

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

Cobos Paladines, Evelyn Alejandra

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Ph.D. Reyna Bello, Armando

22 de Agosto del 2022

Reporte de verificación de contenido



Firma:



ARMANDO
REYNA

Armando Reyna Bello, Ph.D.

C. C.: 1758891830

Director de proyecto de Investigación



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA


CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, "Estandarización de una prueba de ELISA utilizando la MSP5 para determinar la avidéz de anticuerpos en *Anaplasma marginale*" fue realizado por la señorita Cobos Paladines Evelyn Alejandra el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto de 2022

Firma:



ARMANDO
REYNA

Armando Reyna Bello, Ph.D.

C. C.: 1758891830

Director de proyecto de Investigación



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGROPECUARIA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Responsabilidad de Autoría

Yo, **Cobos Paladines Evelyn Alejandra**, con cédula de ciudadanía N° 1105536989, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **“Estandarización de una prueba de ELISA utilizando la MSP5 para determinar la avidéz de anticuerpos en *Anaplasma marginale*”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto de 2022

Firma



Cobos Paladines, Evelyn Alejandra

C.C.: 1105536989



**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y AGROPECUARIA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

Autorización de Publicación

Yo, **Cobos Paladines Evelyn Alejandra** con cédula de ciudadanía N° 1105536989, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Título: "Estandarización de una prueba de ELISA utilizando la MSP5 para determinar la avidéz de anticuerpos en *Anaplasma marginale*"**, en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Santo Domingo de los Tsáchilas, 22 de agosto de 2022

Firma

.....
Cobos Paladines, Evelyn Alejandra

C.C.: 1105536989

Dedicatoria

A mi mamá y papá, Rosa y Franco, por todo su amor, su apoyo y confianza, a Vanessa y Franco Eduardo, por ser mi inspiración y ejemplo de vida. Todo es y será siempre por y para ustedes. Les amo y admiro.

A mis abuelas y abuelos, porque en ustedes encuentro motivación, paz y amor infinito.

A Jhaniel, por su amistad y apoyo, que han sido un pilar fundamental en mi vida.

A Luna y Chiquita, mis leales compañeras de vida, por su amor incondicional.

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

Marie Curie

Agradecimientos

A Rosa, Franco, Vanessa y Franco Eduardo, sin ustedes ningún logro sería posible.

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 mi familia entera, por creer en mí y por su apoyo.

A mi mentor, Armando Reyna-Bello, por su confianza, apoyo, su amistad y su guía desde que empecé la universidad.

A Gustavo Echeverría, por su asesoramiento, por la financiación y su apoyo en este trabajo de investigación.

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.

A Pedro, Armando, Santiago, Natasha y Gisella por todo el conocimiento impartido.

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.

Índice de contenidos

Carátula	1
Reporte de verificación de contenido	2
Certificación	3
Responsabilidad de autoría.....	4
Autorización de publicación.....	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenidos.....	9
Listado de Tablas	13
Listado de figuras.....	14
Listado de abreviaturas.....	15
Resumen.....	16
Abstract	17
Capítulo I: Introducción	18
Formulación del Problema.....	18
Justificación del problema	20
Objetivos de la Investigación	22
Objetivo General.....	22
Objetivos Específicos.....	22
Hipótesis	23
Estandarización de ELISA in house IgG anti-MSP5	23

	10
Capítulo II: Marco teórico	24
Historia	24
Género <i>Anaplasma</i>	25
<i>Anaplasma marginale</i> en América Latina	26
Características de <i>Anaplasma marginale</i>	27
Morfología	27
Composición y estructura	28
Taxonomía de <i>Anaplasma marginale</i>	29
Hábitat, transmisión y diagnóstico.....	29
Proteína principal de superficie 5 MSP5	31
Características de la MSP5	31
Avidéz de anticuerpos.....	32
ELISA indirecto de avidéz	33
Capítulo III: Materiales y métodos	35
Material biológico	35
Cultivo de <i>E. coli</i> recombinante	35
Curva de crecimiento de <i>E. coli</i>	35
Obtención de la proteína	36
Inducción de la proteína	36
Gel de poliacrilamida SDS-PAGE	36
Obtención del extracto soluble.....	37

	11
Purificación de MSP5	37
Estandarización de la prueba ELISA anti-IgG bovino.	38
Concentración de MSP5 y de los sueros.	38
Pre-incubación	38
ELISA anti-IgG bovino	39
Determinación del punto de corte	39
ELISA de avidéz-anti-IgG bovino.....	40
Determinación de la avidéz de los anticuerpos anti-IgG bovino	40
Análisis Estadístico	41
Diseño experimental	41
Variable a medir	42
Diseño no experimental	42
Variable respuesta	42
Error aleatorio.....	42
Capítulo IV: Resultados	43
Cinética de desarrollo de <i>E. coli pAR1903</i> y <i>E. coli JM109</i>	43
Identificación de la proteína	44
Purificación de la proteína	44
Estandarización de ELISA	46
Buffer de bloqueo.	46
Concentración de antígenos.	47

	12
Concentración de sueros	47
Pre incubación de sueros	49
Selección de sueros.....	51
Finca 1.....	52
Finca 2.....	52
Finca 3.....	52
Finca 4.....	52
Camal.....	53
Punto de corte de la prueba	53
Positividad.....	54
Avidez de anticuerpos.....	57
Capítulo V: Discusión	58
ELISA anti-MSP5.....	58
Pre incubación	58
Positividad	59
Avidez	60
Capítulo VI: Conclusiones.....	62
Capítulo VII: Recomendaciones	64
Capitulo VIII: Bibliografía	65

Listado de Tablas

Tabla 1	Esquema del análisis de varianza utilizado	41
Tabla 2	Esquema de la Prueba de T utilizada	41
Tabla 3	Mejores candidatos para la producción de antígenos.....	44
Tabla 4	Densidad óptica obtenida con las diferentes soluciones de bloqueo.....	46
Tabla 5	Análisis de varianza para la Densidad óptica (Abs=450nm) obtenida para las diferentes concentraciones de antígeno y sueros.....	48
Tabla 6	Prueba de T para la Densidad óptica (Abs=450nm) obtenida con y sin pre- incubación	50

Listado de figuras

Figura 1. <i>Anaplasma marginale</i>	27
Figura 2 <i>Secuencia completa de Anaplasma marginale</i>	28
Figura 3 <i>Transmisión de anaplasmosis bovina</i>	30
Figura 4 <i>Proteína MSP5 3D</i>	31
Figura 5 <i>Avidez de los anticuerpos</i>	32
Figura 6 <i>Efecto de la Urea en el complejo de unión antígeno-anticuerpo</i>	34
Figura 7 <i>Curva de crecimiento de E. coli</i>	43
Figura 8 <i>Proteínas en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE</i>	45
Figura 9 <i>Soluciones de bloqueo</i>	47
Figura 10 <i>Diagrama de cajas para la concentración de los sueros</i>	49
Figura 11 <i>Diagrama de cajas del ensayo de Pre incubación de sueros negativos</i>	51
Figura 12 <i>Punto de corte de la prueba</i>	54
Figura 13 <i>Diagrama de violín de la densidad óptica obtenida por cada grupo de muestras.</i>	56
Figura 14. <i>Correlación entre la avidéz y la densidad óptica obtenida en el ELISA IgG anti-MSP5</i>	57

Listado de abreviaturas

ELISA:	Ensayo inmunoenzimático
MSP5:	Proteína principal de Superficie 5
MSP5r	Proteína principal de Superficie 5 recombinante
IgG:	Inmunoglobulina G
ELISA IgG anti-MSP5:	ELISA para detectar anticuerpos IgG anti MSP5
AI:	Índice de avidéz
IPTG:	Isopropi.-B-D-1-tiogalactopiranósido
TSA:	Agar Triptona-Soja
TSB:	Caldo Triptona-soja
PBS:	Tampón Fosfato Salino
PBS-T:	PBS-Tween 20
TMB:	3,3',5,5'- Tetrametilbencidina
FBS:	Suero Fetal Bovino
BSA:	Albumina de suero bovino
D.O:	Densidad óptica
D.E:	Desviación estándar
NCBI:	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
MB:	Mega Bases
KDa:	Kilo Daltons
WOAH:	Organización Mundial de Sanidad Animal
CIZ:	Instituto de investigación en Zoonosis
mL:	Militro
µL:	Microlitro

Resumen

Anaplasma marginale es una bacteria intraeritrocítica causante de la anaplasmosis bovina, esta enfermedad se ha reportado desde 1910 en zonas tropicales y subtropicales, provocando pérdidas de ganado y por lo tanto pérdidas económicas en esta industria, considerando estos antecedentes, se vuelve necesario su control y tratamiento adecuados, a partir de métodos de diagnóstico que determinen el estado de la enfermedad. En este contexto, el presente estudio se realizó con el objetivo de realizar la producción biotecnológica de la proteína MSP5 recombinante (MSP5r) para utilizarla como antígeno en la prueba de ELISA indirecto y evaluar la avidéz de los anticuerpos IgG anti *Anaplasma marginale*. A partir de la *E. coli* contentiva del plásmido *pAR1903* que posee el gen *msp5* de *A. marginale*, se indujo la producción de esta proteína y se la purificó, luego se estandarizó a la prueba de ELISA mediante la evaluación de las diferentes concentraciones del antígeno (0,3uL/mL, 0.6uL/mL y 1uL/mL), y de los sueros (1/10 y 1/100); luego, se comparó soluciones de bloqueo de Suero Fetal Bovino, Albúmina de Suero Bovino y Leche descremada, posterior a ello, se probó pre incubar los sueros con *E. coli*. Se determinó el punto de corte con 15 sueros de una zona libre de anaplasmosis; posterior a ello se realizó la prueba de ELISA avidéz IgG, utilizando UREA 6M como agente caotrópico. Como resultado se obtuvo la proteína MSP5 purificada y se la utilizó a una concentración de 0.6ul/ml en cada pocillo, se determinó una concentración óptima de sueros de 1/100. Como solución de bloqueo se comprobó que FBS otorga un mejor recubrimiento, posteriormente se determinó la necesidad de pre-incubar a los sueros con *E. coli*, para eliminar las reacciones cruzadas por proteínas inespecíficas. Finalmente se obtuvo una avidéz alta de los anticuerpos con un promedio de 50.317 %. Este ensayo permitió estandarizar la prueba de ELISA usando la MSP5r para determinar la avidéz de anticuerpos durante la infección de *A. marginale*, lo que permitirá en futuras investigaciones evaluar si la infección es reciente o no, ofreciendo mejores resultados a médicos veterinarios, agro-técnicos e investigadores.

Palabras Clave: ELISA, MSP5, MSP5r, avidéz.

Abstract

Anaplasma marginale is an intraerythrocytic bacterium that causes bovine anaplasmosis. This disease has been reported since 1910 in tropical and subtropical areas, causing livestock losses and therefore economic losses in this industry. Considering these antecedents, an adequate control and treatment become necessary, through diagnostic methods that determine the state of the disease. In this context, the present study was carried out with the objective of perform the biotechnological production of the MSP5 protein to use it as an antigen in the indirect ELISA test to evaluate the avidity of the IgG antibodies anti-*Anaplasma marginale*. As of *E. coli* pAR1903, the production of MSP5 was induced and purified, then ELISA test was standardized by evaluating the different protein concentrations (0.3uL/mL, 0.6uL/mL and 1uL /mL), and the sera dilutions (1/10 and 1/100); then, blocking solutions of Bovine Fetal Serum, Bovine Serum Albumin and Skimmed Milk were compared, after that the pre-incubation of the sera with *E. coli* was tested. The cut-off point was evaluated with 15 sera from an anaplasmosis-free zone; subsequently, the IgG avidity ELISA test was performed, using 6M UREA as a chaotropic agent. As a result, the purified MSP5 protein was obtained and a concentration of 0.6ul/ml was used in each well, an optimal concentration of sera of 1/100 was assumed, also, it was found that FBS provides a better coating as a blocking solution. Afterward, it was demonstrated the need to preincubate the sera with *E. coli* to eliminate cross-reactions due to non-specific proteins. Finally, a high avidity of the results was obtained with an average of 50.317%. This assay allowed to standardize the ELISA's test using the MSP5r to determine the avidity of antibodies during the infection of *A marginale*, which allows to evaluate if the infection is recent or not, giving better results to vets, agro-technicians and investigators.

