específicos como las proteínas de membrana polimórficas (Pmp's), que permiten determinar la presencia de epítomos específicos empleando nuevas tecnologías. **Objetivo.** Determinar *in silico* la presencia de epítomos con potencial inmunogénicos específicos contra *Chlamydia abortus* de dos fragmentos de la proteína PMP17G. **Metodología.** Se realizó la clonación y secuenciación de los fragmentos a partir de un aislamiento de campo de *Chlamydia abortus* y del análisis de éstos, con ayuda de dos softwares bioinformáticos. **Resultados.** Se detectaron varios epítomos de *Chlamydia abortus*, rPOMP90-3 (ocho epítomos) y rPOMP90-4 (un epítomo). **Implicaciones.** El análisis bioinformático indicó que ambos fragmentos analizados de la proteína presentan capacidad de activación del sistema inmune, lo cual sería de utilidad para el desarrollo de técnicas de diagnóstico e inmunógenos. **Conclusiones.** El análisis *in silico* permitió predecir e identificar de manera eficiente epítomos específicos contra *Chlamydia abortus* en ambos fragmentos de la proteína.

† Submitted November 12, 2022 – Accepted July 7, 2023. <http://doi.org/10.56369/tsaes.4615>



Copyright © the authors. Work licensed under a CC-BY 4.0 License. <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

ISSN: 1870-0462.

ORCID = F. De Jesús-Aldama: <https://orcid.org/0000-0001-8549-6102>; R. Montes-de-Oca-Jiménez: <https://orcid.org/0000-0001-9994-0948>; B. Arellano-Reynoso: <https://orcid.org/0000-0002-3067-2719>

**Palabras clave:** *Chlamydia abortus*; Aborto Enzoótico Ovino; epítomos; *in silico*; Proteína de la Membrana Polimórfica.

## INTRODUCCIÓN

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

En México, el AEO es considerada como una enfermedad endémica, la presencia de este patógeno se ha reportado en ovinos y caprinos en diversos estudios desde hace varios años como uno de los agentes primarios causales de aborto en ovinos (Escalante-Ochoa *et al.*, 1996) y caprinos (Escalante-Ochoa *et al.*, 1997). Fue reportada la presencia de anticuerpos contra este agente en rebaños caprinos del estado de Guanajuato, en los que se registró una frecuencia de 4.87% (Campos-Hernández *et al.*, 2014). Posteriormente en 2015, en el mismo estado, *Chlamydia* spp. se identificó en cabras lecheras mediante cultivo celular en el 26.98% de las muestras (Mora-Díaz *et al.*, 2015). Jiménez-Estrada *et al.*, (2008) en el municipio de Xalatlaco, Estado de México, identifica la presencia de este agente mediante pruebas de ELISA y PCR, con una frecuencia de 21.3% y 0.65% respectivamente. En unidades de producción ovina ubicadas en municipios del Estado de México (Atacomulco, Calimaya, Coatepec Harinas, Santa María Rayón, Temascalcingo, Tenango del Valle, Xonacatlán Zumpango) se obtuvieron diversas prevalencias mediante aislamiento para *Chlamydia* spp. (68.44%) y PCR específico para *C. abortus* (6.46%) (De Jesus-Aldama, 2022).

En rebaños caprinos con problemas de aborto en diferentes estados de la república (Coahuila, Jalisco,

Querétaro, Puebla y Veracruz), se identificó mediante aislamiento (23.1%) y por PCR específico (9.6%) (Sánchez, 2014). En Guanajuato, en rebaños caprinos lecheros se identificaron anticuerpos contra *C. abortus* (4.87%); dichos animales seropositivos se identificaron en seis de nueve unidades de producción evaluadas (66.6%) (Campos-Hernández *et al.*, 2014). También se determinó la presencia del agente por medio de ELISA (9.60%), aislamiento (26.98%) y PCR (23.8%) (Mora-Díaz *et al.*, 2015). En un estudio realizado en equinos mediante ELISA frente a *C. abortus*, la prevalencia fue mayor en equinos que conviven con rumiantes como bovinos (48%), caprinos (12.5%) y ovinos (29.7%) respecto a los equinos que no conviven con rumiantes (1.32%) (Rubio-Navarrete *et al.*, 2017).

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

El serodiagnóstico específico del AEO se ve limitado debido a las reacciones cruzadas que presentan algunas de las pruebas comerciales disponibles actualmente con bacterias del mismo género y con algunas bacterias Gram negativas como *Acinetobacter* spp; dado que, estas se desarrollan en base a antígenos compartidos

entre las especies de este género (O'Neill *et al.*, 2018). La falta de pruebas lo suficientemente sensibles y específicas contra el AEO, ha conducido a diversos estudios enfocados en identificar factores de virulencia y proteínas de superficie, que pudieran ser empleados como dianas para el desarrollo de pruebas de ELISA más eficientes revelando resultados prometedores en el diagnóstico específico de *C. abortus* (Forsbach-Birk *et al.*, 2013; Hagemann *et al.*, 2016). Otra alternativa ha sido la identificación *in silico* de epítopes inmunogénicos en proteínas de *C. abortus*. Se han evaluado proteínas de superficie, como la proteína principal de la membrana externa (MOMP) (Vretou *et al.*, 2001) y proteínas polimórficas de membrana externa (POMP) (Vretou *et al.*, 2003). Se han estudiado los factores de virulencia en diferentes especies de *Chlamydia* (Rahman *et al.*, 2016), así como el desarrollo de microensayos empleando péptidos sintéticos que representan epítomos de células B de proteínas inmunodominantes de algunas especies del género (Sachse *et al.*, 2018). El presente estudio identifica y caracteriza *in silico* la presencia de epítomos inmunogénicos en dos fragmentos de la Proteína de la Membrana Polimórfica (PMP17G) que puedan ser empleados para la detección específica del AEO y el desarrollo de vacunas.

