

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS ESPE

Estandarización de una prueba de ELISA utilizando la *MSP5* para determinar la avidéz de anticuerpos en *Anaplasma marginale*



Autora: Evelyn Alejandra Cobos Paladines

Tutor: Armando Reyna-Bello





ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Índice

1. Introducción
2. Objetivos
3. Metodología
4. Resultados
5. Discución
6. Conclusiones y recomendaciones



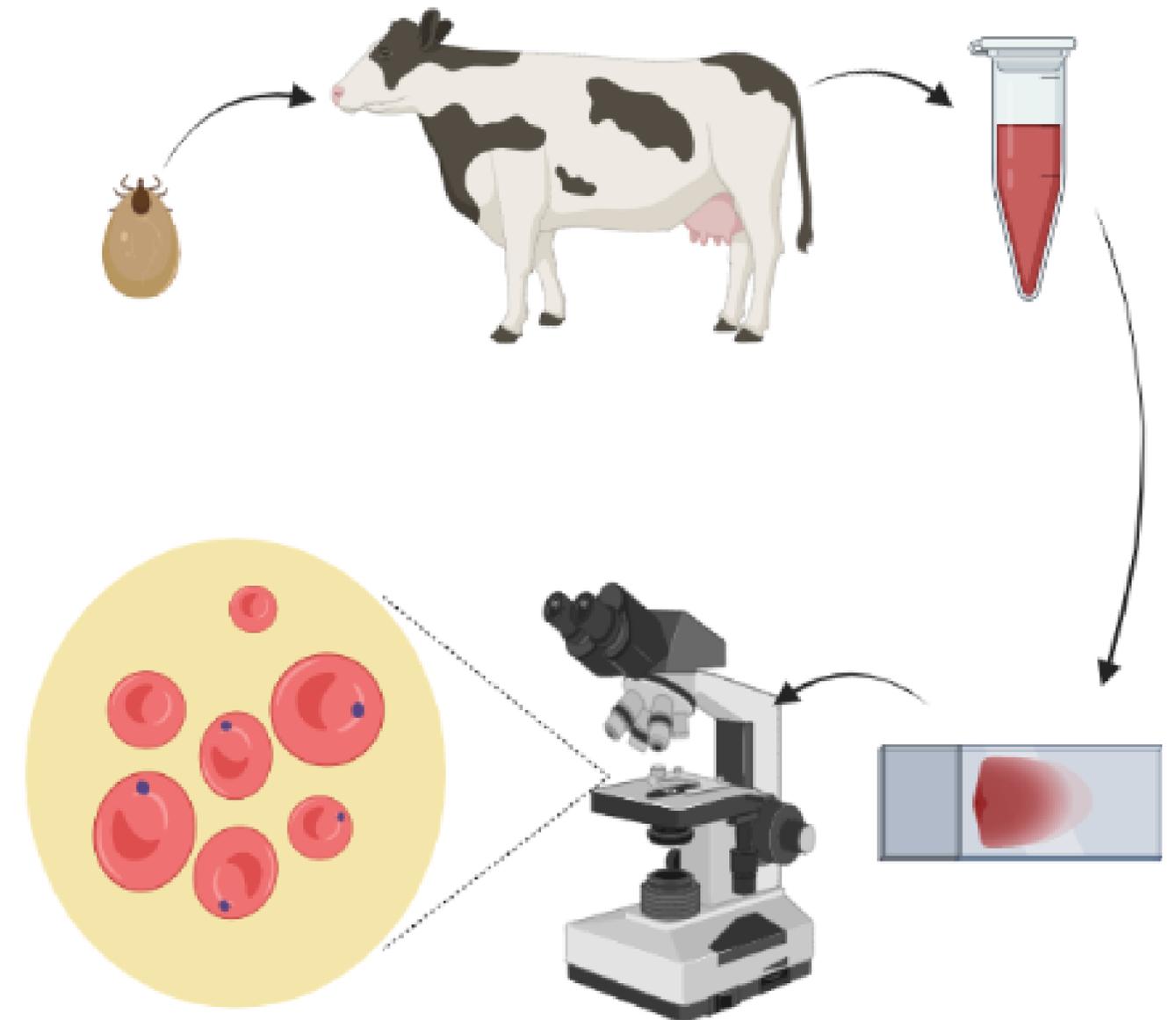
“Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido. Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos”.

- Marie Curie

Introducción

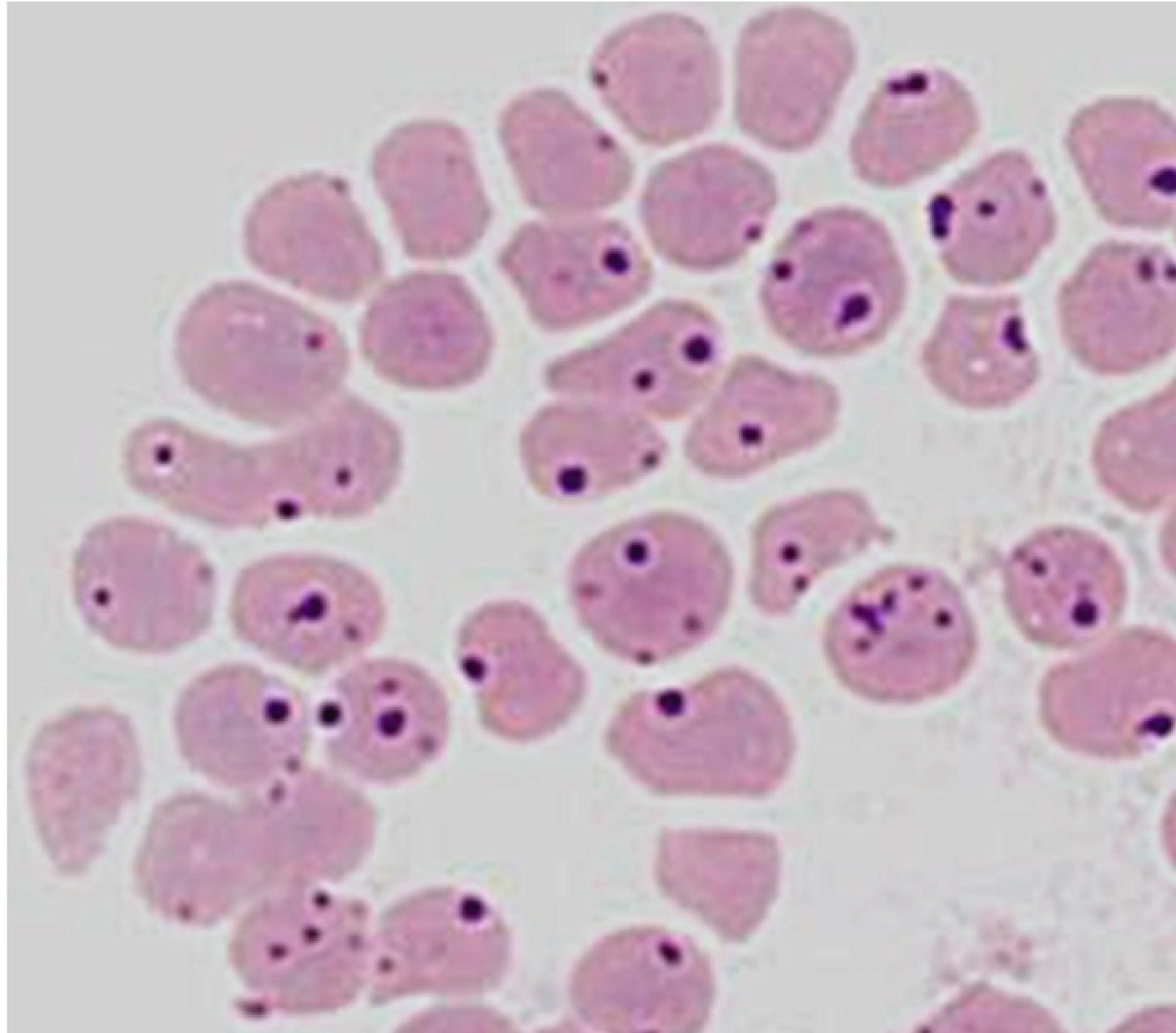
La anaplasmosis bovina, se ha reportado desde 1910 en zonas tropicales y subtropicales, provocando pérdidas de ganado

- Bacteria intraeritrocitaria.
- Vector: garrapatas.
- Afecta al ganado adulto en su mayoría.
- Pruebas de diagnóstico insuficientes.