Key Words: ELISA, MSP5, MSP5r, avidity.

Capítulo I: Introducción

Formulación del Problema

Se ha reportado que el 80% de la población de bovinos a nivel mundial se ve afectada por enfermedades causadas por garrapatas, estas son vectores de patógenos que circulan en ciclos enzooticos hacia hospedadores vertebrados; un claro ejemplo de estos patógenos es *Anaplasma marginale*, una rickettsia Gram-negativa causante de la anaplasmosis bovina, una enfermedad eritrocítica persistente en regiones tropicales y subtropicales como América central, Sudamérica, Sureste de Europa, Asia y Australia (Rochlin & Toledo, 2020; World Organization of Animal Health, 2015).

El impacto de la anaplasmosis en los animales depende de las comorbilidades presentes en estos, de infecciones con otros patógenos, del estado inmunitario y de la edad, siendo los terneros más resistentes, al punto de no generar clínica, de este modo las pérdidas en áreas endémicas son mínimas, sin embargo, cuando se produce movilización de animales a lugares libres de la enfermedad, la transmisión causa pérdidas severas de ganado adulto (Tabar, 2022).

De acuerdo a la Organización Mundial de Sanidad Animal (WOAH) (2015), la anaplasmosis bovina provoca anemia, ictericia, pérdida de la producción de leche, de peso y hasta la muerte súbita, cabe recalcar que esta puede permanecer en los hospedadores durante toda su vida, haciendo que sean portadores de la enfermedad, pudiendo transmitirla por vectores o por transmisión mecánica por insectos o agujas, siendo esta última un problema común en el país.

En Ecuador, existen reportes la prevalencia de anaplasmosis bovina en Santo Domingo (86.1%) (Tana-hernández et al., 2017), Zamora (63.8%) (Guarnizo et al., 2020) y Galápagos (93%) (Gioia et al., 2018), sin embargo, esta se encuentra prevalente en otras regiones del país, principalmente por la movilización indiscriminada de ganado, además, la falta de un control

epidemiológico causa que la enfermedad se disemine más (Escobar et al., 2015; Rosas & Ibarra, 2021).

En este contexto, es necesario mencionar que la anaplasmosis bovina se diagnostica con tinción con Giemsa en animales que demuestran síntomas clínicos, además de pruebas de inmunodiagnóstico como ELISA competitivo, ELISA indirecto, aglutinación en placa, fijación de complemento, pruebas PCR, entre otras (World Organization of Animal Health, 2015), en Ecuador la adquisición de estas es casi nula, de modo que la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (AGROCALIDAD) recomienda como procedimiento específico de ensayo para el diagnóstico de hemoparásitos al frotis sanguíneo (Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario & Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2016), sin embargo este puede presentar falsos positivos por precipitaciones de la tinción o por errores del operador, es así que se debe considerar pruebas de diagnóstico alternativas que permitan detectar e identificar la fase de la infección, aun cuando esta sea antigua.

Justificación del problema

El diagnóstico de *Anaplasma marginale* se realiza con pruebas directas como naranja de acridina-bromuro de etidio (NA-BREt), pruebas de aglutinación, inmunofluorescencia, entre otras (Primo et al., 2019). En Ecuador se diagnóstica por medio de tinción en frotis sanguíneos y PCR, a pesar de que la tinción es una técnica con ventajas económicas, esta no permite conocer a ciencia cierta el estado de la infección, puesto que no provee datos cuantitativos, por otro lado, la PCR aunque es más sensible, tiene costos elevados para quienes necesitan hacer uso de ella. Es así que un inmunoensayo ELISA anti *A. marginale* es necesario en términos de costos, especificidad y sensibilidad, además de que este permite conocer la seroprevalencia de la enfermedad, la avidéz y la afinidad de los anticuerpos de los sueros evaluados.

En ensayos previos se ha reportado a MSP5 como un antígeno ideal para la detección de anaplasmosis en distintos hospedadores esto debido a que esta proteína tiene al epítipo ANAF16C1, el cual es altamente conservado en todas las especies confirmadas de *Anaplasma spp.* (Hsu et al., 2016) en cuanto a anaplasmosis bovina se refiere, este antígeno además es altamente inmunogénico, proveyéndole sensibilidad a la prueba (Eleizalde et al., 2007)

Las proteínas principales de superficie MSP de *Anaplasma spp.* han sido identificadas como 1a, 1b, 2, 3, 4 y 5, este grupo de proteínas se caracterizan por ser reconocidas por anticuerpos neutralizantes y por las funciones que cumplen en la membrana de los cuerpos primarios, en este sentido, la MSP5 es una proteína de baja complejidad que es capaz de inducir gran cantidad de títulos de anticuerpos (B. Corona et al., 2009). Es gracias a las características mencionadas que esta proteína tiene gran importancia en el diagnóstico serológico.

En Ecuador el diagnóstico de anaplasmosis se realiza por medio de tinción de frotis sanguíneos, esta prueba resulta un tanto subjetiva, puesto que depende del ojo del operador y no provee de información cuantitativa del estado de la enfermedad, a esto se suma la inexistencia de una prueba comercial de ELISA anti *Anaplasma marginale* que permita evaluar la seroprevalencia de este patógeno y además, la poca frecuencia con que se realiza producción de antígenos *in house*. En este contexto, Este trabajo se centra en producir y purificar la Proteína Principal de la Superficie 5 recombinante (MSP5r), que permita estandarizar una prueba de ELISA tanto para el diagnóstico serológico, como para la evaluación de la avidéz de anticuerpos anti *A. marginale*, con el fin de conocer el estadio de la infección y además influenciar a que en un futuro se impulse la producción de estos antígenos en Ecuador, fortaleciendo a la industria ganadera mediante un diagnóstico temprano, certero y económico.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

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

Objetivos Específicos

- Obtener una población de *E.coli* recombinante genéticamente idéntica que exprese la proteína MSP5.
- Purificar la proteína MSP5 de *E. coli* recombinante, para su uso como antígeno en la prueba de ELISA, por medio de herramientas de Proteómica.
- 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.

H₀ = No existe diferencia en la Densidad óptica obtenida con las diferentes concentraciones de antígeno aplicadas.

H_a = Existe diferencia en la Densidad óptica obtenida con las diferentes concentraciones de antígeno aplicadas.

Concentración de Sueros.

H₀ = La concentración de los sueros no influye en la Densidad óptica obtenida.

H_a = La concentración de los sueros influye en la Densidad óptica obtenida.

Pre incubación.

H₀= Pre incubar los sueros con *E. coli* no influye en la Densidad óptica obtenida en la prueba de ELISA.

H_a= Pre incubar los sueros con *E. coli* influye en la Densidad óptica obtenida en la prueba de ELISA.

Avidez de los anticuerpos anti-IgG.

H₀= Existe correlación entre la densidad óptica obtenida con la prueba de ELISA IgG anti-MSP5 y con la prueba de ELISA avidéz anti-IgG.

H_a= No existe correlación entre la densidad óptica obtenida con la prueba de ELISA IgG anti-MSP5 y con la prueba de ELISA avidéz anti-IgG.

Capítulo II: Marco teórico

Historia

A finales del siglo XIX, Smith y Kilborn, reportaron “puntos marginales” en los glóbulos rojos de bovinos que presentaban cuadros febriles, determinando que estos eran una etapa temprana de *Piroplasma bigeminum* causante de hemoglobinuria bacilaria (redwater), sin embargo, años más tarde Theiler, comprobó que este parásito no era el agente causal de la enfermedad.

Theiler tras inocular ganado contra redwater, expuso a dichos animales a una infección natural por garrapatas en un Sudáfrica donde existían bovinos que presentaban puntos marginales en su sangre, ahí observó que a pesar de estar inoculados estos se contagiaban. Es así que realizó un segundo experimento e inoculó sangre con *P. bigeminum* a novillas inmunes a redwater sin provocar un efecto en la respuesta inmune, sin embargo, luego de un tiempo en el sitio, se dio una infección natural y nuevamente aparecieron los puntos marginales junto a una reacción febril, con estos antecedentes en 1910 en un reporte de “Annals of the Transvaal Museum” Arnold Theiler describió por primera vez a *Anaplasma marginale* como el parásito causante de la enfermedad de las vesículas (Theiler, 1911).

Un año después, Theiler, determinó la existencia de *Anaplasma centrale*, como su nombre lo indica, esta variante se distingue por la posición del parásito en el glóbulo rojo, además del tamaño y virulencia reducidos, asimismo, identificó y nombró a *A. ovis*, encontrada en ovinos. Posteriormente se descubrió a *A. platys* y *A. bovis*, hasta ese momento solo se conocía de anaplasmosis en rumiantes y perros, finalmente, diez años más tarde salió a la luz el primer caso de anaplasmosis granulocítica humana (HGA), cuyo agente causal es *A. phagocytophilum*, anteriormente conocida como *E. phagocytophila* (Muhammad et al., 2022).

Género *Anaplasma*

Este género está conformado por seis especies confirmadas y dos especies provisionales, las cuales se caracterizan porque tienen un ciclo de reproducción tanto en las garrapatas como en los vertebrados, convirtiéndolos en reservorios de la infección, cabe recalcar que las especies de *Anaplasma spp.* se diferencian entre ellas por los vectores de infección y los hospedadores diana, además, se distinguen por el tipo de células a las que infectan, ya sean los granulocitos o los eritrocitos, asimismo molecularmente varían de entre 1.2 MB a 1.5 MB (Rar et al., 2021).

Especies de *Anaplasma spp.* confirmadas:

- ***A. marginale***: Infecta principalmente al ganado bovino, a pesar de ello existen reportes de la enfermedad en rumiantes salvajes.
- ***A. bovis***: Como su nombre lo menciona, esta infecta los monocitos de los bovinos, búfalos, cabras, ovejas y rumiantes salvajes.
- ***A. centrale***: Al igual que *A. marginale* infecta al ganado bovino y otros rumiantes salvajes.
- ***A. ovis***: Infecta a ovejas, cabras y rumiantes salvajes.
- ***A. platys***: Esta especie se caracteriza por infectar a las plaquetas de los perros y de camellos, provocándoles trombocitopenia cíclica a los primeros.
- ***A. phagocytophilum***: Esta especie se encuentra distribuida en Eurasia, América y África, siendo causante de anaplasmosis en equinos, perros, gatos y en humanos.

Especies de *Anaplasma spp.* provisionales:

- ***A. odocollei***: Infecta a las plaquetas de ciervos, se ha encontrado en México y Estados Unidos, sin embargo aún no se ha determinado la enfermedad que provoca.
- ***A. capra***: Sus hospedadores principales son las cabras y ovejas, aunque también infecta bovinos, rumiantes salvajes, perros y humanos, provocando una infección a estos últimos.