## MATERIALES Y METODOS

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

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

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

extensión durante a 72 °C por 1 min. Finalmente, una extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron examinados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (10 mg/mL) a 90 Volts por 40 min. y visualizados en una cámara de UV.

### Construcción de plásmidos

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

### Transformación celular

Para el proceso de transformación celular, se empleó la cepa bacteriana de *E. coli* DH5α químicamente competente empleando el método de CaCl<sub>2</sub> (Illingworth *et al.*, 2017), las células y los plásmidos recombinantes (pGEM-T- *POMP90-3* y pGEM-T- *POMP90-4*) se cotransformaron y se sembraron en agar selectivo Luria Bertani (LB) (500 µL) suplementado con ampicilina (100 µg/mL), Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG)/X-Gal, con concentraciones finales de 96 µg/mL y 40 µg/mL respectivamente, las placas fueron incubadas a 37°C por 24 hrs., finalmente las colonias resultantes se seleccionaron a través del método de selección de colonias azul-blancas (Nabi *et al.*, 2016).

### Purificación de los plásmidos recombinantes

Los plásmidos recombinantes (pGEM-T- *POMP90-3* y pGEM-T- *POMP90-4*) se purificaron a partir de células de *E. coli* DH5α transformadas, obtenidas previamente de cultivos de 10 mL de caldo LB con antibiótico; posteriormente los cultivos se trataron de acuerdo con el protocolo para purificación de plásmidos "High-Speed Plasmid Mini Kit" (IBI Scientific, USA).

### Análisis de los plásmidos recombinantes

La clonación de ambos plásmidos recombinantes se confirmó mediante amplificación por PCR y digestión enzimática (*EcoRI* y *NcoI*) (Promega, USA);

adicionalmente se secuenciaron dichos plásmidos recombinantes para su análisis posterior.

### Secuenciación y análisis de los plásmidos recombinantes

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

### Predicción de epítopes *in silico*

Las secuencias obtenidas fueron analizadas empleando el software Mega X (Wasissa *et al.*, 2021). Las secuencias de aminoácidos se evaluaron mediante el software bioinformático Immune Epitope Database Analysis Resource (<http://tools.iedb.org/bcell/>) y BepiPred - 2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?BepiPred-2.0>) para la identificación de epítomos con potencial inmunogénico a partir de secuencias de aa obtenidas en este estudio. Adicionalmente, realizamos la predicción de epítomos discontinuos y estructuras 3D en ambos fragmentos empleando el software ElliPro (<http://tools.iedb.org/elliPro/>).

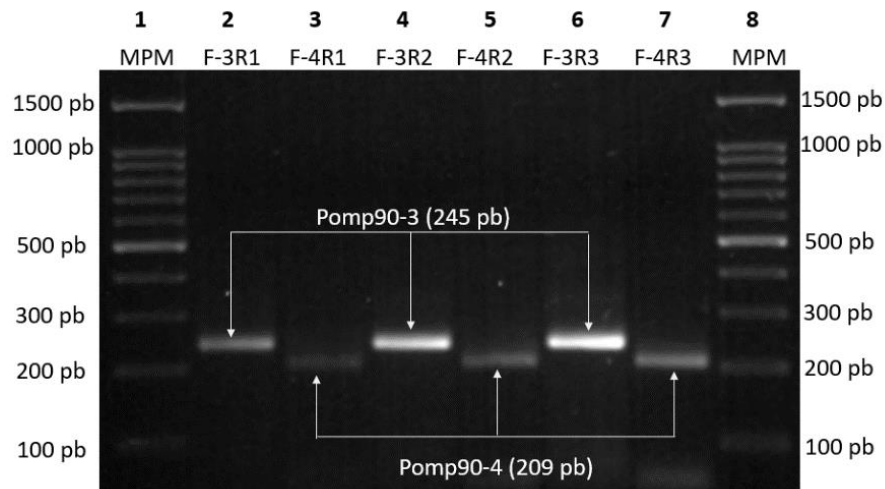
## RESULTADOS

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

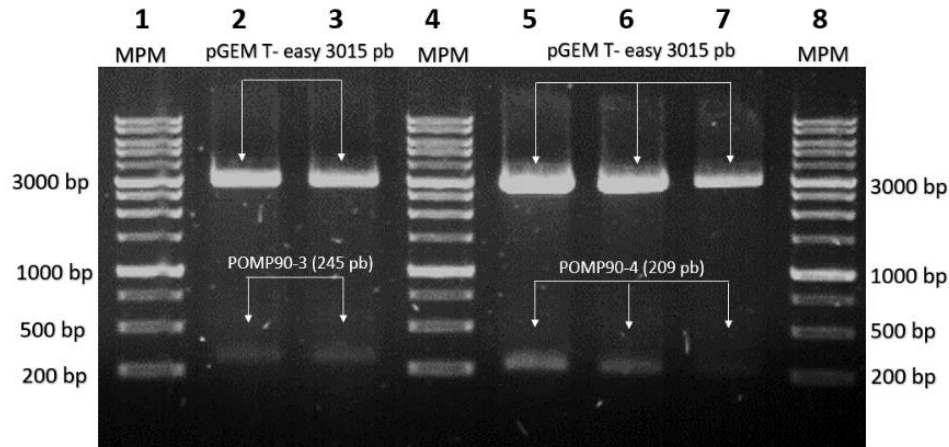
El uso de los iniciadores (Longbottom *et al.*, 2002) para la identificación específica de los fragmentos superpuestos 3 y 4 de la Proteína de la Membrana Polimórfica de *C. abortus*, resultaron en dos productos de 245 pb (*POMP90-3*) y 209 pb (*POMP90-4*) (figura 1).