Justificación

- Diagnóstico con Tinción Giemsa en animales con clínica y con PCR, en Ecuador.
- Inexistencia de una prueba comercial de ELISA
- MSP5 altamente antigénica
- Inexistencia de estudios de AVIDEZ



Frotis con eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* teñidos con Giemsa, obtenido de: (S. Rodríguez et al., 2003).

Objetivos

General

Estandarizar una prueba de ELISA utilizando la *MSP5* como antígeno, para determinar la avidéz de anticuerpos anti *Anaplasma marginale*

Específicos.

- 1 Obtener una población de E.coli recombinante genéticamente idéntica que exprese la proteína *MSP5*
- 2 Purificar la proteína *MSP5* de E. coli recombinante, para su uso como antígeno en la prueba de ELISA, por medio de herramientas de Proteómica.
- 3 Determinar la avidéz de anticuerpos anti *Anaplasma marginale* de sueros bovinos, mediante la prueba de ELISA estandarizada

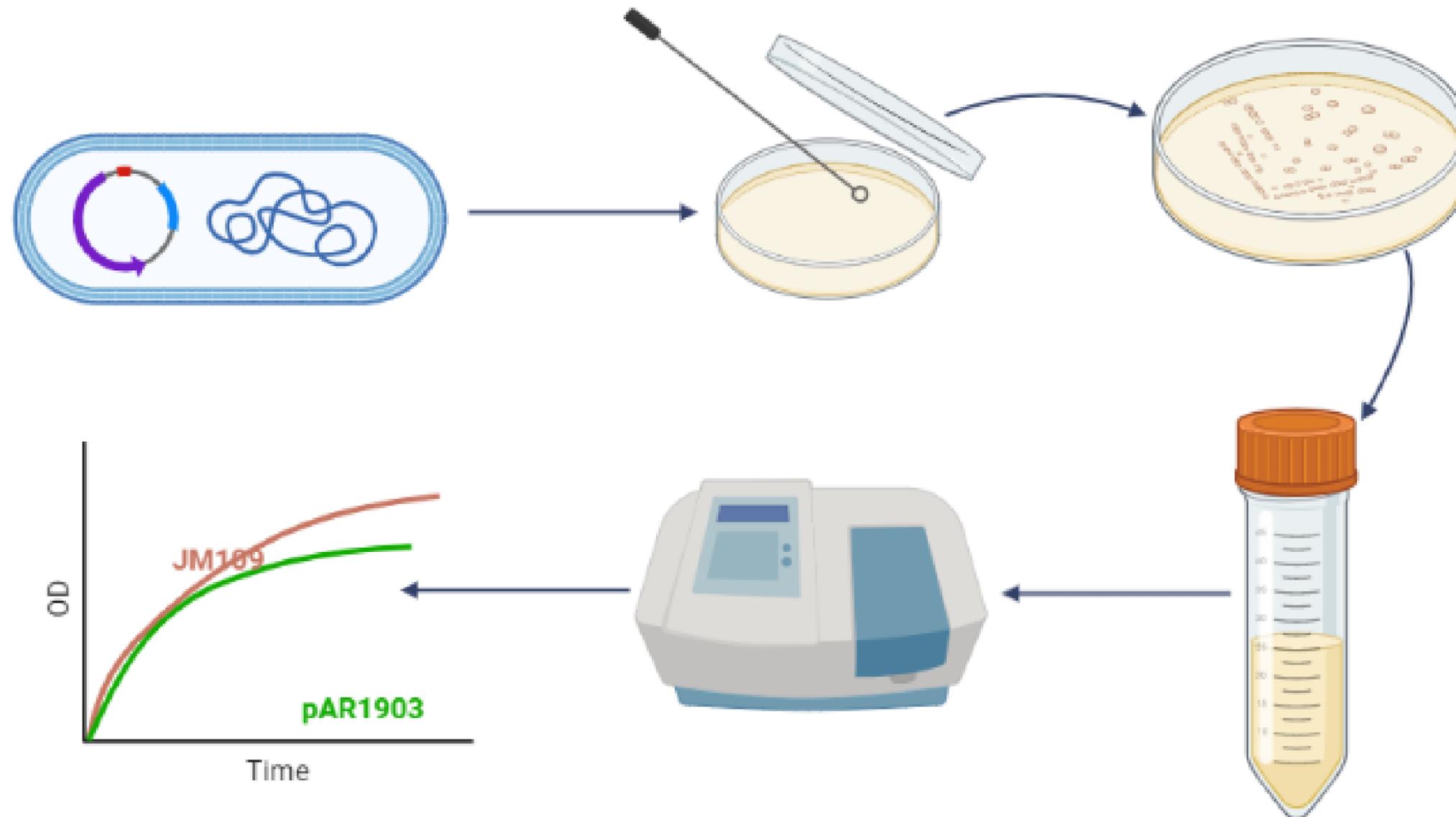
Hipótesis

Estandarización de ELISA *in house* IgG anti- *MSP5*

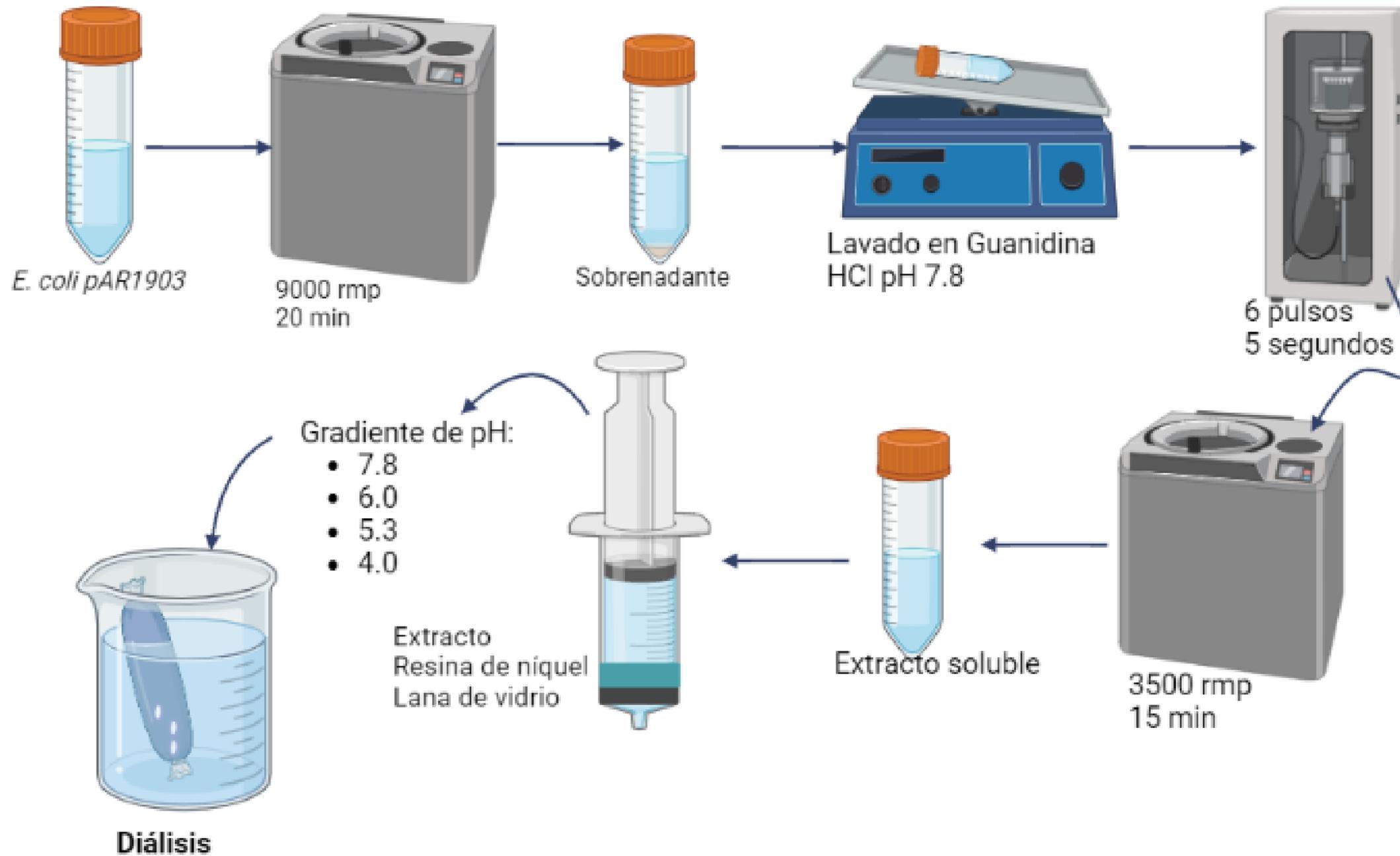
- Concentración de antígeno.
- Concentración de Sueros.
- Pre incubación.

Avidez de los anticuerpos anti-IgG.