***Anaplasma marginale* en América Latina**

Este patógeno se encuentra distribuido a nivel mundial en regiones tropicales y subtropicales, siendo considerada endémica en distintos países, en una revisión sistemática a nivel mundial se determinó que existía una prevalencia del 6.28% de *Anaplasma spp*, de este 30.3% de individuos evaluados fueron rumiantes (Urán & Cardona Arias, 2020).

Los primeros reportes de anaplasmosis en América datan de la década de los 60, en Oregón (Kreier & Ristic, 1963), en cuanto a América Latina, existe evidencia de infecciones por *Anaplasma marginale* en Venezuela desde 1935 (Virviescas, 1936).

En la actualidad, en América Latina se ha reportado prevalencia de *A. marginale* en Latinoamérica de 48.9%, distribuida en México, Brasil, Colombia, Argentina, Uruguay, Paraguay, Guatemala, Venezuela (Eleizalde et al., 2007; Mattos Ferreira et al., 2022; Tana-hernández et al., 2017)

En Ecuador se ha reportado la presencia de anaplasmosis bovina en Galápagos, Santo Domingo, Cotopaxi, Los Ríos, Guayas, Esmeraldas, Pichincha y Zamora (Escobar et al., 2015; Gioia et al., 2018; Guarnizo et al., 2020), a pesar de ello no existen datos de la prevalencia en otras zonas, lo que complica el control de la propagación de esta, principalmente por la movilización indiscriminada de animales.

En Galápagos se ha determinado que la anaplasmosis bovina es endémica, con presencia en las Islas San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela, con una prevalencia mayor al 90% (Gioia et al., 2018), asimismo, en Santo Domingo y Esmeraldas, se ha reportado prevalencias mayores al 80% (Escobar et al., 2015; Tana-hernández et al., 2017) mientras que en Zamora Chinchipe se encontró una prevalencia menor, de 63.8% en diferentes cantones en donde se evaluó (Guarnizo et al., 2020).

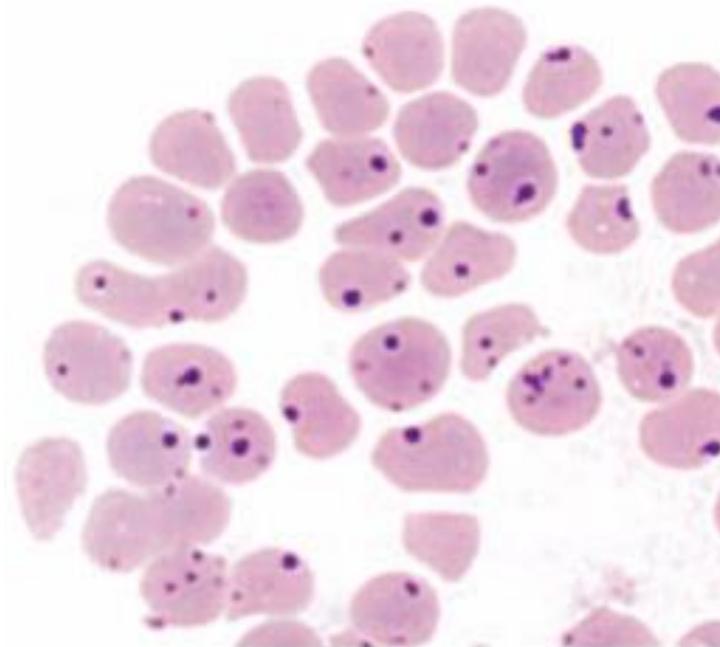
Características de *Anaplasma marginale*

Morfología

Es una bacteria Gram-negativa, tiene forma ovoide de entre 0.3 a 0.8mm de diámetro, se localiza en la periferia del eritrocito, de modo que se muestran como cuerpos de inclusión (Olguin & Bernal, 2017), esto se demuestra en la figura 1 reflejados con coloración Giemsa en un frotis sanguíneo.

Figura 1.

Anaplasma marginale



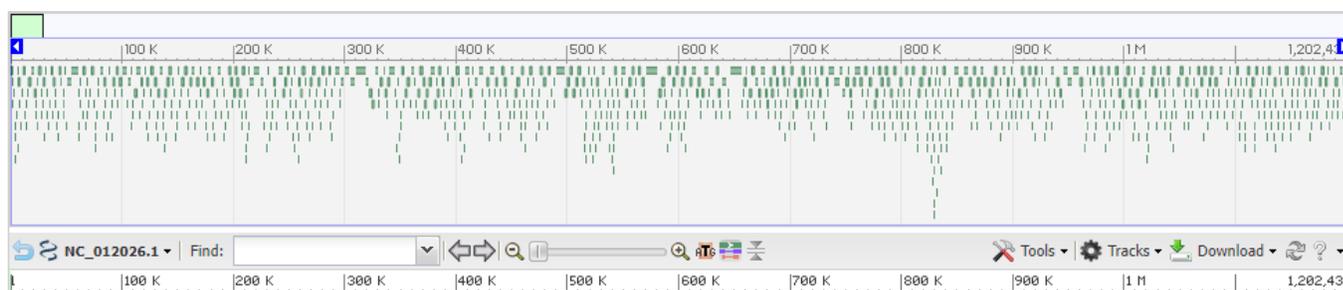
Nota. La figura muestra un frotis con eritrocitos infectados con *Anaplasma marginale* teñidos con Giemsa, obtenido de: (S. Rodríguez et al., 2003).

Composición y estructura

El ADN de *A. marginale* se caracteriza por tener un valor promedio de longitud de 1.17463 Mb, en cuanto al contenido proteico tiene un promedio de 910 proteínas; además de aproximadamente tener 913 genes codificantes, 44 genes de ARN y 35 pseudo genes (National Library of Medicine (US), 2022), la secuencia completa se muestra en la figura 2.

Figura 2

Secuencia completa de *Anaplasma marginale*



Nota. La figura 2 representa la secuencia obtenida de un aislado de Florida, se muestran aproximadamente 1202,439 MB, tomado de National Library of Medicine (US) (2022).

Este microorganismo se caracteriza por tener proteínas en la membrana celular, las proteínas principales de superficie (MSP, por sus siglas en inglés), MSP1, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (S. Rodríguez et al., 2003), esta última es utilizada como antígeno en el presente trabajo. Cabe mencionar que las MSP permiten distinguir la diversidad genética de *A. marginale*, debido a que se codifican por un gen simple de una sola copia que permiten la caracterización (Quiroz-Castañeda et al., 2016).

Taxonomía de Anaplasma marginale

Taxonomía tomada de: (Rar et al., 2021)

Reino: Monera

Dominio: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Clase: Alphaproteobacteria

Orden: Rickettsiales

Familia: Anaplasmataceae

Género: Anaplasma

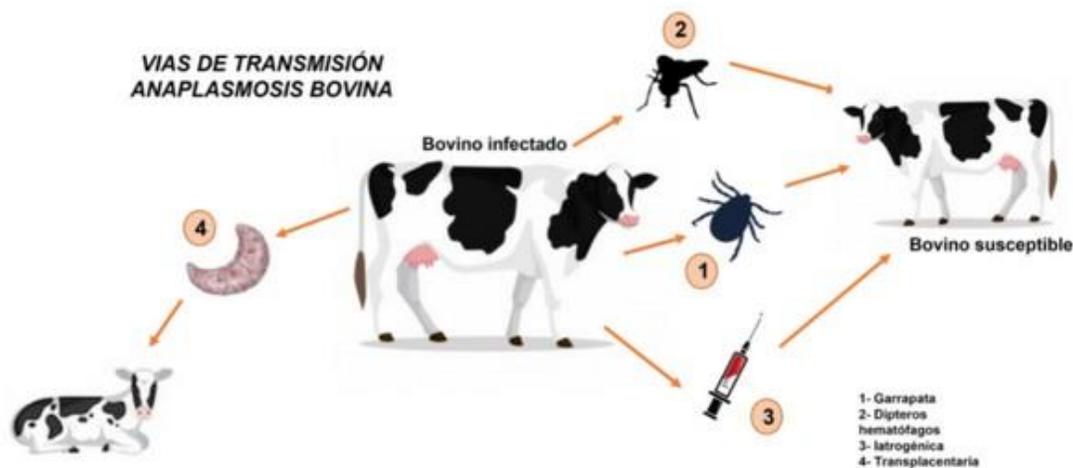
Especie: *Anaplasma marginale*

Hábitat, transmisión y diagnóstico

Anaplasma marginale vive en los eritrocitos maduros de los hospedadores primarios, posterior a ello una garrapata vector se alimenta de la sangre de los hospedadores, aquí la bacteria ingresa a las células epiteliales del intestino medio para pasar a las glándulas salivales para transmitirse a un nuevo mamífero convirtiéndose en un nuevo organismo reservorio, figura 3 (Noh et al., 2011).

Figura 3

Transmisión de Anaplasmosis bovina



Nota. La figura muestra la transmisión de *Anaplasma marginale* desde un bovino infectado a bovinos susceptibles, la primera vía de infección (1) es una garrapata, la segunda (2) son insectos hematófagos y la tercera (3) es la transmisión por errores técnicos con agujas infectadas, tomado de da Silva Silveira, Caroline Parodi et al., (2022)

El diagnóstico de la anaplasmosis bovina se divide en distintas pruebas directas e indirectas, entre los métodos directos se encuentra la subinoculación de eritrocitos infectados en animales esplenectomizados como Gold estándar, pese a ello esta no se utiliza en la práctica; asimismo, se encuentra como uno de los métodos más usados a la visualización en frotis sanguíneos con Giemsa, también las sondas de ácidos nucleicos y la PCR, en los métodos indirectos se encuentran los ensayos serológicos basados en ELISA, la aglutinación en tarjeta, la fijación de complemento y la aglutinación en tubos capilares (G. B. Corona et al., 2014).

Proteína principal de superficie 5 MSP5

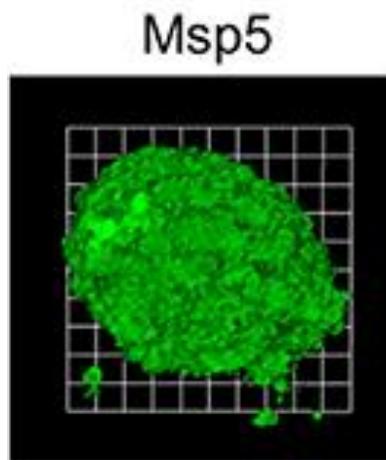
Características de la MSP5

El gen que codifica a MSP5 tiene como característica principal su alta conservación entre los distintos aislados de *A. marginale*, sin embargo no es usado para conseguir información filogenética (Quiroz-Castañeda et al., 2016). La proteína de 19KDa, esta fue identificada por inmunoprecipitación de la inmunoglobulina G2a, MSP5 se caracteriza por tener al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal ANAF16C1 que se conserva en todas las especies de *Anaplasma spp*, figura 4 (Visser et al., 1992). La MSP5 se encuentra fusionada a una proteína de unión de Maltosa (MBP) con quien comparte al epítipo, (Torioni De Echaide et al., 1998).

En función de su alta conservación se usa la proteína MSP5 como un antígeno que detecte anaplasmosis (Torioni De Echaide et al., 1998).

Figura 4

Proteína MSP5 3D



Nota. En la figura se muestra la estructura de la proteína MSP5 en 3D, modificada de Truchan et al (2016).