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

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



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



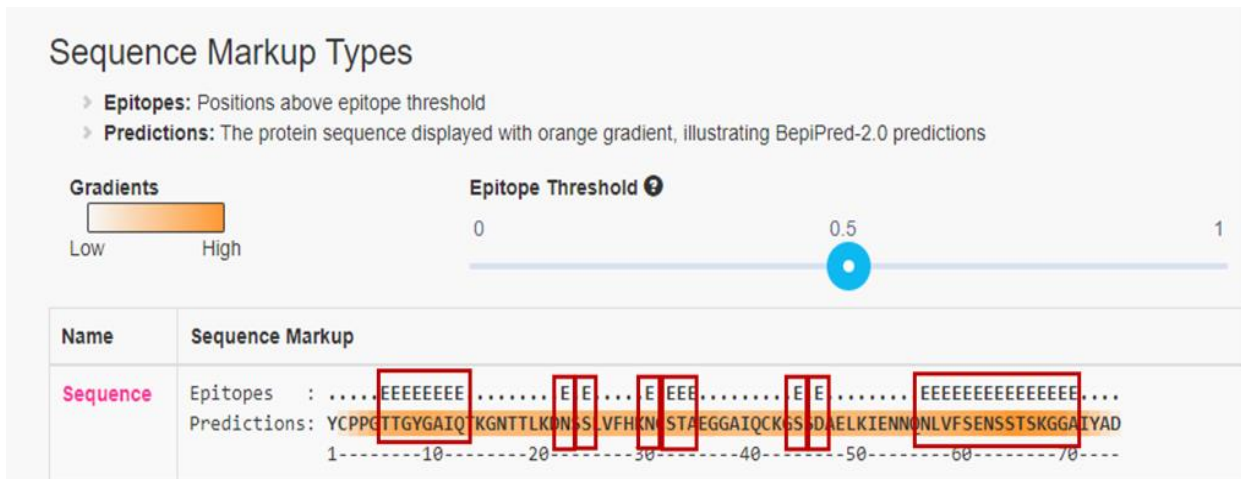
**Figura 2.** Identificación de los fragmentos rPOMP90-3 y rPOMP90-4 a través de digestión enzimática con enzimas de restricción *NcoI* y *NdeI*. Carril 1, 4 y 8, marcador de peso molecular. Carril 2-3, pGEM T- easy (3015 pb) y rPOMP90-3 (245 pb). Carril 5-7 pGEM T- easy rPOMP90-4 (209 pb).

### Predicción de epítomos *in silico*

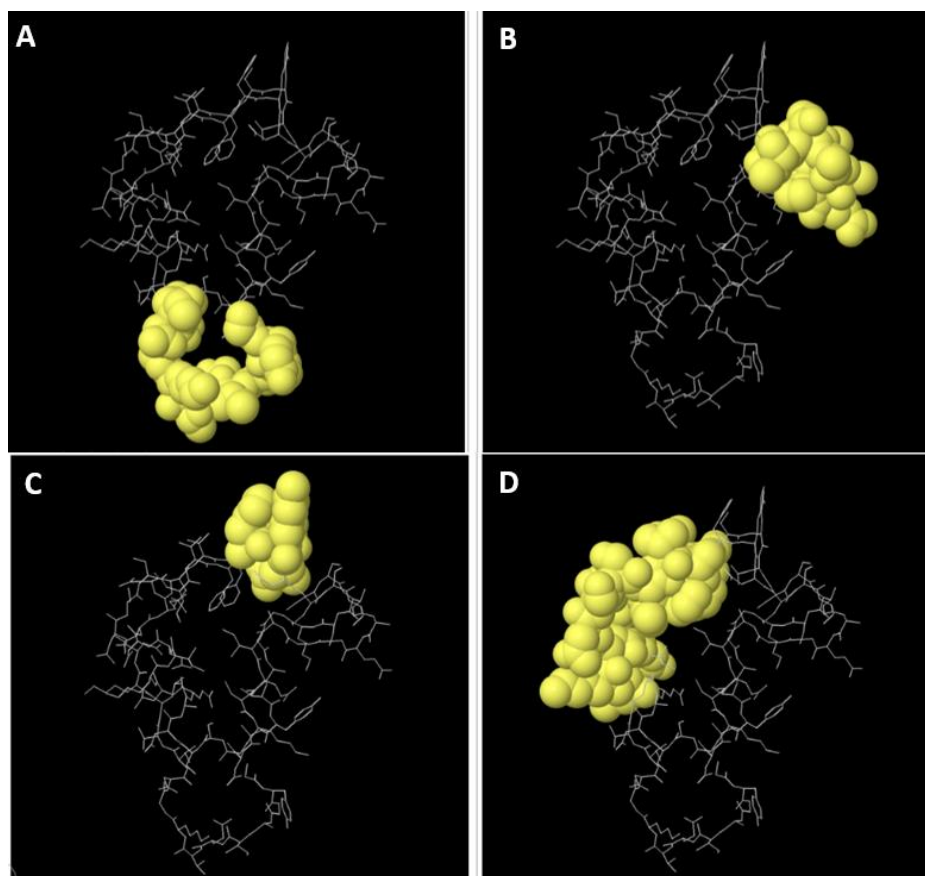
#### Identificación de epítomos inmunogénicos fragmento rOMP90-3 de *Chlamydia abortus*