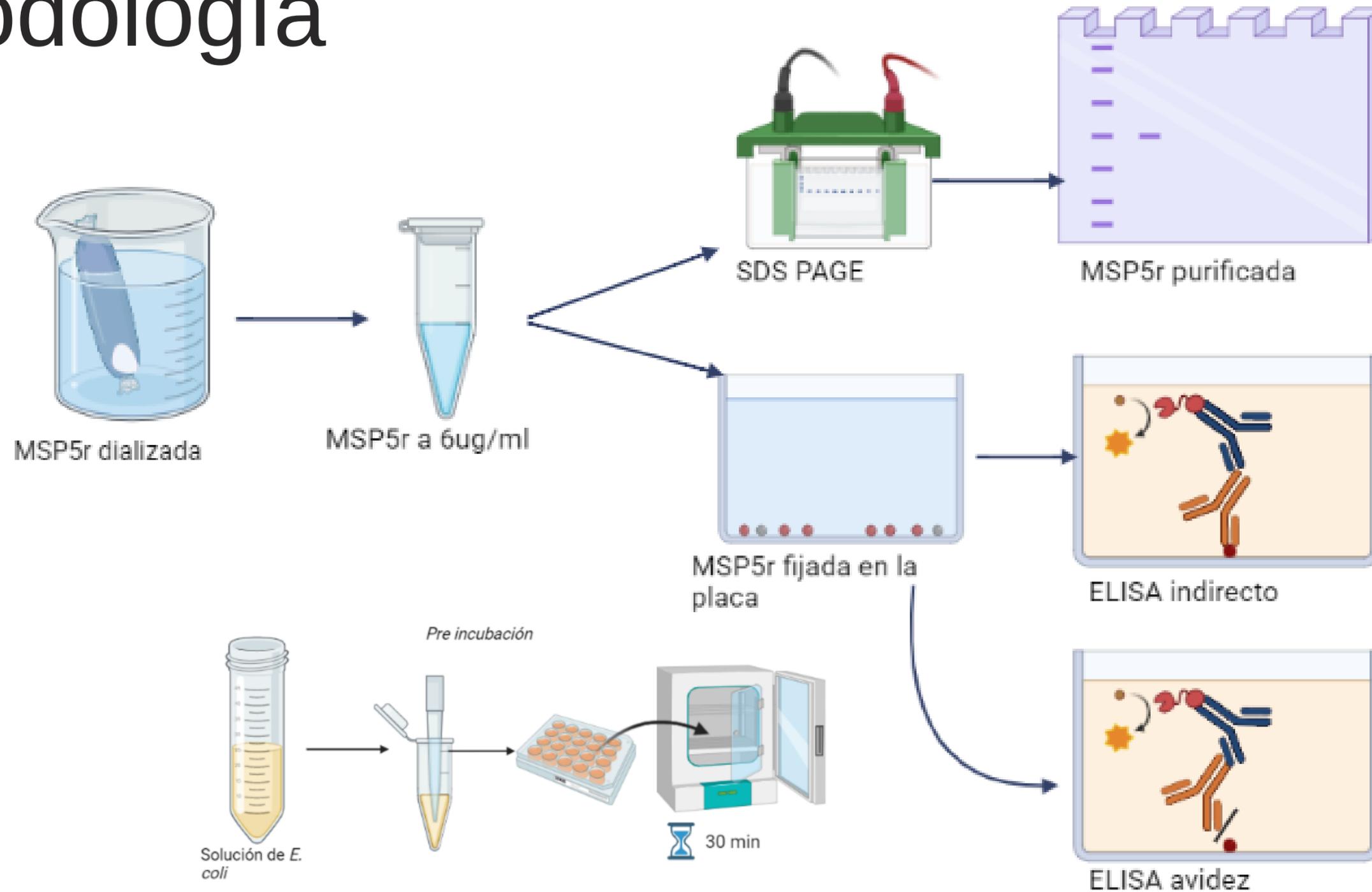
Metodología



Metodología



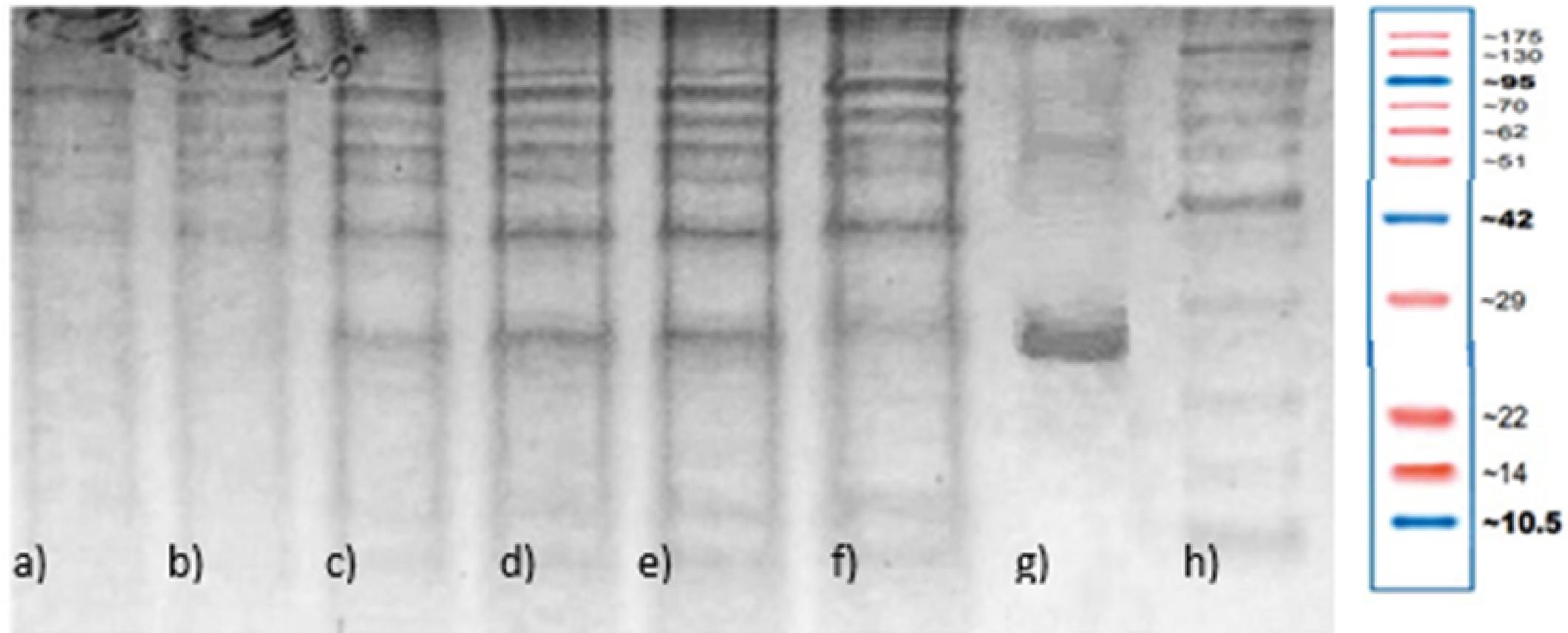
Metodología





Resultados

Proteínas en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE



a) Cepa JM109 de *E. coli*, b) colonia 1 de pAR1903, c) colonia 2 de pAR1903, d) colonia 3 de pAR1903, e) colonia 4 de pAR1903, f) colonia 5 de pAR1903, g) MSP5 purificada, h) marcador de peso molecular ABM opti.

Estandarización de la prueba ELISA IgG anti-*MSP5r*



a)

b)

c)

a) Suero Fetal Bovino (FBS), b) leche descremada, c) Albumina de suero bovino (BSA).

Densidad óptica obtenida con las diferentes soluciones de bloqueo.

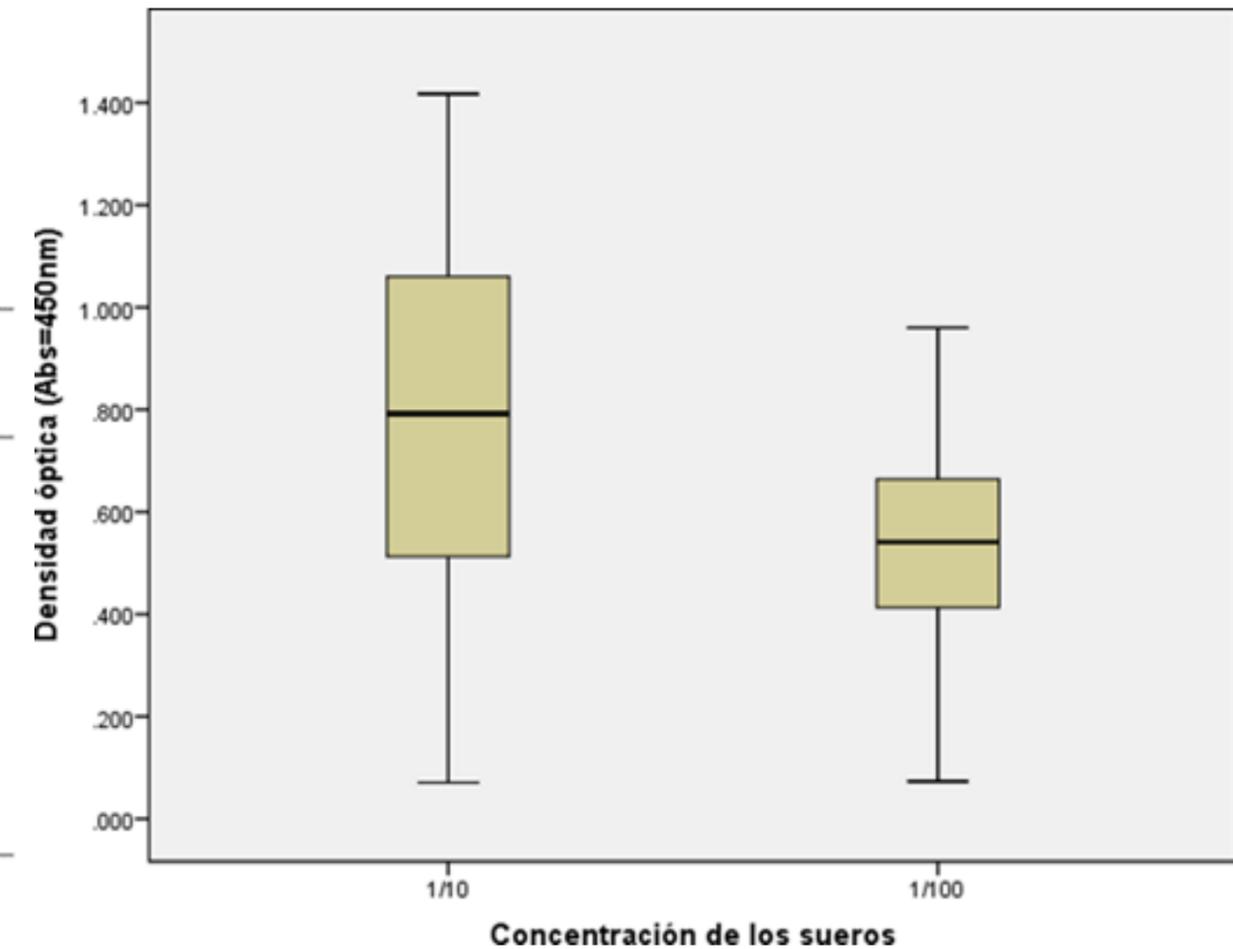
Numero de colonia	Densidad óptica promedio	Densidad óptica del control
Suero Fetal Bovino FBS	1.213	0.187
Albumina de Suero Bovino BSA	1.613	0.294
Leche Descremada	1.373	0.901