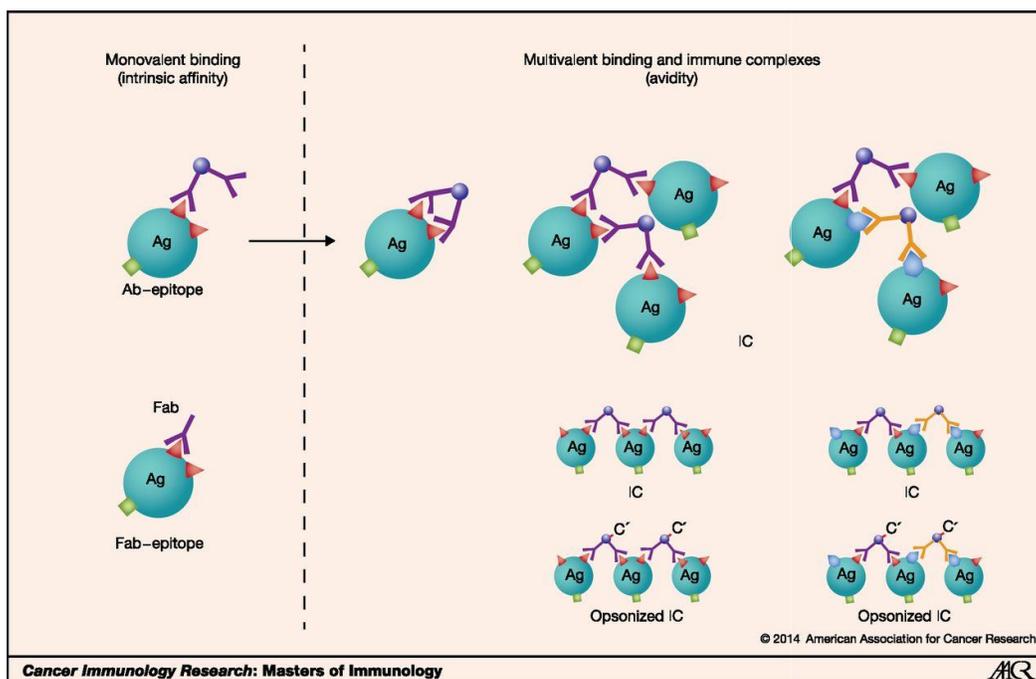
Avidez de anticuerpos

Se conoce como avides a la fuerza de unión de un solo enlace de antígeno-anticuerpo o las interacciones intercelulares entre las moléculas de superficie, esta se ve influenciada por la afinidad y la valencia de dichas interacciones, es así que aquellos anticuerpos con mayores lugares de unión tienen una avides mayor, figura 5 (Abbas et al., 2014).

La avides cambia durante la respuesta inmune primaria, en un principio está es débil y aumenta dependiendo de la dosis antigénica, además, se ha demostrado que la avides de los anticuerpos en la fase temprana de la respuesta secundaria puede aumentar o disminuir (Celada et al., 1969).

Figura 5

Avides de los anticuerpos



Nota. La figura muestra una comparación entre la afinidad de los anticuerpos y la avides, en esta se muestra que es la unión multivalente de los anticuerpos (Eisen, 2014)

La manera más común de medir la avidéz es mediante el índice de avidéz (AI), este permite conocer si una infección es reciente o no, esto en función de que la respuesta de los anticuerpos maduros varía de baja a alta en semanas o meses, es así que es altamente usada en enfermedades de pacientes inmunodeprimidos y en infecciones materno-fetales como toxoplasmosis, citomegalovirus, entre otras (Menu et al., 2021).

La avidéz se considera como una constante de equilibrio entre el sitio de unión del anticuerpo y el determinante del antígeno, es decir que en los anticuerpos IgG, al tener dos sitios de unión, este tendría una constante de afinidad duplicada, como se muestra en la ecuación 1 (Kindt et al., 2007).

$$Avidéz = (Ka)^2 =$$

$$Keq = \frac{[Ab - Ag]}{[Ab][Ag]}$$

Ecuación 1. Constante de equilibrio de unión antígeno-anticuerpo. De Kindt et.al., (2007)

Donde:

Ka = Constante de afinidad

Keq = Constante de equilibrio

Ab = Anticuerpo

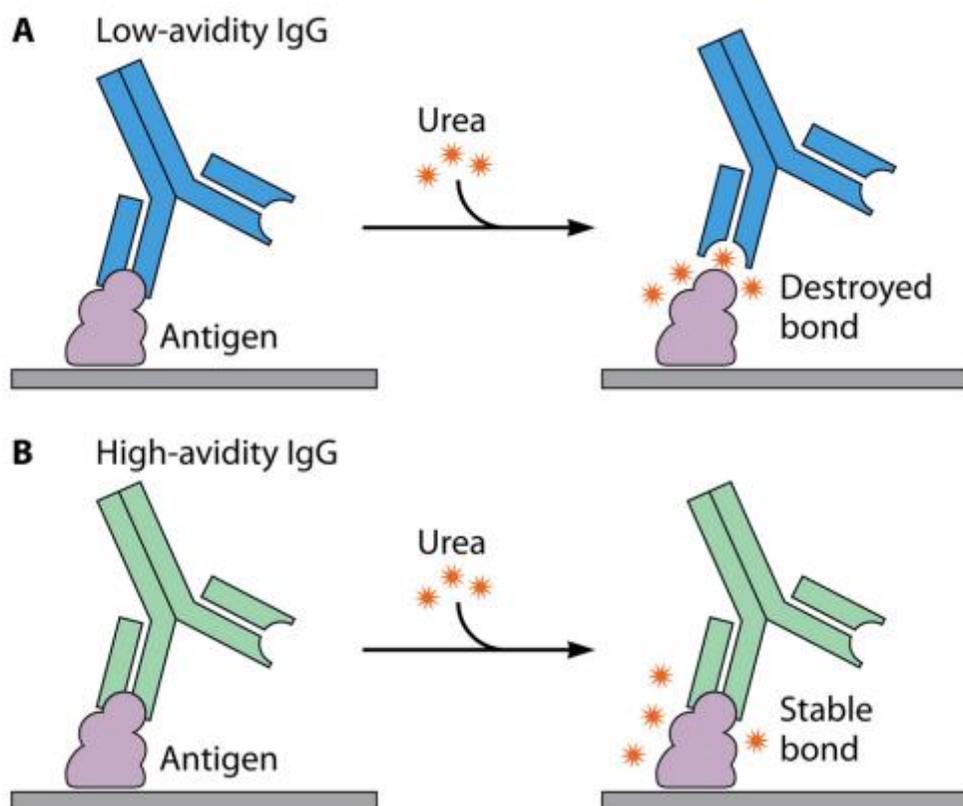
Ag = Antígeno

ELISA indirecto de avidéz

Este ensayo se caracteriza por utilizar un agente caotrópico para romper los enlaces débiles del complejo de unión de antígeno-anticuerpo, entre estos se utiliza a la Urea en molaridades de entre 5 a 7, figura 6, (Menu et al., 2021). Esta es una de las pruebas más utilizadas para medir la avidéz, puesto que permite el uso de una sola muestra a partir de un ensayo de ELISA normal (Teimouri et al., 2020).

Figura 6

Efecto de la Urea en el complejo de unión antígeno-anticuerpo.



Nota. La figura muestra el efecto de un agente caotrópico, en este caso urea, en el complejo de unión antígeno-anticuerpo, se observa que en uniones débiles la urea destruye el enlace, es decir la avides es baja, por el contrario en uniones fuertes los enlaces permanecen estables y la avides es alta (Menu et al., 2021).

Capítulo III: Materiales y métodos

Material biológico

La cepa de *E. coli* pAR1903 fue producida por Reyna-Bello y colaboradores (1998) a partir de la cepa JM109, y criopreservada para usos posteriores, esta fue provista por el laboratorio de Biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE sede Matriz, Sangolquí-Ecuador.

La cepa de referencia JM109 utilizada como control fue dotada por la Universidad Internacional SEK.

Cultivo de *E. coli* recombinante

Para verificar la viabilidad celular de las bacterias que se encontraban criopreservadas, se cultivó pAR1903 en caldo de Soya-Triptona (TSB) de Titan Biotech LTD, asimismo se cultivó como control la cepa de referencia JM109, en cada medio se colocó ampicilina (50ug/ml) y se procedió a incubar a 37°C con agitación a 30 rpm. Se comparó el crecimiento midiendo la Densidad Óptica (O.D) de cada caldo.

Se preparó medio Agar Soya Triptona (TSA) de MP Biomedicals LLC, a partir de las instrucciones del fabricante, se agregó ampicilina (50ug/ml), se sembró pAR1903 y se dejó crecer por 18 horas.

Curva de crecimiento de *E. coli*

Con la finalidad de conocer el período de tiempo óptimo para inducir la producción de MSP5, se resembró pAR1903 de medio sólido a medio líquido, este se incubó a 37°C con agitación a 30 rpm, se tomó a cada hora una alícuota del medio y se midió la densidad óptica hasta que se llegó a las 26h. Con los datos obtenidos se realizó una curva de crecimiento,

determinando el estado de incremento exponencial para colocar Isopropil-B-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a 1 ul/ml.

Obtención de la proteína

Inducción de la proteína

Se hizo la resiembra de pAR1903 en 5 matraces con 50 ml de TSB con ampicilina 50ug/ml en cada uno, posterior a ello se dejaron incubar a 37°C con agitación a 150 rpm, transcurridas las 2 horas de incubación se agregó IPTG y se dejó crecer durante 16 horas de acuerdo a la información dada por la curva.

Gel de poliacrilamida SDS-PAGE

Con la finalidad de obtener el medio con mejor producción de MSP5 se realizó un gel de resolución de 0.75mm al 16% utilizando 1,875mL de buffer 4X, 2mL de acrilamida-bisacrilamida, 19uL de APS 10% y 5µL de temed, esta solución se vertió en el molde y se dejó polimerizar aislando el gel con butanol, luego se lavó con agua destilada y se agregó la mezcla del gel de empaquetamiento al 5%, la cual contenía 156µL de buffer 4X para empaquetamiento, 61.15µL de acrilamida-bisacrilamida, 400µL de agua ultrapura, 4.38uL de APS 10% y 1.25µL de Temed, posteriormente se colocó el peine de 13 pocillos, una vez polimerizado, se ensambló el molde en la cámara de electroforesis con buffer SDS-PAGE y se dejó correr por tres horas a 100 V.

Se reveló el gel tiñéndolo en el colorante azul de Coomassie por una hora, posterior a ello se lo decoloró con una solución de Etanol-Ácido acético (30:70).

Obtención del extracto soluble

Se centrifugó el medio con mayor producción de MSP5 a 9000 rpm por 20 minutos, luego de ello se resuspendió el precipitado en 10 mL de solución de guanidina-HCl pH 7.8 previamente preparada, se agitó por 10 minutos en un rotador Sunflower Mini-Shaker 3D de BOECO y se colocó en el procesador ultrasónico VCX-130PB-220 de Sonics Materials a 6 pulsos de 5 segundos con 100% de amplitud en un baño de hielo; luego se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se almacenó el sobrenadante.

Purificación de MSP5

La purificación inició preparando una resina quelante de níquel de Invitrogen™ ProBond™, para ello se agitó la resina a 500 rpm por 2 minutos y se descartó el sobrenadante, luego se agregó 5 mL de agua destilada y se dejó agitar por 10 minutos en el rotador 3D, este proceso se realizó por duplicado, se centrifugó a 1500 rpm por 2 minutos, se descartó el agua destilada y se agregó 10 mL de una solución tampón de pH 7.8, la cual se dejó agitar por diez minutos y se repitió el proceso por duplicado, se descartó el tampón por centrifugación y se agregó la solución de Guanidina-HCl con proteínas de *E. coli* pAR1903, se agitó por duplicado durante diez minutos, se centrifugó y se desechó el sobrenadante.