Con un total de 75 residuos que conforman la secuencia de aminoácidos del fragmento rPOMP90-3, al ser evaluado por los dos softwares, se observó que la secuencia conservada al 100% predijo ocho epítomos de diferentes tamaños. Ambas evaluaciones nos demostraron variaciones en cuanto a la predicción de los epítomos; IEDB predijo un total de ocho epítomos, los más grandes son tres: dos de ocho y uno de quince residuos (figura 3), BepiPred predijo ocho, los más grandes fueron dos, uno de ocho y otro de quince residuos; estos ocho epítomos coinciden en ambos programas; sin embargo, Immune Epitope Database

predijo una adicional, siendo nueve los epítomos predichos por este programa, una ligera diferencia entre ambos programas, el resto son más pequeños de uno y dos residuos que varían en ambos programas al punto de estar presentes o no en uno u otro de los programas. Adicionalmente, realizamos la predicción de epítomos discontinuos y estructuras 3D en ambos fragmentos empleando el software “ElliPro: Antibody Epitope Prediction”, esta predicción demostró cuatro epítomos discontinuos. Además, las estructuras tridimensionales de los epítomos discontinuos demuestran que estos se encuentran expuestos en la superficie de la estructura de todo el fragmento rPOMP90-3 (Figura 4); el programa identificó un total de cuatro epítomos discontinuos con sus respectivas estructuras tridimensionales.



**Figura 3.** Epítomos predichos (ocho secuencias) por el programa “BepiPred 2.0” en la secuencia correspondiente al fragmento rPOMP90-3, de tamaños variables (enmarcados en rojo).



**Figura 4.** Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rPOMP90-3 de *C. abortus*. Representación gráfica teórica de la estructura de 4 epítomos discontinuos. A) 12 residuos, B) 10 residuos, C) 5 residuos y D) 17 residuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de ésta.

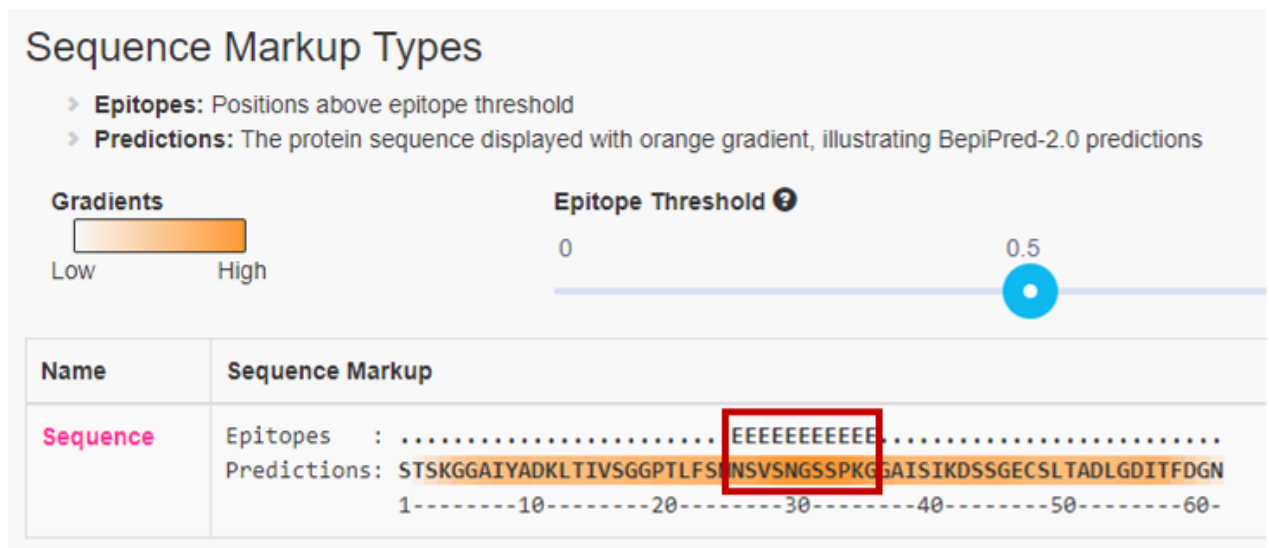
#### Identificación de epítomos inmunogénicos del fragmento rPOMP90-4 de *Chlamydia abortus*

Con un total de 62 residuos que conforman la secuencia de aminoácidos del fragmento rPOMP90-4, la secuencia conservada al 100% predijo un epítomo de 12 aminoácidos. “BepiPred 2.0” evaluó cada residuo de la secuencia proteínica; el cual, determinó un resultado similar al predicho por “Immune Epitope Database”; con la diferencia de que este programa excluyó un aminoácido al inicio del epítomo predicho en comparación al primero (Figura 5). De igual forma, realizamos la predicción de epítomos discontinuos y estructuras 3D de dicho fragmento. Además, las estructuras tridimensionales de los epítomos discontinuos demuestran que éstos se encuentran expuestos en la superficie de la estructura de todo el fragmento rPOMP90-4 (Figura 6). “BepiPred 2.0” evaluó cada residuo de la secuencia proteínica, este programa determinó un resultado similar al predicho por “Immune Epitope Database”; con la diferencia de que este programa excluyó un aminoácido al inicio del epítomo predicho en comparación al primero.