Estandarización de la prueba ELISA IgG anti-*MSP5r*

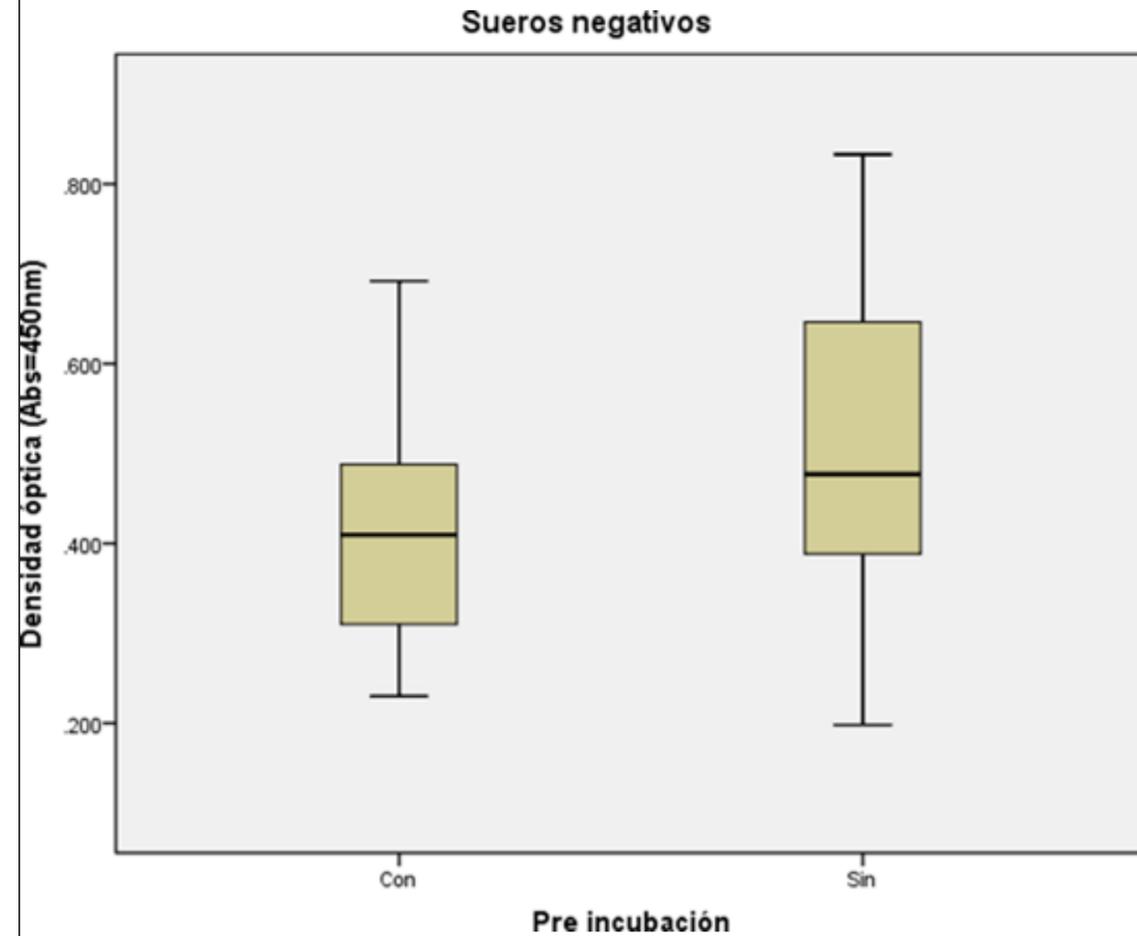
Análisis de varianza para la Densidad óptica (Abs=450nm) obtenida para las diferentes concentraciones de antígeno y sueros.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-calculado	p-value
Modelo	5	0.50	0.10	3.38	0.0252
Concentración de antígeno (A)	2	0.02	0.01	0.32	0.7336
Concentración de sueros (B)	1	0.43	0.43	14.52	0.0013
AXB	2	0.05	0.03	0.87	0.4376
Error	18	0.53	0.03		
Total	23	1.02			

Nota. Se consideró una significancia del 95%.



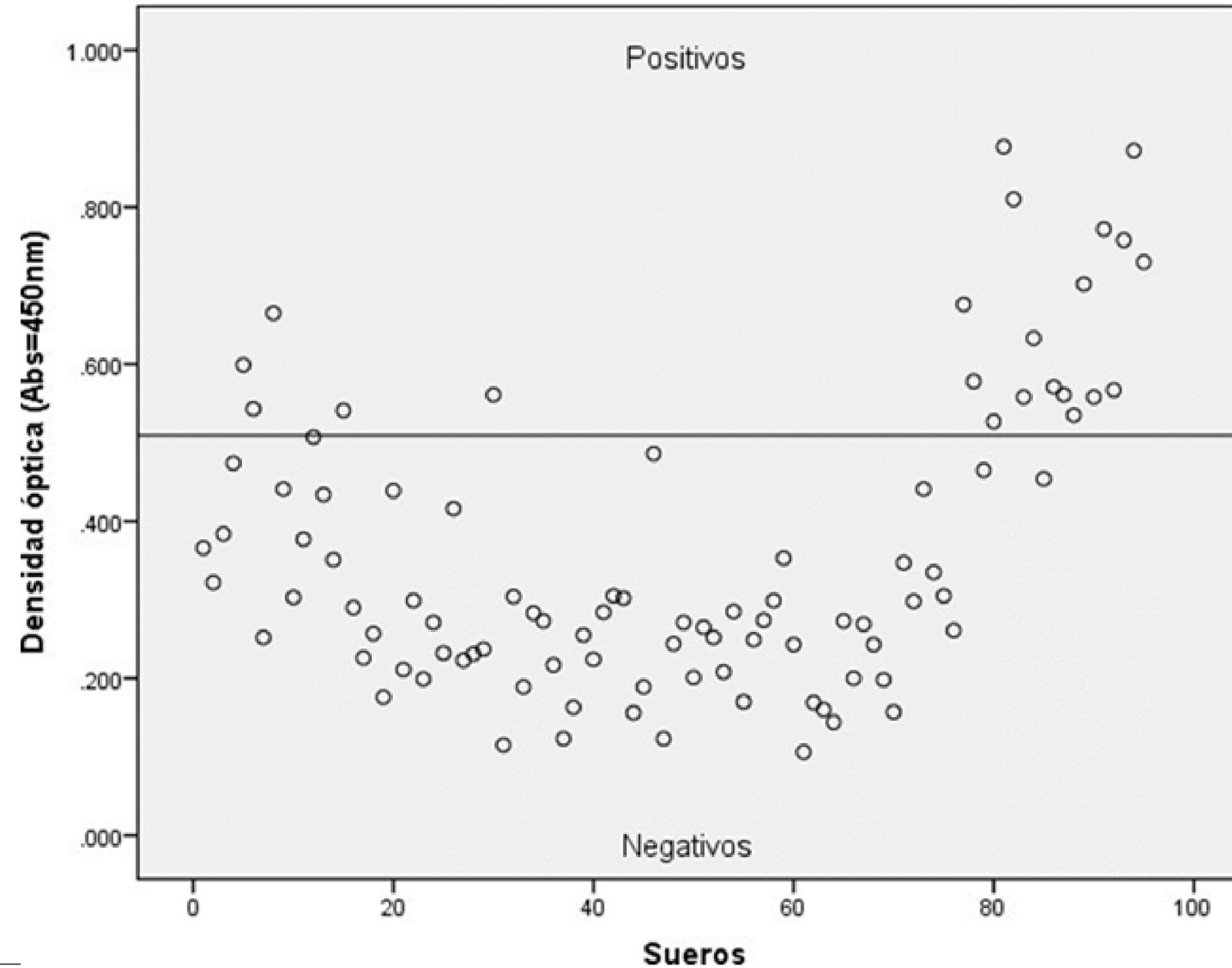
Estandarización de la prueba ELISA IgG anti-*MSP5r*



Prueba de T para la Densidad óptica (Abs=450nm) obtenida con y sin pre- incubación