Con la finalidad de descartar las proteínas que no son afines al níquel, se realizó lavados en gradiente de pH con tampones a 7.8, 6 y 5.3, hasta que la densidad óptica en cada buffer llegó a valores cercanos a cero, cada lavado consistió en colocar 10ml de tampón, agitar por 10 minutos, centrifugar a 1500rpm por dos minutos y desechar el sobrenadante.

Finalmente se colocó la resina en una jeringa de 10mL, a la cual se le empacó previamente lana de vidrio y se añadió una solución tampón de pH 4, se recogieron los eluatos y se midió su densidad óptica en un NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers de Thermo Scientific™, finalmente se colocó los eluatos con mayor densidad óptica en una membrana de

diálisis de Fisherbrand™ por 36 horas y se recogió el concentrado visible de proteínas en un tubo eppendorf de 1.5mL, por otro lado, al sobrenadante se lo sometió a una centrifugación por columnas Amicon® Ultra Centrifugal Filters de MERCK millipore y se midió la concentración.

Se verificó visualmente la pureza de la proteína con un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.

Estandarización de la prueba ELISA anti-IgG bovino.

Concentración de MSP5 y de los sueros.

Para determinar la concentración óptima de MSP5 se realizó una comparación de la proteína diluida en buffer carbonato a 1ug/ml, 0.6ug/ml y 0.3ug/ml, asimismo, se determinó la concentración adecuada de los anticuerpos, mediante la comparación de sueros diluidos a 1/100 y 1/200 en buffer de bloqueo (FBS), se utilizó una metodología estándar de ELISA *in house* anti-RBD (Guevara et al., 2021).

Como método de control se tomaron como referencia a sueros positivos por PCR de ensayos previos (Y. Rodríguez & Reyna-Bello, 2020), se comparó la O.D obtenida con cada dilución y se la contrastó con valores referenciales de Reyna-Bello y colaboradores (1998).

Pre-incubación

Con la finalidad de reducir las interferencias por proteínas de *E. coli* eluidas, se realizó una pre-incubación de los sueros bovinos, para ello se los colocó en concentraciones de 1/100, 10/100 y 50/50 en una solución concentrada de *E. coli* se dejaron incubar por al menos 30 minutos a 37°C y posteriormente resuspendió en FBS a una concentración de 1/100, se dejó en incubación nuevamente por 1H a 37°C como se estableció en el protocolo estándar de Guevara, Vivero et.al., (2021). Finalmente se analizó la D.O obtenida en las diversas concentraciones con la de los sueros sin pre-incubación mediante una prueba de T.

ELISA anti-IgG bovino

Con la proteína purificada se fijó 50 ul/pocillo de 0.6ug/ml de proteína recombinante (antígeno) MSP5 en buffer carbonato durante 1 hora a 37°C a 25 rpm. Para diluir el antígeno a 0,6 ug/ml: se utilizó 0.9ul de la solución stock a 0.6ug/ul y se agregó 4800 ul buffer carbonato para una placa, posterior a ello se desechó la solución no fijada y se lavó la placa con PBS-tween20 al 0.1% (PBS-T) con un lavador automático de 8 pocillos de Nunc-Immuno™. A continuación, se bloqueó la placa con 200ul/pocillo de Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% en PBS-T durante una hora a 37°C y 25rpm, se repitió el proceso de lavado anterior por cinco veces.

Se realizó la pre-incubación de los sueros a 10/100 en *E. coli* a 37°C por 30 minutos, posteriormente se los diluyó 1/100 en la solución de bloqueo y se los incubó a 37°C por una hora, se repitió el proceso de lavado por cinco veces.

Se agregó 100ul/pocillo de conjugado anti IgG bovino de ID Screen® (IDvet) diluido 1/10 en buffer de dilución y se dejó incubar 30 minutos a 37°C, a continuación se lavó la placa por siete veces y se agregó 100 ul/pocillo de sustrato TMB de ID VET y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 15 minutos, se detuvo la reacción con 100ul/pocillo de solución de parada de ID Screen® (IDvet) y se midió la absorbancia a 450nm en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan® EX.

Determinación del punto de corte

Se determinó el punto de corte a partir de sueros de una zona sin reportes de Anaplasmosis, los cuales tenían una D.O baja, en concordancia con los valores obtenidos en el ensayo de Reyna-Bello y colaboradores (1998), principalmente de regiones donde no existen reportes de anaplasmosis.

A los sueros se les determinó el valor promedio y la desviación estándar, posteriormente se utilizó la fórmula de la ecuación 2.

$$Cut - off = (\bar{x} + 3D.E)$$

Ecuación 2. Cut-off de ELISA De: (Olsen et al., 2022)

Donde:

\bar{x} = Media de los valores negativos teóricos.

$D.E$ = Desviación estándar de los valores negativos teóricos.

ELISA de avides-anti-IgG bovino.

Se realizó el mismo ensayo del ELISA anti-IgG bovino, sin embargo, en este procedimiento, después de la incubación de los sueros bovinos, se lavó la placa con una solución de Urea 6M. Se procedió a medir la densidad óptica en el lector de ELISA a 450nm.

Determinación de la avides de los anticuerpos anti-IgG bovino

Con los valores de la densidad óptica obtenidos en los sueros positivos con el ensayo de ELISA anti-IgG bovino y el ensayo de avides, se calculó la avides a partir de la ecuación 3:

$$\% \text{ avides} = \frac{D.O \text{ ELISA avides} - \text{anti} - \text{IgG}}{D.O \text{ ELISA anti} - \text{IgG}} * 100$$

Ecuación 3. Avides de los anticuerpos. De: (Malgorzata, 1999)

Donde:

% Avides = Proporción de anticuerpos de baja o alta afinidad

D.O = Densidad óptica

Finalmente se interpretó los resultados a partir del protocolo de (Teimouri et al., 2020)

Análisis Estadístico

Se utilizó las herramienta Microsoft Excel, versión 2013 (Corporation, 2022), SPSS Statistics, versión 24 de IBM (IBM International Bussines Machines, 2016) y el software InfoStat versión 2014 (Di Rienzo et al., s/f).

Diseño experimental

Con la finalidad de estandarizar la prueba de ELISA anti-MSP5, se realizaron diferentes ensayos para definir la concentración óptima de la proteína y de los sueros determinando diferencias significativas mediante un análisis de varianza AXB (tabla 1), y la influencia de la pre-incubación mediante una prueba de T para muestras relacionadas (tabla 2).

Tabla 1

Esquema del análisis de varianza utilizado

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-calculado	p-value
Modelo					
Concentración de antígeno (A)	5				
Concentración de sueros (B)	2				
AXB	1				
Error	2				
Total	18				
	23				

Nota. Se utiliza una significancia del 95% para el análisis estadístico.

Tabla 2

Esquema de la Prueba de T utilizada

Número de colonia	Media	Desviación estándar	T	p-value
Sin pre-incubación				
Con pre-incubación				

Nota. Se utiliza una significancia del 95% para el análisis estadístico.

Variable a medir

Densidad óptica (Abs=450nm)

Diseño no experimental

La presente investigación tiene la finalidad de la evaluación de la avidéz de anticuerpos IgG contra *A. marginale*, esto a partir de una prueba de ELISA *in house* IgG anti-MSP5, a través de herramientas de inmunología. Adicionalmente, se corroboró la presencia de anaplasmosis en cuatro fincas y un camal, a partir de los cuales de validó la prueba de ELISA.

Variable respuesta

Las variables respuesta de este trabajo son la presencia de *A. marginale* a partir del valor S/P en la prueba de ELISA IgG anti-MSP5 y el valor de O.D de las pruebas de ELISA convencional y de ELISA de avidéz, y con ello el porcentaje de avidéz de los anticuerpos anti IgG bovinos.

Error aleatorio

Los errores que se presentan en esta investigación se generan por errores de equipos y de operación.

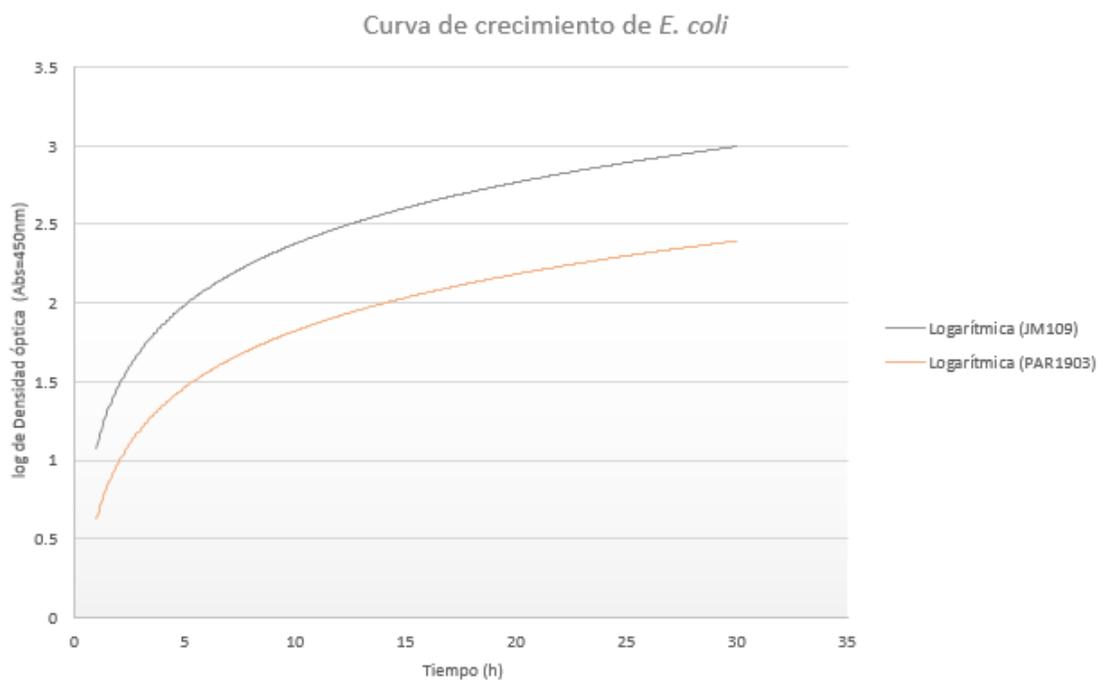
Capítulo IV: Resultados

Cinética de desarrollo de *E. coli* pAR1903 y *E. coli* JM109

Se obtuvo un desarrollo de pAR1903 más lento que el de *E. coli* JM109, figura 7, a partir de ello se realizaron réplicas de la cepa, para inducir un crecimiento mayor, además, al añadir IPTG a los medios, se determinó que a las 2H de cultivar a pAR1903 es preferible colocar este inductor de la expresión, puesto que la producción de proteínas aumentó.

Figura 7.

Curva de crecimiento de *E. coli*



Nota. Se muestra la tendencia logarítmica de la densidad óptica obtenida a lo largo de 30H en cada cultivo.

Identificación de la proteína

Se inició el cultivo colocando una colonia de pAR1903 en 8mL de caldo TSB, este proceso se realizó por quintuplicado, se midió la densidad óptica de cada medio a las 2 H y a las 16H, obteniendo crecimiento similar en cada uno, como se indica en la tabla 3, además, se realizó gel de poliacrilamida SDS-PAGE, el cual permitió conocer que el cultivo con la mejor producción de MSP5 parte de la colonia 3, este fue escalado a 50mL.