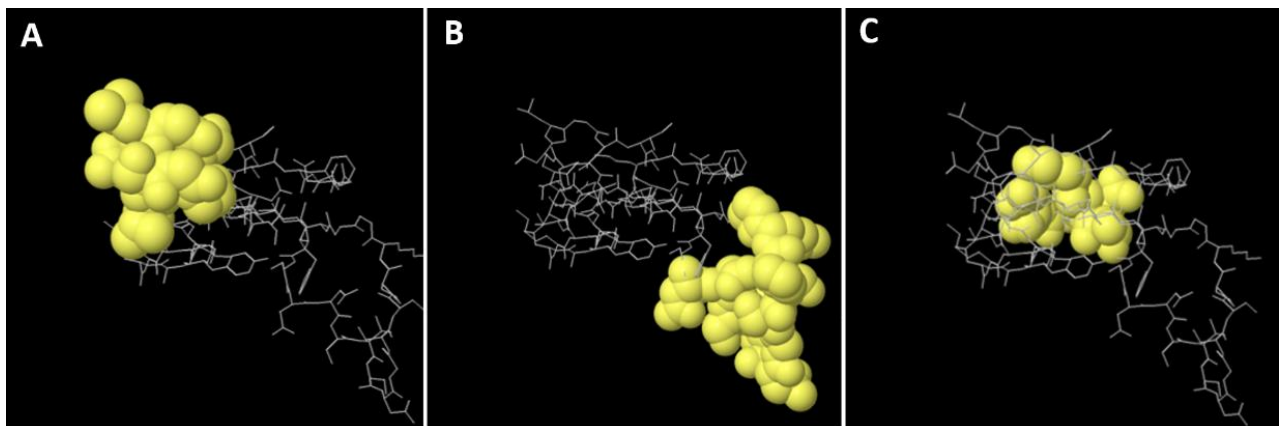
#### DISCUSIÓN

El presente trabajo determina la presencia *in silico* de epítomos con potencial inmunogénico en dos fragmentos de la proteína PMP17G de un aislado de *C. abortus* obtenido en rebaños ovinos en el Estado de México. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la presencia de epítomos con potencial inmunogénico en los dos fragmentos analizados rPOMP90-3 y rPOMP90-4.

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



**Figura 5.** Epítipo predicho (una secuencia) por el programa “BepiPred 2.0” en la secuencia correspondiente al fragmento rPOMP90-4 (enmarcado en rojo).



**Figura 6.** Estructuras tridimensionales predichas en el fragmento rPOMP90-4 de *Chlamydia abortus*. Representación gráfica teórica de la estructura de los 3 epítomos discontinuos. A) 8 residuos, B) 12 residuos y C) 7 residuos, estructura conformacional y exposición en la superficie de esta.

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

A pesar de que el empleo de estas herramientas tiene muchas ventajas y optimizan los tiempos de trabajo en el laboratorio, es importante recalcar que, al igual que para el desarrollo de vacunas recombinantes, todas las herramientas bioinformáticas disponibles actualmente proporcionan una lista completa de epítomos para diseñar pruebas de serodiagnóstico. Sin embargo, esta

solo es la etapa inicial del proceso ya que, una vez predichos los epítomos en la secuencia diana, se deben evaluar cuales péptidos serán los más adecuados para las subsecuentes evaluaciones. Actualmente la evaluación de péptidos sigue siendo un desafío, debido a que implementar el proceso de validación requiere de tiempos importantes (Soria-Guerra *et al.*, 2015) y el cotejo con pruebas acreditadas como óptimas para el diagnóstico del AEO por la WOA (WOAH, 2018).

Trabajos previos, muestran que los estudios *in silico* son más rápido y eficientes que los empleados de manera habitual y ha contribuido dentro del desarrollo del presente trabajo de investigación optimizando los tiempos, evitando el proceso de producción de los fragmentos recombinantes; ya que, una vez identificados los péptidos específicos dentro de la secuencias de ambos fragmentos, existen empresas

dentro de la rama que se dedican a la síntesis de los mismos para que puedan emplearse de forma prácticamente inmediata una vez sintetizados.

Las secuencias conservadas en su totalidad en las secuencias de nucleótidos y las de aminoácidos de ambos fragmentos, se procedió a realizar el mapeo de ambas secuencias; se determinó para el fragmento rPOMP90-3 un total de ocho epítopes y para el fragmento rPOMP90-4 un solo epítopo de un tamaño de doce residuos. Un estudio que desarrolló una ELISA recombinante empleó el mapeo de la secuencia completa de la proteína PmpC (2140 aa) de *C. suis* y detectó un total de 9 epítopes de diferentes tamaños, detectado al final un residuo de nueve aa óptimo para el diagnóstico específico de este patógeno; ya que, la ELISA rPmpC detectó todos los sueros de control positivo y contrastó con la técnica de fijación del complemento (CFT) y contó con un 100% de especificidad contra *C. suis*. Es importante resaltar estos resultados porque las secuencias completas de epítopes predichos por los programas pueden ser o no óptimos en su totalidad como se observó en dicho estudio (De Puyseleyr *et al.*, 2018) y esto se verá reflejado hasta que se pueda realizar la evaluación y validación de los epítopes predichos en el presente estudio. Hay que considerar que en cuanto al fragmento rPOMP90-3 se mostró un epítopo adicional predicción con Immune Epitope Database (nueve) y con BepiPred 2.0 (ocho) con ambos programas, siendo solamente dos de los ocho predichos iguales para los dos programas, por lo cual debemos de ser prudentes al momento de elegir con cual se decidiría trabajar en el futuro (Jespersen *et al.*, 2017).

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

Además de servir para la predicción y mapeo de secuencias de proteínas, también se puede determinar la estructura conformacional de las proteínas y observar de manera teórica la ubicación del epítopo de interés (Jespersen *et al.*, 2017). El presente estudio

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

## CONCLUSIONES

La proteína de la membrana polimórfica es una alternativa viable para el desarrollo de pruebas serológicas específicas contra *C. abortus*. La predicción *in silico* de epítopes inmunogénicos optimiza tiempos y costos de inversión para el desarrollo de pruebas de serodiagnóstico. Se lograron identificar diferentes epítopes inmunogénicos en las secuencias de los fragmentos rPOMP90-3 y rPOMP90-4, los cuales resultaron ser específicos para la especie *C. abortus*. Las estructuras conformacionales de los epítopes predichos demuestran su exposición en la superficie lo que hace posible su reconocimiento por los anticuerpos contra las mismas.