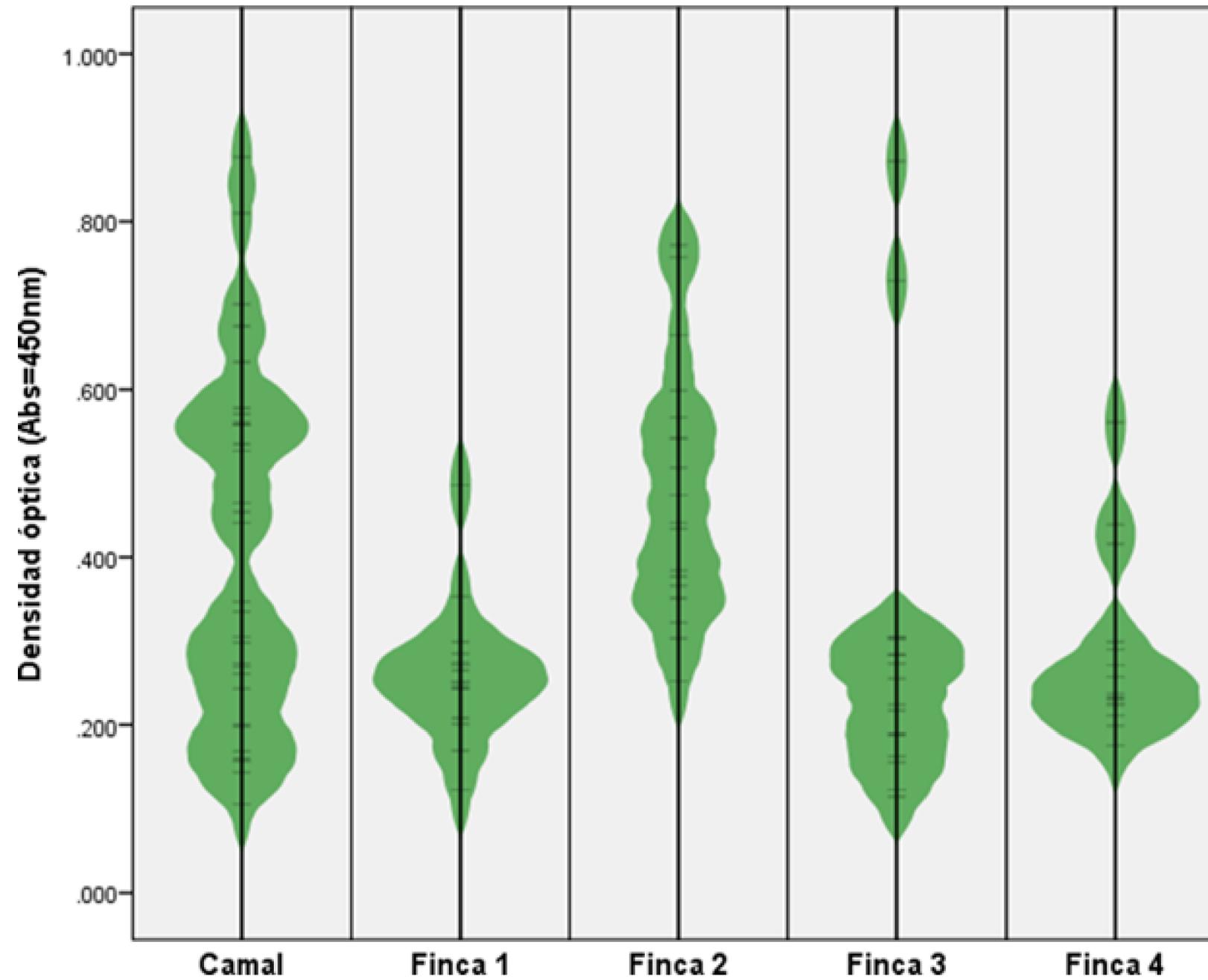
Número de colonia	Media	Desviación estándar	T	p-value
Sin pre-incubación	0.51	0.20	7.17	0.0002
	1.13	0.22	10.42	0.00019
Con pre-incubación	0.42	0.15	8.01	0.0020
	1.02	0.22	9.17	0.0027

Punto de corte de la prueba

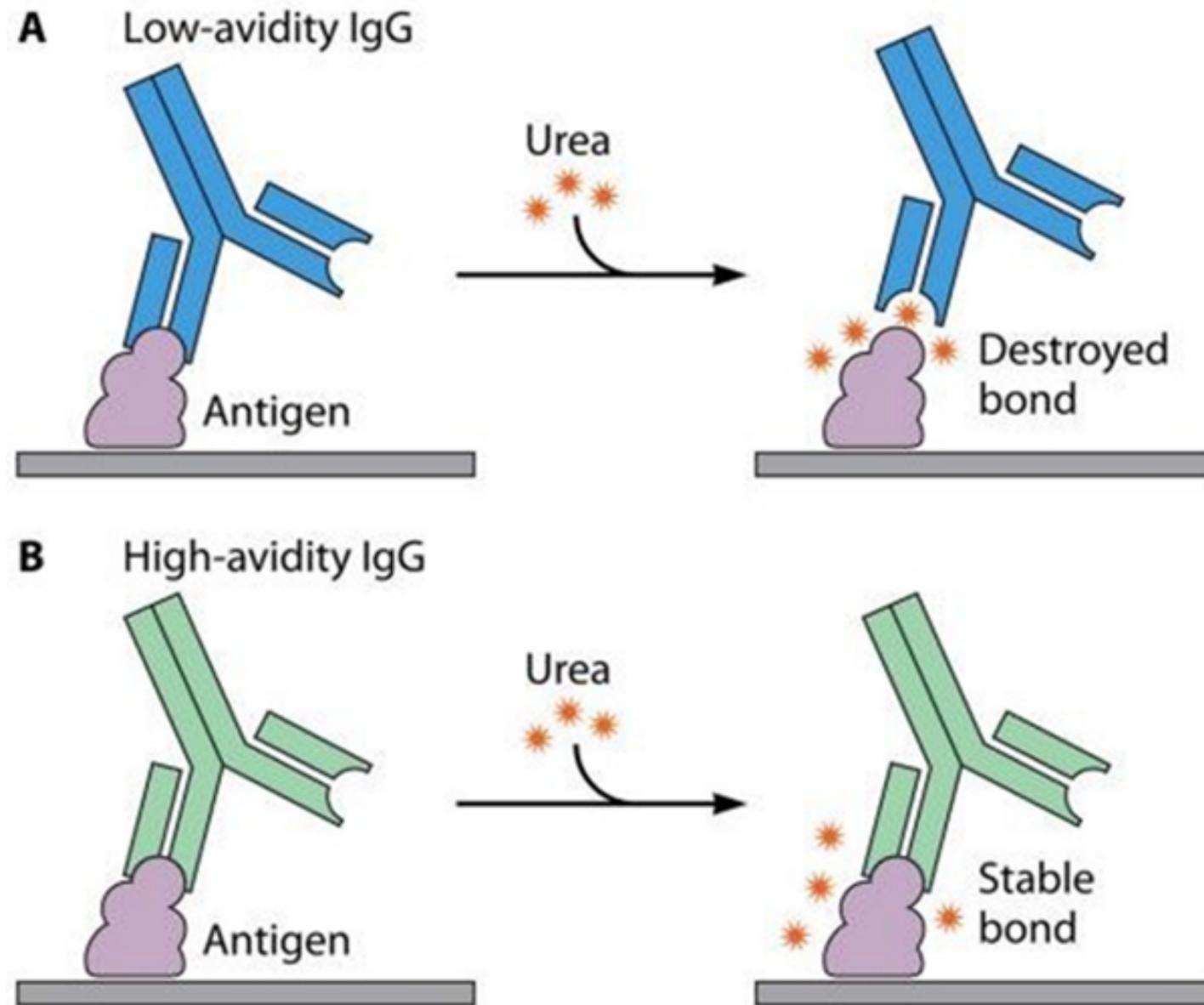


Se clasificó los sueros positivos y negativos a partir del punto de corte 0.509.