Tabla 3

Mejores candidatos para la producción de antígenos

Numero de colonia	Densidad óptica a las 2H (Abs=625nm)	Densidad óptica a las 18H (Abs=625nm)
1	0.856	2.189
2	0.686	2.066
3	1.245	2.124
4	0.895	2.054
5	0.912	2,107

Nota. Las colonias se obtuvieron de una misma placa de cultivo, la cual se resembró después de una transformación.

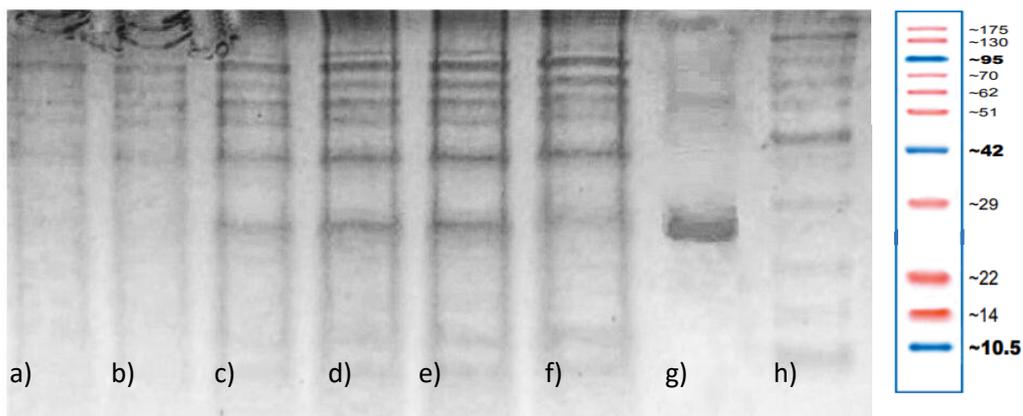
Purificación de la proteína

Con el cultivo de 50mL se purificó y se concentró la proteína, donde se obtuvieron 2mL de MSP5 a una concentración de 5mg/ml, posteriormente se resuspendió en SDS al 0.1% con la finalidad de que esta se hidrolice.

Después del proceso de purificación de MSP5, se realizó nuevamente un gel de Poliacrilamida para visualizar las proteínas, este se muestra en la figura 8.

Figura 8

Proteínas en gel de Poliacrilamida SDS-PAGE



Nota. Las muestras se encuentran de la siguiente forma: 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.

En la imagen se puede visualizar la cepa JM109, la *E. coli* pAR1903 produciendo MSP5 y la proteína purificada, esta se ubicó respecto al estándar entre 22-29 kDa, este fragmento debe contener teóricamente alrededor de 22KDa, además se observa la presencia de proteínas eluidas de *E. coli*, sin embargo, la pureza es adecuada para la prueba de ELISA.

Estandarización de ELISA

Se utilizaron sueros de bovinos positivos a *A. marginale* en un ensayo previo de PCR del banco de Sueros MAGBIO del Instituto de Investigación en Zoonosis CIZ; para los sueros negativos se utilizó sueros de zonas libres de este patógeno.

Buffer de bloqueo.

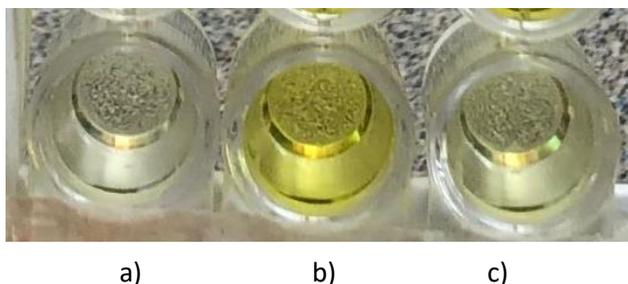
Se comparó tres soluciones de bloqueo, Suero Fetal Bovino (FBS), Albumina de Suero Bovino (BSA) y leche descremada, todas diluidas al 5% en PBS-Tween 20 0.5X, se comparó la densidad óptica obtenida en cada ensayo, para ello se dejaron tres pocillos libres de antígenos, de donde se obtuvo que el FBS tenía mejores condiciones de bloqueo, figura 9, tal como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4

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

Nota. Se utilizó pocillos de control para cada solución de bloqueo, este consistió en hacer todo el procedimiento de la prueba de ELISA evitando colocar al anticuerpo.

Figura 9*Soluciones de bloqueo*

Nota. Se compara el recubrimiento del tampón de bloqueo de la siguiente forma a) Suero Fetal Bovino (FBS), b) leche descremada, c) Albumina de suero bovino (BSA).

Concentración de antígenos.

A partir de 5mg/ml de proteína, se realizó diluciones con buffer carbonato a 1ug/ml, 0.6ug/ml y 0.3ug/ml, se fijaron en la placa y se realizó el ensayo con los mismos sueros a fin de comparar la concentración óptima para la prueba.

Se determinó por un análisis de varianza que no había diferencia significativa entre la densidad óptica obtenida con las diferentes concentraciones ($p = 0.7336$) como se muestra en la tabla 5, de este modo, al contrastar con los valores de referencia obtenidos con esta proteína (Reyna-Bello y colaboradores, 1998), se eligió usar 0.6ug/ml en cada pocillo.

Concentración de sueros

Se comparó la densidad óptica con los sueros diluidos en Suero Fetal Bovino (FBS) a concentraciones de 1/10 y 1/100, de donde se obtuvo una diferencia altamente significativa ($p=0.0013$) como se muestra en la tabla 5, al contrastar la densidad óptica de los sueros negativos con las obtenidas en ensayos anteriores, se decidió utilizar 1ul de suero en 100 de FBS, puesto que la densidad óptica a 1/100 era muy elevada y no permite distinguir entre negativos y positivos, esta comparación se muestra en la figura 10.

Tabla 5

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

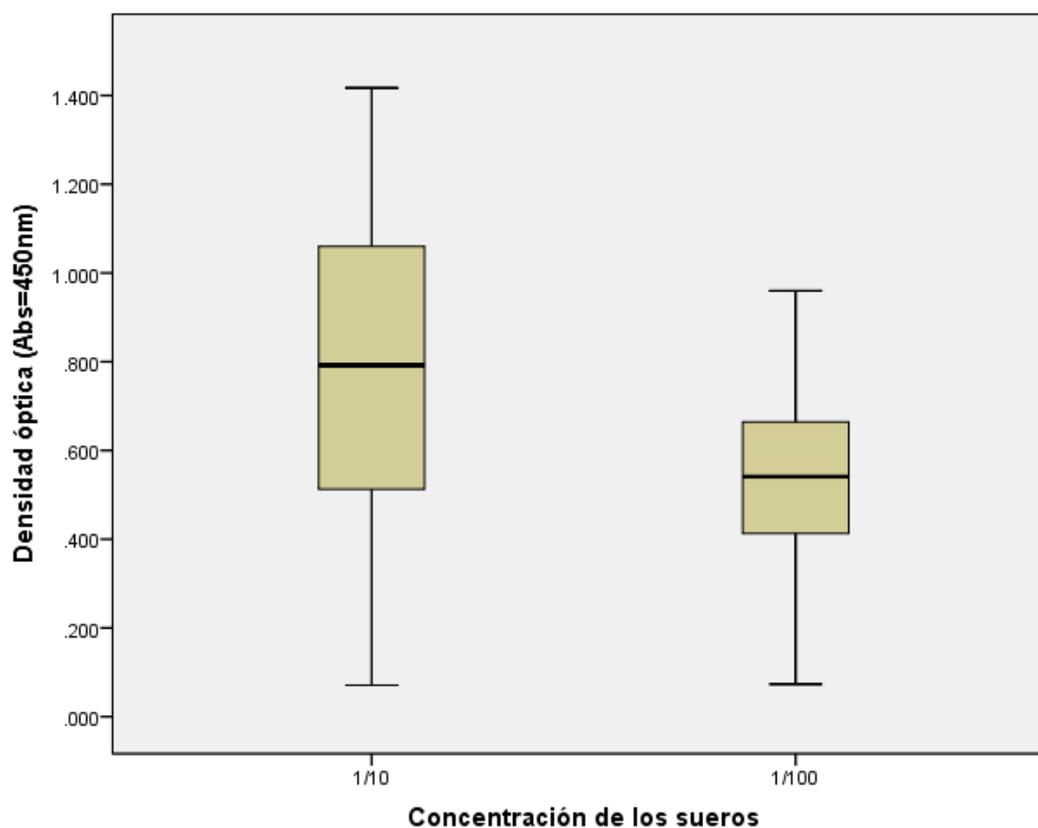
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F-calculado	p-value
Modelo	5	0.50	0.10	3.38	0.0252
Concentración de antígeno (A)	2	0.02	0.01	0.32	0.7336
Concentración de sueros (B)	1	0.43	0.43	14.52	0.0013
AXB	2	0.05	0.03	0.87	0.4376
Error	18	0.53	0.03		
Total	23	1.02			

Nota. Se consideró una significancia del 95%.

No se encontraron diferencias significativas entre la interacción de los sueros y el antígeno.

Figura 10

Diagrama de cajas para la concentración de los sueros



Nota. Se compara la densidad óptica obtenida con las diferentes concentraciones de los sueros. En la figura 9 se observa la comparación entre las diferentes diluciones de los sueros, se puede identificar una disminución considerable de la densidad óptica al diluir los sueros a 1/10.

Pre incubación de sueros.

Se demostró en los primeros ensayos valores muy elevados en sueros que teóricamente son negativos, esto debido a las interferencias causadas por las proteínas de *E. coli*, para ello se realizó una modificación del ensayo, utilizando sueros pre-incubados con una solución de *E. coli* concentrada y se comparó con el ensayo sin pre-incubación, de donde se obtuvo que la densidad óptica en los sueros positivos no tenía diferencia estadística significativa, mientras que en los sueros supuestos negativos la O.D disminuyó significativamente, tal como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6

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

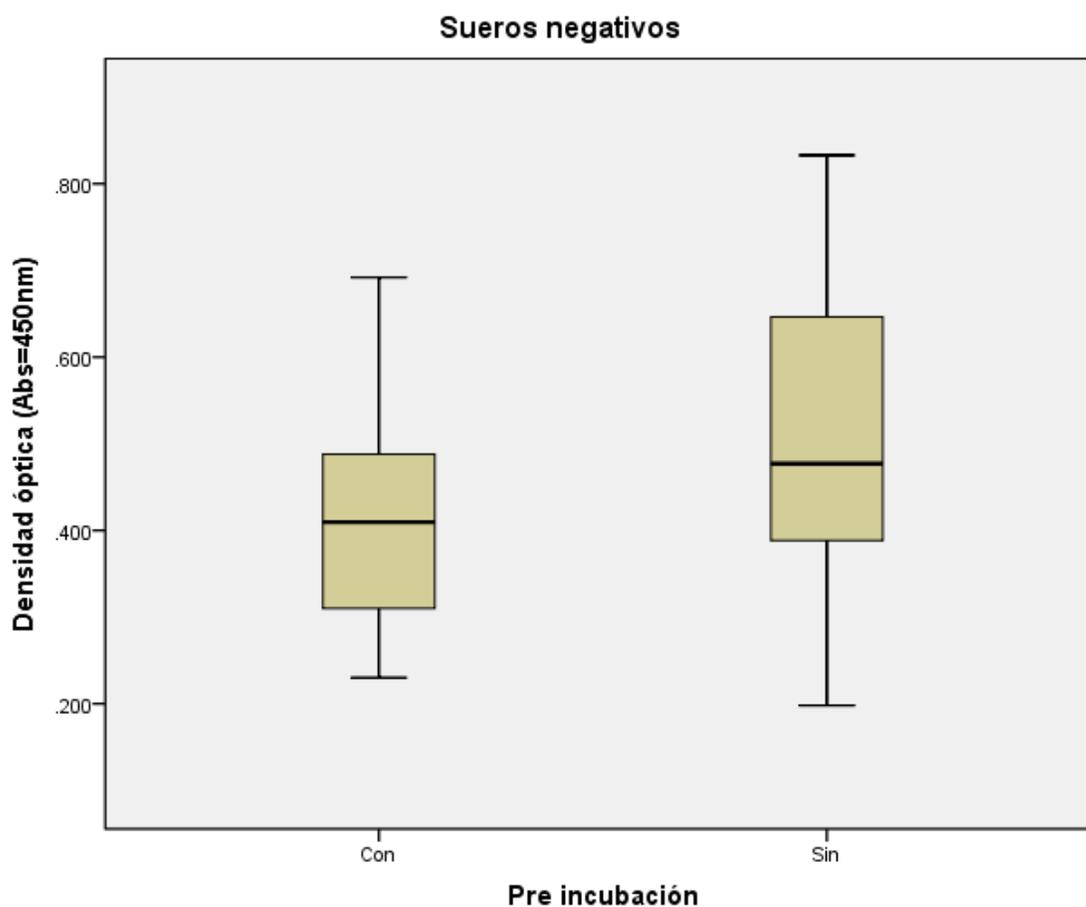
Número de colonia	Media	Desviación estándar	T	p-value
Sin pre-incubación	0.51	0.20	7.17	0.0002
	1.13	0.22	10.42	0.00019
Con pre-incubación	0.42	0.15	8.01	0.0020
	1.02	0.22	9.17	0.0027