## Acknowledgments

The authors wish to thank the Autonomous University of the State of Mexico for financing this study, and to the National Council of Science and Technology (CONACYT) for the granting of the first author's scholarship to pursue postgraduate studies (PCARN-UAEM-CONACYT).

**Funding.** The project was financed by the Autonomous University of the State of Mexico, UAEM Secretary for Research and Advanced Studies. Clave 6784/2022CIC.

**Conflict of interests.** The authors declare they have no conflict of financial or non-financial interests.

**Compliance with ethical standards.** The authors declare that all the procedures that contributed to the realization of this work comply with the ethical standards of the UAEM, and with the authorization by a bioethical committee of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics, UAEM.

**Data availability.** Authors declare that all data are available with Ph.D. Roberto Montes de Oca Jiménez, [romojimenez@yahoo.com](mailto:romojimenez@yahoo.com).



**Author contribution statement (CRediT).** **F. De Jesús-Aldama:** Conceptualization, Investigation, Methodology, Data curation, Formal Analysis, Writing- original draft. **R. Montes de Oca-Jiménez:** Conceptualization, Investigation, Validation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Resources. **B. Arellano-Reynoso:** Visualization, Writing – review & editing.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Montes de Oca, S., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Carlos Vázquez-Chagoyán, J., Barbabosa-Pliego, A., Eliana Rivadeneira-Barreiro, P. and C Zambrano-Rodríguez, P., 2022. The Use of Peptides in Veterinary Serodiagnosis of Infectious Diseases: A Review. *Veterinary Sciences*, 9(10), p. 561. <https://doi.org/10.3390/vetsci9100561>
- Ansari, H.R. and Raghava, G.P., 2010. Identification of conformational B-cell Epitopes in an antigen from its primary sequence. *Immune Research*, 6, p. 6. <https://doi.org/10.1186/1745-7580-6-6>
- Atalla, H., Alzuheir, I., Jalboush, N., 2017. Detection of *Chlamydomydia abortus* antibody in active reproductive rams in sheep herds in northern Palestine. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 168, p. 192-196. <https://www.researchgate.net/publication/320161559>
- Bommana, S., Polkinghorne, A., 2019. Mini Review: Antimicrobial Control of Chlamydial Infections in Animals: Current Practices and Issues. *Frontiers in Microbiology*, 10(113), p. 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00113>
- Bommana, S., Jelocnik, M., Borel, N., Marsh, I., Carver, S., Polkinghorne, A., 2019. The limitations of commercial serological assays for detection of chlamydial infections in Australian livestock. *Journal of Medical Microbiology*, 68(4), p. 627–632. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000951>
- Campos-Hernández, E., Vázquez-Chagoyán, J. C., Salem, A. Z., Saltijeral-Oaxaca, J. A., Escalante-Ochoa, C., López-Heydeck, S. M., de Oca-Jiménez, R. M., 2014. Prevalence and molecular identification of *Chlamydia abortus* in commercial dairy goat farms in a hot region in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 46(6), p. 919–924. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0585-6>
- Cheong, H. C., Lee, C., Cheok, Y. Y., Tan, G., Looi, C. Y., Wong, W. F., 2019. *Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. Microorganisms*, 7(5), p. 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>
- De Jesus-Aldama, F., 2022. Identificación *in silico* de epítopos inmunogénicos en fragmentos de la Proteína de Membrana Polimórfica (POMP90) en un aislado de Chlamydia abortus de origen mexicano [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de México. *Repositorio institucional – Universidad Autónoma del Estado de México*. <http://hdl.handle.net/20.500.11799/137465>
- de Oliveira, J., Rozental, T., de Lemos, E., Forneas, D., Ortega-Mora, L. M., Porto, W., da Fonseca Oliveira, A. A., Mota, R. A., 2018. *Coxiella burnetii* in dairy goats with a history of reproductive disorders in Brazil. *Acta Tropica*, 183, p. 19–22. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.010>
- De Puyssseleyr, K., Kieckens, E., De Puyssseleyr, L., Van den Wyngaert, H., Ahmed, B., Van Lent, S., Creasy, H. H., Myers, G., Vanrompay, D., 2018. Development of a *Chlamydia suis*-specific antibody enzyme-linked immunosorbent assay based on the use of a B-cell epitope of the polymorphic membrane protein C. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), p. e457–e469. <https://doi.org/10.1111/tbed.12783>
- Escalante-Ochoa, C., Díaz-Aparicio, E., Segundo-Zaragoza, C., Suárez-Güemes, F., 1997. Isolation of *Chlamydia psittaci* involved in abortion of goats in Mexico: first report. *Revista Latino Americana de Microbiología*, 39(3-4), p. 117–121. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10932720/>
- Escalante-Ochoa, C., Rivera-Flores, A., Trigo-Tavera, F., Romero-Martínez, J., 1996. Detection of *Chlamydia psittaci* in enteric subclinical infections in adult sheep, through cell culture isolation. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 38(1), p. 17–23. <https://biblat.unam.mx/es/revista/revista-latinoamericana-de-microbiologia/articulo/detection-of-chlamydia-psittaci-in-enteric-subclinical-infections-in-adult-sheep-through-cell-culture-isolation>