Positividad de los sueros de acuerdo a las zonas de obtención



Avidez de los anticuerpos IgG anti-*MSP5*

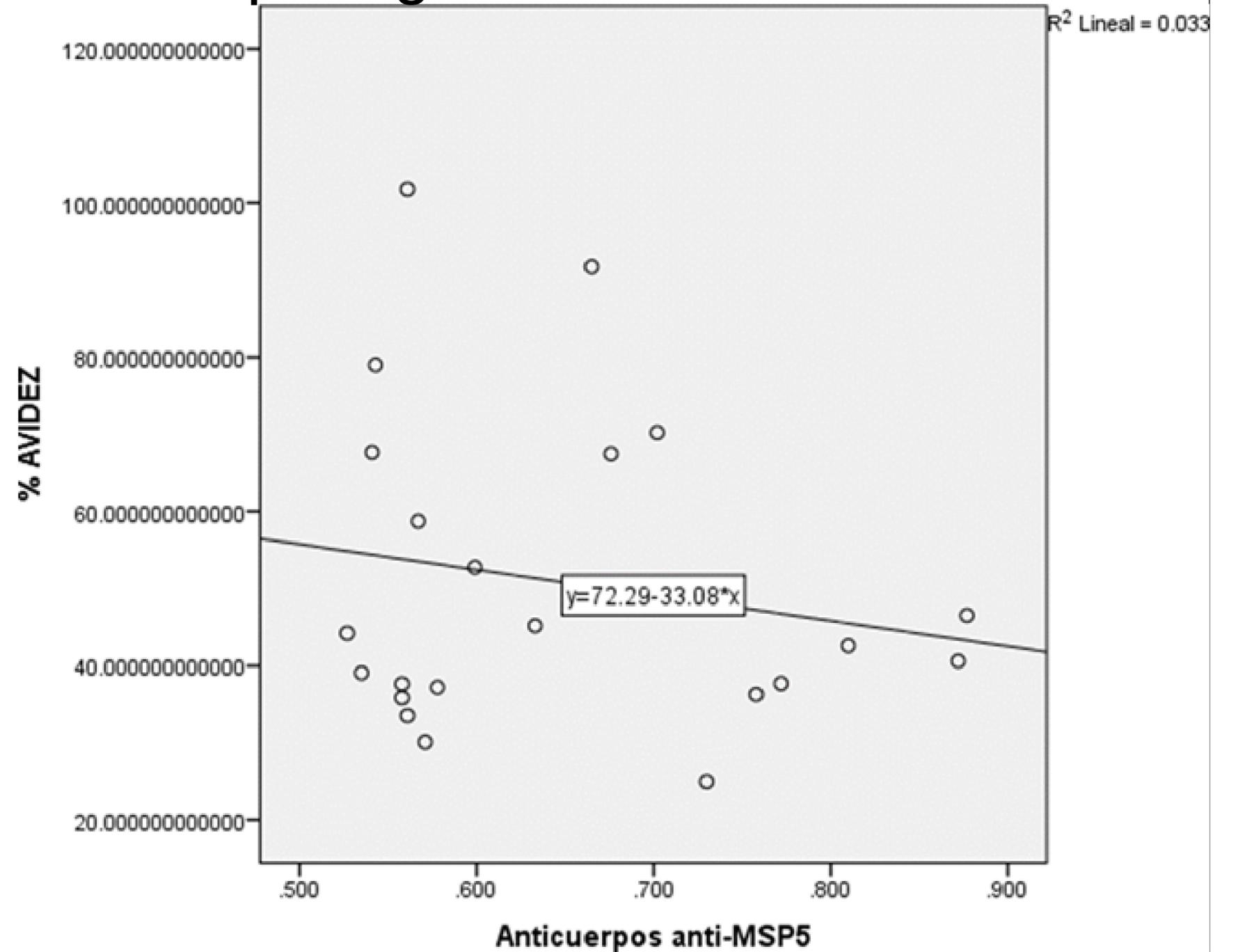


Se obtuvo un valor de avidéz de 50.317 %.

(Menu et al., 2021).