Nota. Se dividió a los sueros por separado entre los positivos y negativos teóricos.

Se realizó una prueba de T para determinar la diferencia estadística en la Densidad óptica de los sueros que fueron sometidos a una pre incubación con *E. coli* y entre los que no. Se observa un valor de $p < 0.05$, por lo que se determina que hay diferencia significativa, obteniendo D.O menores cuando se pre-incuba a los sueros, evitando falsos positivos, figura 11.

Figura 11

Diagrama de cajas del ensayo de Pre incubación de sueros negativos



Nota. Se observa el diagrama de caja de la densidad óptica entre los sueros pre incubados y los sueros sin pre incubación, existe diferencia significativa ($p < 0.05$), con una disminución notable de la D.O.

Selección de sueros

Tras determinar las condiciones adecuadas para la prueba de ELISA se procedió a escalar el ensayo a 96 sueros, para ello se eligieron cuatro fincas, dos provenientes de la sierra y dos de la costa, además, se escogieron sueros obtenidos en un camal.

Finca 1.

De acuerdo a los reportes del Instituto de investigación en Zoonosis (CIZ), esta finca se encuentra ubicada en la sierra central en Píllaro-Tungurahua a 2969 msnm, se dedica a la producción de leche con un total de 198 bovinos. La finca se caracteriza por tener una vigilancia activa, a partir de ello se han reportado abortos y muertes no patognomónicas, también se encontró la presencia de animales positivos para Brucelosis, Fiebre Q, tuberculosis, Paratuberculosis, Leucosis y Neospora, cabe recalcar que en la prueba de PCR para *Anaplasma* los resultados fueron negativos. Las muestras utilizadas fueron obtenidas en 2021

Finca 2.

Se encuentra localizada en Santo Domingo, en el kilómetro 36 de la vía Quevedo, posee un clima tropical, el cual favorece la presencia de garrapatas vectores de *Anaplasma marginale*, en esta finca se ha reportado enfermedades como Paratuberculosis y Tuberculosis, sin embargo no existen reportes de Anaplasmosis. Los sueros se obtuvieron en el año 2018.

Finca 3.

Se encuentra localizada en Machachi, está en permanente vigilancia, sin embargo se ha reportado una alta tasa de movilidad de animales entre Santo Domingo y esta zona, cabe mencionar que los sueros utilizados de esta finca son del año 2022.

Finca 4.

Esta se encuentra ubicada en El Carmen-Manabí, entre los antecedentes de esta finca en reportes internos del CIZ, se incluye la presencia de vectores de *A. marginale*, sin embargo en estudios previos se ha descartado la existencia de esta enfermedad por PCR (Y. Rodríguez & Reyna-Bello, 2020). Los sueros utilizados en esta prueba son del año 2017.

Camal.

Se encuentra localizado en Tulcan-Carchi, esta provincia se caracteriza por tener el mayor movimiento pecuario en el país, es así que la procedencia de los animales faenados en este camal no es rastreada debido a que la adquisición de animales es de origen desconocido por la falta de control, es así que se especula que circulan animales de Costa, Sierra, Amazonía y de Colombia (Rosas & Ibarra, 2021). Las muestras se obtuvieron entre el 2016 y 2017.

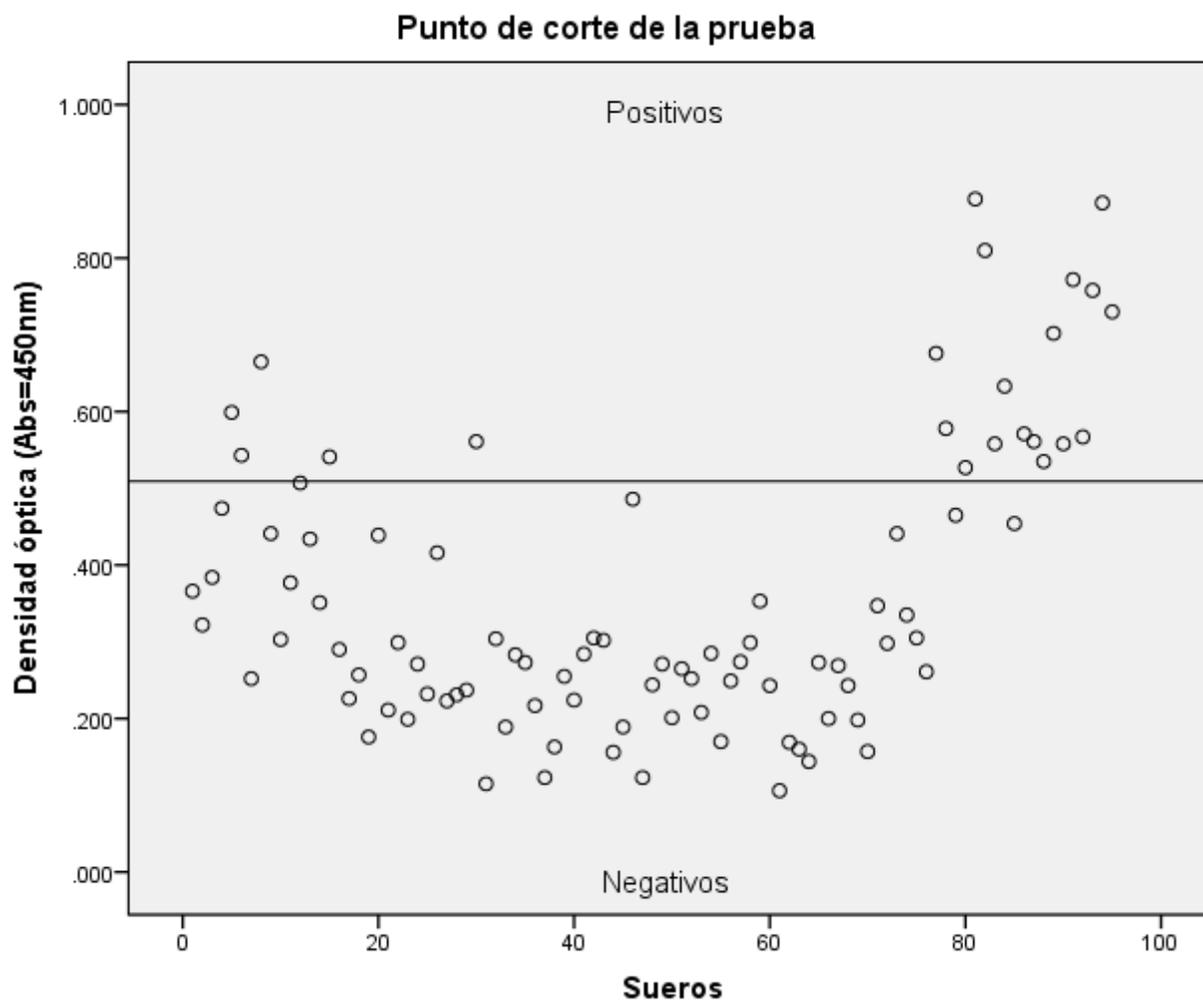
Punto de corte de la prueba

Debido a la inexistencia de controles verdaderos positivos y verdaderos negativos, se utilizó un valor de corte para cada placa que se procesa. Para determinar el punto de corte de la prueba se utilizó los sueros de la finca 1, esto debido a que en reportes previos se determinó la inexistencia de *Anaplasma marginale* mediante PCR, de este modo se tenía sueros con valores que en teoría son negativos.

A los sueros se les determinó el valor promedio y la desviación estándar, posteriormente se utilizó la fórmula de la ecuación 1, a partir de ello se obtuvo un valor de 0.509, este valor implica que los sueros con una O.D superior se consideran como positivos, figura 12.

Figura 12.

Punto de corte de la prueba



Nota. Se presenta la densidad óptica de cada muestra, clasificando los sueros positivos y negativos a partir del punto de corte 0.509.

Positividad

Con los valores obtenidos en el punto de corte se eligió un suero con una D.O de 0.115 y un suero positivo en PCR con D.O de 0.772. A partir de ello se determinó el valor S/P de cada muestra, a partir de la fórmula de la ecuación 3.

$$S/P = \frac{Muestra - Negativo}{Positivo - Negativo} * 100$$

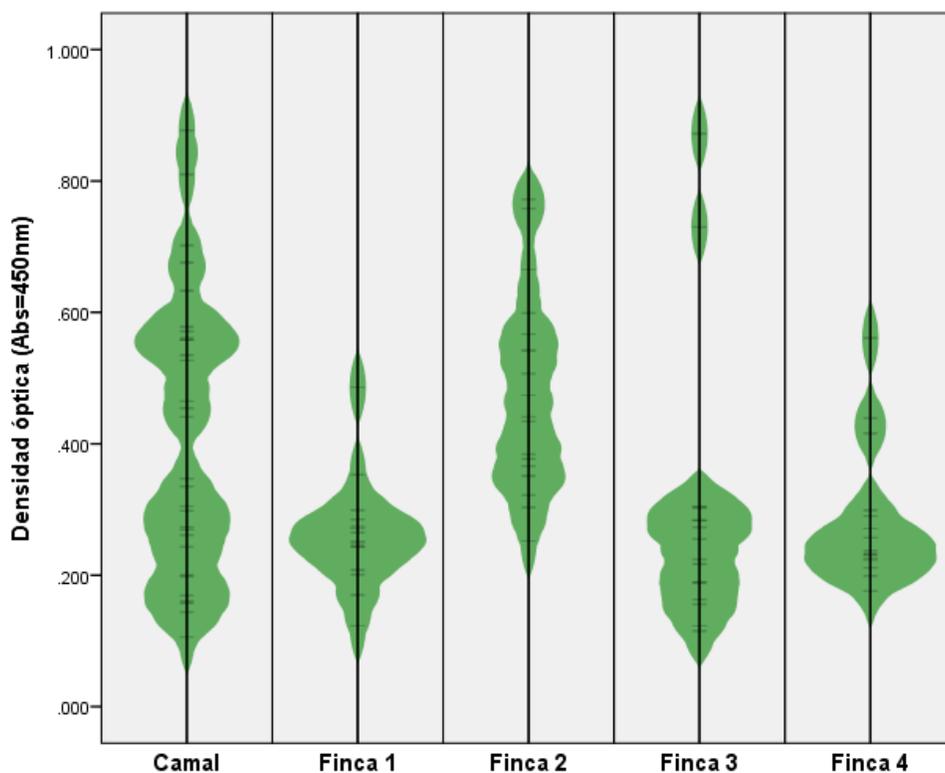
Ecuación 3. Determinación del S/P de la prueba.