- Essig, A., Longbottom, D., 2015. *Chlamydia abortus*: New Aspects of Infectious Abortion in Sheep and Potential Risk for Pregnant Women. *Current Clinical Microbiology Reports*, p. 22–34. doi: <https://doi.org/10.1007/s40588-015-0014-2>
- Forsbach-Birk, V., Foddiss, C., Simnacher, U., Wilkat, M., Longbottom, D., Walder, G., Benesch, C., Ganter, M., Sachse, K., Essig, A., 2013. Profiling antibody responses to infections by *Chlamydia abortus* enables identification of potential virulence factors and candidates for serodiagnosis. *PLoS One*, 8(11), e80310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080310>
- Hagemann, J. B., Simnacher, U., Longbottom, D., Livingstone, M., Maile, J., Soutschek, E., Walder, G., Boden, K., Sachse, K., Essig, A., 2016. Analysis of Humoral Immune Responses to Surface and Virulence-Associated *Chlamydia abortus* Proteins in Ovine and Human Abortions by Use of a Newly Developed Line Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(7), p. 1883–1890. <https://doi.org/10.1128/JCM.00351-16>
- Hireche, S., Ababneh, M. M., Bouaziz, O., Boussena, S., 2016. Seroprevalence and molecular characterization of *Chlamydia abortus* in frozen fetal and placental tissues of aborting ewes in northeastern Algeria. *Tropical Animal Health and Production*, 48(2), p. 255–262. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0944-y>
- Illingworth, M., Hooppaw, A. J., Ruan, L., Fisher, D. J., Chen, L., 2017. Biochemical and Genetic Analysis of the *Chlamydia* GroEL Chaperonins. *Journal of Bacteriology*, 199(12), e00844-16. <https://doi.org/10.1128/jb.00844-16>
- Jespersen, M. C., Peters, B., Nielsen, M., Marcatili, P., 2017. BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), p. W24–W29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx346>
- Klasinc, R., Reiter, M., Digruher, A., Tschulenk, W., Walter, I., Kirschner, A., Spittler, A., Stockinger, H., 2021. A Novel Flow Cytometric Approach for the Quantification and Quality Control of *Chlamydia trachomatis* Preparations. *Pathogens*, 10(12), p. 1617. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121617>
- Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Menard, M. F., Longbottom, D., Denis, G., 2018. Abortion storm induced by the live *Chlamydia abortus* vaccine 1B strain in a vaccinated sheep flock, mimicking a natural wild-type infection. *Veterinary Microbiology*, 225, p. 31–33. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.012>
- Livingstone, M., Wattedegera, S. R., Palarea-Albaladejo, J., Aitchison, K., Corbett, C., Sait, M., Wilson, K., Chianini, F., Rocchi, M. S., Wheelhouse, N., Entrican, G., Longbottom, D., 2021. Efficacy of Two *Chlamydia abortus* Subcellular Vaccines in a Pregnant Ewe Challenge Model for Ovine Enzootic Abortion. *Vaccines*, 9(8), p. 898. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080898>
- Longbottom, D., Fairley, S., Chapman, S., Psarrou, E., Vretou, E., & Livingstone, M. 2002. Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydia abortus*. *Journal of clinical microbiology*, 40(11), 4235–4243. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.11.4235-4243.2002>
- Longbottom, D., Sait, M., Livingstone, M., Laroucau, K., Sachse, K., Harris, S. R., Thomson, N. R., Seth-Smith, H., 2018. Genomic evidence that the live *Chlamydia abortus* vaccine strain 1B is not attenuated and has the potential to cause disease. *Vaccine*, 36(25), p. 3593–3598. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.042>
- Montbrau, C., Fontseca, M., March, R., Sitja, M., Benavides, J., Ortega, N., Caro, M. R., Salinas, J., 2020. Evaluation of the Efficacy of a New Commercially Available Inactivated Vaccine Against Ovine Enzootic Abortion. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 593. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00593>
- Mora Diaz, J. C., Díaz Aparicio, E., Herrera López, E., Suarez Güemes, F., Escalante Ochoa, C., Jaimes Villareal, S., Arellano Reynoso, B., 2015. Isolation of *Chlamydia abortus* in dairy goat herds and its relation to abortion in Guanajuato, Mexico. *Veterinaria México OA*, 2(1), p. 01-11. <http://dx.doi.org/10.21753/vmoa.2.1.339>