Avidez de los anticuerpos IgG anti-MSP5

Correlación de la D.O y el índice de avidez

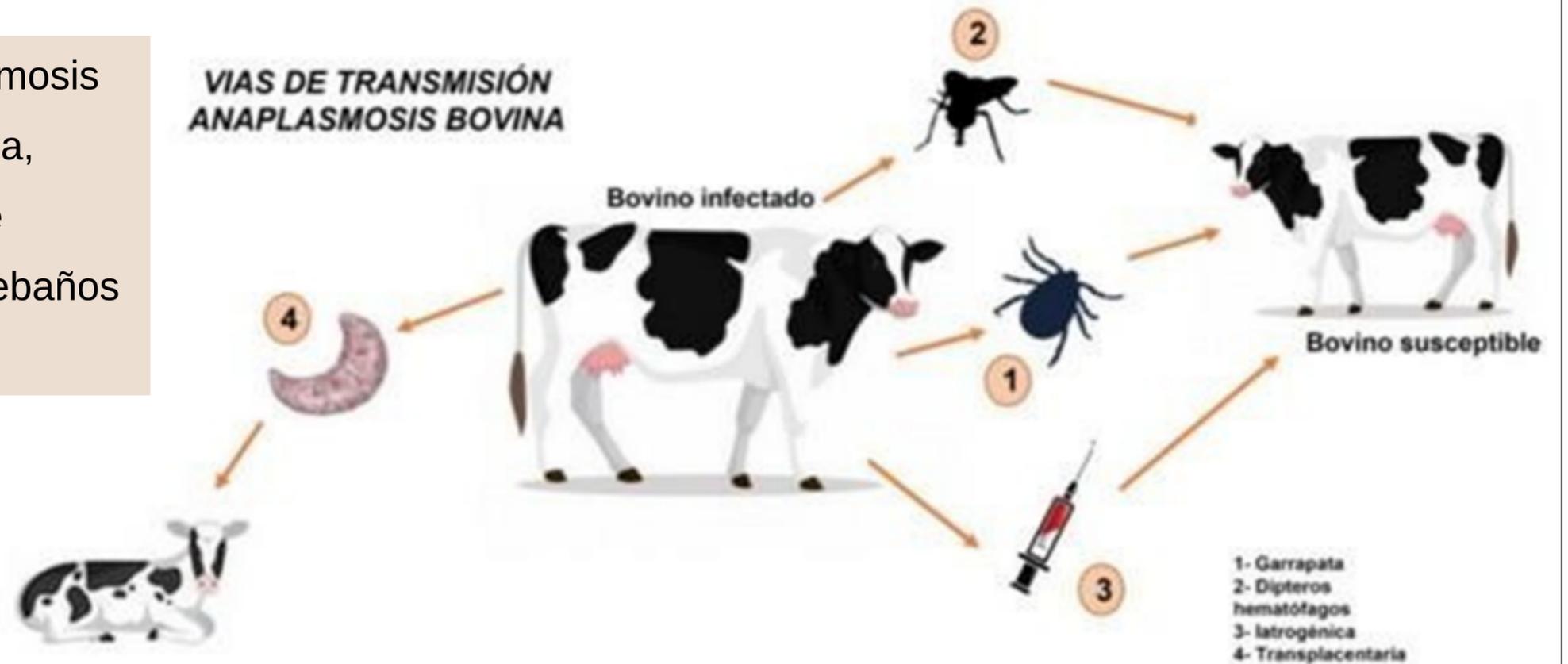




Discusión

Positividad

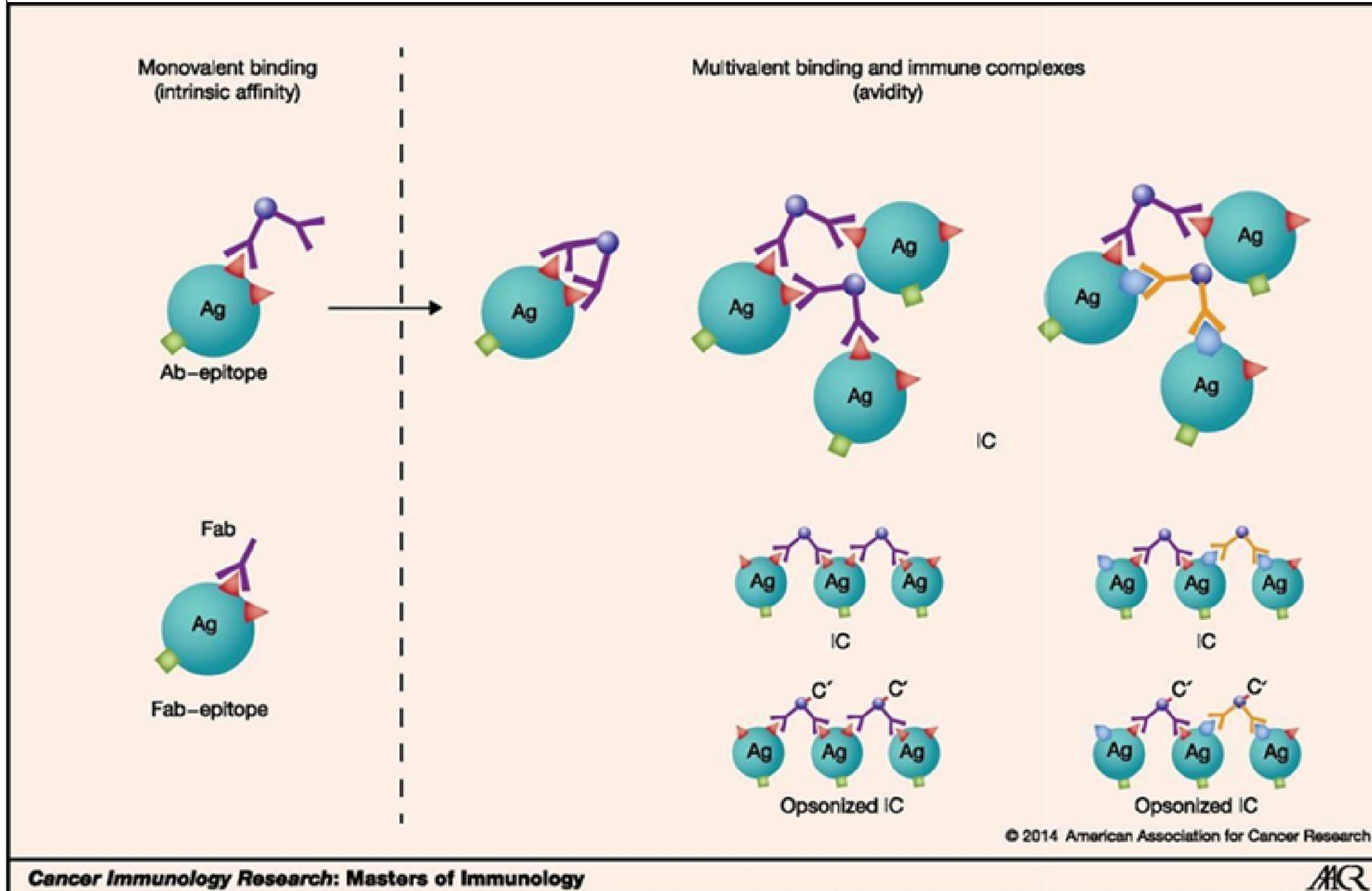
La dinámica de transmisión de anaplasmosis bovina es acelerada en función del clima, causando pérdidas con un 30% más de desechos y mortalidad, en adultos de rebaños no infectados previamente.



La transmisión de hospedadores positivos en regiones sin vectores de la enfermedad, se da principalmente por transmisión mecánica y movilización indiscriminada de animales

Silva Silveira, Caroline Parodi et al., (2022)

Avidez



Los animales que resultaron positivos tienen una infección antigua.

La avididad de IgG contra *A. marginale* será mayor en hatos donde la enfermedad es endémica.



Conclusiones

Conclusiones

- Se realizó la producción biotecnológica de MSP5 de aproximadamente 22KDa a partir de la cepa pAR1903
- Se demostró que pre incubar los sueros influye en la densidad óptica obtenida, mejorando la prueba de ELISA, evitando las reacciones cruzadas y por lo tanto los falsos positivos.
- El punto de corte se estableció de acuerdo a los sueros de la finca 1.

Conclusiones

La prueba de ELISA se estandarizó utilizando:

- 50µL/pocillo de MSP5r a 6µL/mL,
- Suero Fetal Bovino como bloqueo
- 1/100 por pocillo de sueros
- Temperatura de incubación de 37°C, a una velocidad de 25rpm y un tiempo de una hora en el antígeno, la solución de bloqueo y los sueros pre incubados
- El conjugado se incubó por 30 minutos
- El sustrato TMB, este se incubó a temperatura ambiente, sin agitación y en oscuridad por 15 minutos.

Conclusiones

La movilización indiscriminada se mostró como la causa de la presencia de sueros positivos en regiones donde no hay vectores para Anaplasma.

Se encontró un valor de avidéz promedio de 50,317% indicando que la infección en gran parte de los animales que se estudiaron no era reciente

El diagnóstico a partir de la avidéz de los anticuerpos permite diferenciar entre una infección reciente o antigua, de modo que en un hato ganadero, podría ayudar a conocer si la enfermedad es endémica o no, considerando que cuando se infecta animales mayores a 2 años, la anaplasmosis puede llegar a ser mortal.



Recomendaciones

Recomendaciones