- Nabi, H., Rashid, I., Ahmad, N., Durrani, A., Akbar, H., Islam, S., Bajwa, A. A., Shehzad, W., Ashraf, K., Imran, N., 2017. Induction of specific humoral immune response in mice immunized with ROP18 nanospheres from *Toxoplasma gondii*. *Parasitology Research*, 116(1), p. 359–370. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5298-5>
- O'Neill, L. M., Keane, O. M., Ross, P. J., Nally, J. E., Seshu, J., Markey, B., 2019. Evaluation of protective and immune responses following vaccination with recombinant MIP and CPAF from *Chlamydia abortus* as novel vaccines for enzootic abortion of ewes. *Vaccine*, 37(36), p. 5428–5438. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.088>
- O'Neill, L. M., O'Driscoll, Á., Markey, B., 2018. Comparison of three commercial serological tests for the detection of *Chlamydia abortus* infection in ewes. *Irish Veterinary Journal*, 71, p. 13. <https://doi.org/10.1186/s13620-018-0124-2>
- Ortega, N., Caro, M. R., Gallego, M. C., Murcia-Belmonte, A., Álvarez, D., Del Río, L., Cuello, F., Buendía, A. J., Salinas, J., 2016. Isolation of *Chlamydia abortus* from a laboratory worker diagnosed with atypical pneumonia. *Irish Veterinary Journal*, 69, p. 8. <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0067-4>
- Osman, K. M., Ali, H. A., ElJakee, J. A., Galal, H. M., 2011. *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila pecorum* infections in goats and sheep in Egypt. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 30(3), p. 939–948. <http://dx.doi.org/10.20506/rst.30.3.2088>
- Pichon, N., Guindre, L., Laroucau, K., Cantaloube, M., Nallatamby, A., Parreau, S., 2020. *Chlamydia abortus* in Pregnant Woman with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Emerging Infectious Diseases*, 26(3), p. 628–629. <https://doi.org/10.3201/eid2603.191417>
- Pourhajibagher, M., Bahador, A., 2016. Designing and in Silico Analysis of PorB Protein from *Chlamydia Trachomatis* for Developing a Vaccine Candidate. *Drug Research*, 66(9), p. 479–483. <https://doi.org/10.1055/s-0042-110319>
- Praga-Ayala, A. R., Montes de Oca-Jiménez, R., Ortega-Santana, C., Salem, A. Z. M., Cubillos-Godoy, V., Fernández-Rosas, P., Monroy-Salazar, H. G., 2014. Low seroprevalence of *Chlamydia abortus* in dairy cows of hot environment in southern of. *Life Science Journal*, 10457.
- Rahman, K., Chowdhury, E. U., Sachse, K., Kaltenboeck, B., 2016. Inadequate Reference Datasets Biased toward Short Non-epitopes Confound B-cell Epitope Prediction. *The Journal of Biological Chemistry*, 291(28), p. 14585–14599. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.729020>
- Rodolakis, A., Laroucau, K., 2015. *Chlamydiaceae* and chlamydial infections in sheep or goats. *Veterinary Microbiology*, 181(1-2), p. 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.010>
- Rubio-Navarrete, I., Montes-de-Oca-Jiménez, R., Acosta-Dibarrat, J., Monroy-Salazar, H.G., Morales-Erasto, V., Fernández-Rosas, P. and Odongo, E.N., 2017. Prevalence of *Chlamydia abortus* Antibodies in Horses from the Northern State of Mexico and Its Relationship with Domestic Animals. *Journal of Equine Veterinary Science*, 56, p. 110-113. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.05.004>
- Sachse, K., Rahman, K. S., Schnee, C., Müller, E., Peisker, M., Schumacher, T., Schubert, E., Ruettger, A., Kaltenboeck, B., Ehrlich, R., 2018. A novel synthetic peptide microarray assay detects *Chlamydia* species-specific antibodies in animal and human sera. *Scientific Reports*, 8(1), p. 4701. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23118-7>
- Sánchez-Rocha, L., Arellano-Reynoso, B., Hernández-Castro, R., Palomares-Resendiz, G., Barradas-Piña, Francisco, Díaz-Aparicio, E., 2021. Presencia de *Chlamydia abortus* en cabras con historial de abortos en México. *Abanico Veterinario*, 11, p. e118. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.26>
- Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O., Rosales-Mendoza, S., 2015. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *Journal of Biomedical Informatics*, 53, p. 405–414. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003>
- Vita, R., Mahajan, S., Overton, J. A., Dhanda, S. K., Martini, S., Cantrell, J. R., Wheeler, D. K., Sette, A., Peters, B., 2019. The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update.

- Nucleic Acids Research*, 47(D1), p. D339–D343. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1006>
- Vretou, E., Giannikopoulou, P., Longbottom, D., Psarrou, E., 2003. Antigenic organization of the N-terminal part of the polymorphic outer membrane proteins 90, 91A, and 91B of *Chlamydomphila abortus*. *Infection and Immunity*, 71(6), p. 3240–3250. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3240-3250.2003>
- Vretou, E., Psarrou, E., Kaiser, M., Vlisidou, I., Salti-Montesanto, V., & Longbottom, D. 2001. Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydomphila psittaci* serotype 1 (*Chlamydomphila abortus*). *Infection and immunity*, 69(1), 607–612. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.607-612.2001>
- Walder, G., Hotzel, H., Brezinka, C., Gritsch, W., Tauber, R., Würzner, R., Ploner, F., 2005. An unusual cause of sepsis during pregnancy: recognizing infection with *Chlamydomphila abortus*. *Obstetrics and Gynecology*, 106(5 Pt 2), p. 1215–1217. <https://doi.org/10.1097/01.aog.0000161060.69470.9c>
- Walder, G., Meusbürger, H., Hotzel, H., Oehme, A., Neunteufel, W., Dierich, M. P., Würzner, R., 2003. *Chlamydomphila abortus* pelvic inflammatory disease. *Emerging Infectious Diseases*, 9(12), p. 1642–1644. <https://doi.org/10.3201/eid0912.020566>
- Walker, E., Lee, E. J., Timms, P., Polkinghorne, A., 2015. *Chlamydomphila pecorum* infections in sheep and cattle: A common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health. *Veterinary Journal*, 206(3), p. 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.09.022>
- Wasissa, M., Lestari, F. B., Nururrozi, A., Tjahajati, I., Indarjulianto, S., Salasia, S., 2021. Investigation of chlamydomphilosis from naturally infected cats. *Journal of veterinary science*, 22(6), p. e67. <https://doi.org/10.4142/jvs.2021.22.e67>
- World Organization for animal Health (WOAH) 2018. – Manual terrestre: Chapter 3.7.5. - Enzootic abortion of ewes (ovine chlamydomphilosis) 59, 1456–1465. Disponible en: <https://www.woah.org/es/que-hacemos/sanidad-y-bienestar-animal/enfermedades-animales/?alphabet=C> (fecha de consulta: 20 de abril de 2020)
- Yin, L., Schautteet, K., Kalmar, I., Bertels, G., Van Driessche, E., Czaplicki, G., Borel, N., Longbottom, D., Frélin, D., Dispas, M., Al, E., 2014. Prevalence of *Chlamydomphila abortus* in Belgian ruminants Prevalentie. *VLAAMS Diergeneesk. Tijdschr.* 83, p. 164–170. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.12.5911>