- Después de la producción de MSP5r, se recomienda alicuotar la proteína.
- Para validar la prueba de ELISA es importante tener sueros que sean de una zona que no tenga prevalencia de anaplasmosis bovina.
- Se recomienda realizar la pre incubación de los sueros con E. coli, para evitar las reacciones cruzadas en la prueba de ELISA.
- Además, se recomienda ampliar el diagnóstico de anaplasmosis bovina y la determinación de la avidéz con sueros de más regiones del país, con la finalidad de tener la prevalencia de esta enfermedad y a su vez un mejor control.



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Muchas gracias

2022

Dedicatoria

A Rosa, Franco, Vanessa y Franco Eduardo



Agradecimientos

- A Armando Reyna-Bello
- A Gustavo Echeverría
- A Jose Rubén Ramírez de la Universidad Internacional SEK, por su aporte de material biológico.
- A Ana Poveda, Elizabeth Minda-Aluisa y Milena Díaz, por sus enseñanzas y por su aporte de recursos y equipos para la realización de este trabajo.
- A Maritza Celi, Sandra Enríquez y demás personal del Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador, por su apoyo incondicional.
- Al Instituto de Investigación en Zoonosis (CIZ) y la Universidad Central del Ecuador por su apertura, colaboración y trabajo conjunto en el desarrollo de la tesis.
- A Gustavo Echeverría, Alisson Mera-Ruíz y Yasmín Rodríguez de BioGENA por donar su espacio y recursos para la continuidad de este trabajo.

Agradecimientos

- A Nathaly, Yessenia, Christian, Eduardo, Anabel, Rubén, Alejandra, Marianita, Andrea, Camily y Cecibel, su compañía y apoyo en mi etapa universitaria ha sido incondicional y un impulso para seguir adelante
- A mis colegas Xiomira, Karla y Yasmín, por su ayuda en la estandarización de protocolos, por sus consejos y su amistad.
- A Jhaniela, Jasiel y Daniel, amigos de la vida, por siempre estar presentes.
- A Hugo por su apoyo incondicional y sus consejos académicos, gracias por siempre despejar mis dudas.
- A Brandon, Boris, José Andrés, Alejandra, Wendy, Diana, Jairo, Cristian y María Paula, por su amistad y apoyo a lo largo de mi vida universitaria.
- A mis amigos, Jamileth, Victor, Alexander, Jessica, Daniela, Kerly, Odalis, Ana, Mateo, Israel y José Luis por hacer que este proceso sea ameno, por su apoyo y por su compañía.