Se determinó como positivos a todos los sueros con un valor de S/P superior a 60, es así que de un total de 95 muestras se obtuvieron 22 positivos, de ellos 7 pertenecen a la finca 2, 2 pertenece a la finca 3 y 1 a la finca 4, la mayor proporción de positivos fueron los animales de descarte del camal del Carchi, figura 13.

Estos valores nos dieron una noción del estado de las fincas y el problema de la movilización de los animales entre regiones.

Figura 13

Diagrama de violín de la densidad óptica obtenida por cada grupo de muestras.



Nota. Se presenta la distribución de la D.O de acuerdo a las poblaciones evaluadas, se observa mayor positividad en las muestras obtenidas del camal y de la finca 2, por otro, la distribución de los negativos es superior en las fincas 1, 3 y 4.

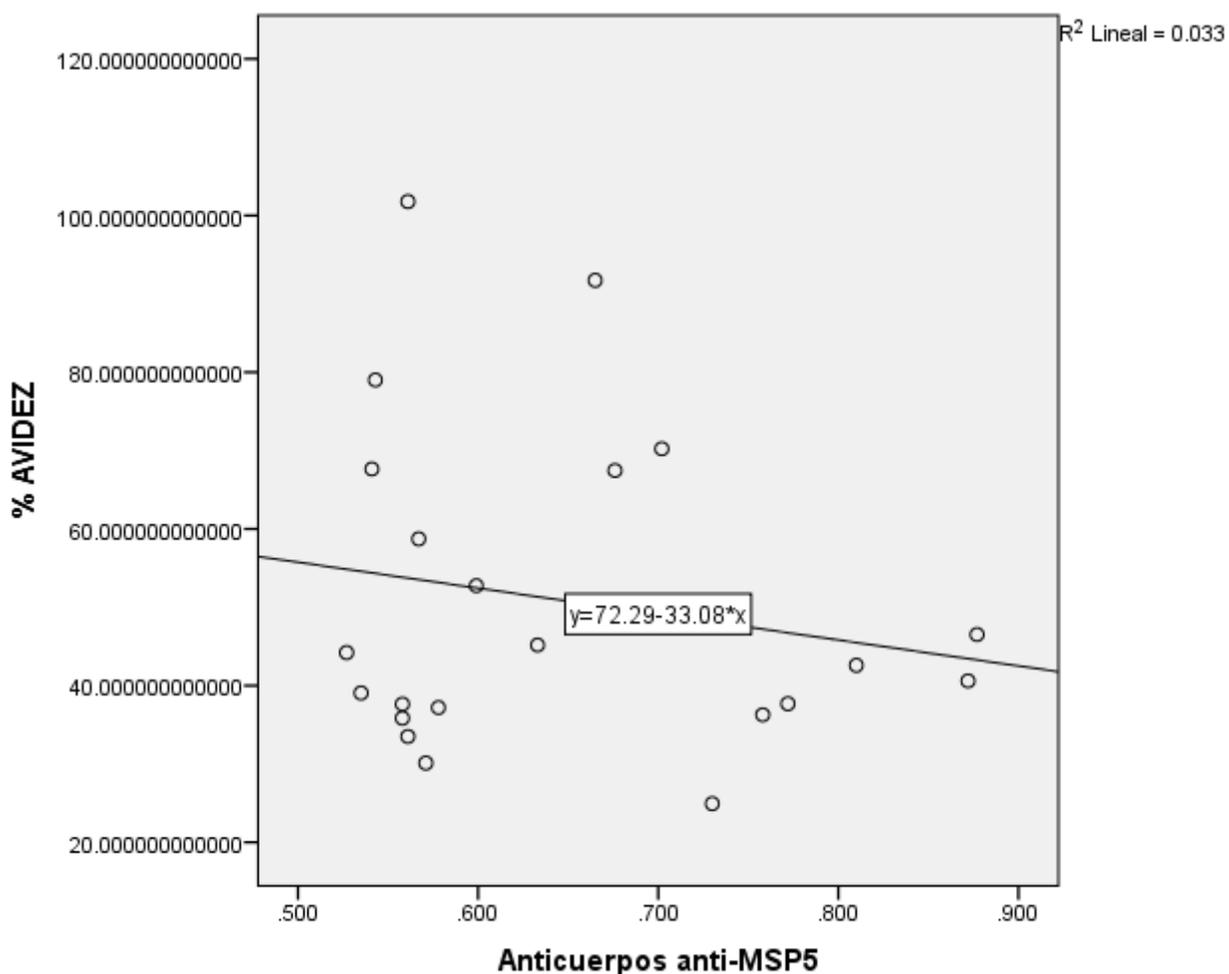
Avidez de anticuerpos

La avidéz se determinó con la relación entre el promedio de los sueros positivos obtenidos en la prueba de ELISA anti-IgG (0.654) en comparación con su duplicado en la prueba ELISA Avidéz anti-IgG (0.325). Se obtuvo un valor de avidéz de 50.317 %.

Al analizar individualmente los valores, se determinó la inexistencia de una correlación entre la densidad óptica del ELISA IgG anti-MSP5 y la avidéz obtenida, figura 14.

Figura 14.

Correlación entre la avidéz y la densidad óptica obtenida en el ELISA IgG anti-MSP5



Nota. El porcentaje de avidéz y los anticuerpos anti-MSP5 no se correlacionan entre sí, obteniendo un valor de $p > 0.05$ y un R^2 lineal de 0.033.

Capítulo V: Discusión

ELISA anti-MSP5

Se estandarizó la prueba de ELISA anti-MSP5, a partir de la inducción de la proteína en *E. coli* y su posterior purificación.

Se utilizó a MSP5 recombinante debido a que posee epítomos altamente conservados, esto implica que es una proteína muy antigénica que ha demostrado ser de gran utilidad en pruebas de ELISA indirectos (Reyna-Bello et al., 1998).

En el proceso de estandarización, primero se evaluó la solución de bloqueo con mejores resultado, definiendo que el Suero Fetal Bovino tiene un mejor efecto que BSA y la leche descremada, la solución de bloqueo cumple un rol de importancia en la prueba de ELISA, esta se caracteriza por recubrir a la placa en las zonas donde no se encuentra el antígeno con la finalidad de que no se adhieran los anticuerpos en la placa provocando falsos positivos; el FBS se caracteriza por tener una gran cantidad de proteínas estériles que reducen el ruido de la prueba, sin embargo este conlleva dilemas éticos y económicos en cuanto a su obtención (Weber & Wagner, 2021).

En cuanto a la concentración de la proteína, en comparación con ensayos realizados previamente por Reyna-Bello et al., (1998), se utilizó solamente 0.6µl por mL de buffer carbonato, esto debido a que se demostró que no había diferencia entre las diluciones evaluadas, sin embargo los valores de O.D obtenidos eran adecuados.

Pre incubación

A partir de un gel de poliacrilamida SDS-PAGE se observó la presencia de proteínas en conjunto a la MSP5r, debido a que hay proteínas de *E. coli* que eluyen al mismo pH (4).

Considerando la alta prevalencia de infecciones con esta enterobacteria en el ganado bovino,

causantes principales de la mastitis en Ecuador (Guazha & Koch, 2020), se obtuvieron reacciones cruzadas en la prueba de ELISA anti-IgG, gracias a la cantidad de anticuerpos contra *E. coli* que poseen los sueros.

En este sentido, en estudios previos se hizo uso de suero de conejos inmunizados contra *E. coli* para evitar que los sueros de los bovinos reaccionen con las proteínas de *E. coli*, demostrando que la prueba de ELISA necesita modificaciones para disminuir los resultados falsos positivos (Eleizalde et al., 2007), a partir de estos antecedentes se decidió probar una pre-incubación de sueros bovinos con JM109, con la finalidad de que estos antígenos se unan a los anticuerpos en lugar de establecer unión con las proteínas que se fijan en la placa.

En este trabajo se confirmó que la pre-incubación cumple un papel fundamental a la hora de evitar reacciones cruzadas, así se ha demostrado en ensayos en ELISA para detectar *Toxocara canis*, donde la pre incubación permitió reducir la densidad óptica en un 32.3% (Lynch et al., 1988), de igual manera en base al principio de afinidad antígeno-anticuerpo, se ha realizado trabajos para inhibir la inmunotransferencia de alérgenos, donde la pre-incubación con extracto de antígenos disminuyó la reactividad cruzada de anticuerpos (Asero et al., 2006; Lee et al., 2021)

Positividad

Se analizaron 95 muestras de cuatro fincas, dos de sierra y dos de costa, además de un matadero de Carchi, de ellas resultaron 22 casos positivos, es importante recalcar que teóricamente en la Sierra no deberían existir casos positivos, debido a que no es hábitat de los vectores de *A. marginale*, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, la movilización indiscriminada de animales provoca la transmisión de esta enfermedad; es así que se encontraron casos positivos en la finca de Machachi y en el Camal de Carchi.

En el caso de Machachi, se ha reportado en informes internos del Instituto de Investigación en Zoonosis, un gran movimiento de animales desde Santo Domingo, donde la enfermedad tiene una prevalencia mayor al 80% (Tana-hernández et al., 2017), mientras que en el caso del Camal, se ha determinado que los animales de descarte llegan desde Esmeraldas y la frontera principalmente (Rosas & Ibarra, 2021). La transmisión de hospedadores positivos en regiones sin vectores de la enfermedad, se da principalmente por transmisión mecánica por la reutilización de agujas, cuchillos, entre otros instrumentos quirúrgicos (Zabel & Agosto, 2018)..

En este sentido, se ha reportado que 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 (Zabel & Agosto, 2018).

Avidez

Como objetivo de esta investigación se evaluó la avidéz de los anticuerpos anti-IgG de los sueros bovinos, para ello se obtuvo el punto de corte de la prueba a partir de la finca sin reportes de anaplasmosis bovina. Se utilizó una solución de UREA como agente caotrópico, esto con el fin de que se separen los enlaces débiles del complejo de unión entre los antígenos y anticuerpos, en este sentido, se obtuvo un valor de avidéz promedio de 50.317%, se considera que la avidéz es alta mientras más cercana se encuentra a 1 y más débil mientras más cercana al cero está (Brady et al., 2019).

A partir del valor de avidéz promedio, se puede determinar que los animales que resultaron positivos tienen una infección antigua, además, analizando a cada suero positivo individualmente, se determinó que no existió correlación entre la avidéz y la densidad óptica, cabe mencionar que la avidéz se relaciona a la neutralización de patógenos según la fase de infección debido a la maduración de los anticuerpos, sin embargo un aumento de la avidéz con el tiempo no quiere decir que va a existir un aumento en las concentraciones de IgG (Bauer

et al., 2021), es así que en gran parte de los ensayos realizados como el de Brady et al., (2019) no se encuentra una correlación alta de concentración de IgG con la avidéz, por lo que los resultados obtenidos se encuentran en concordancia.

El valor de avidéz permite conocer la eficiencia de la respuesta humoral, puesto que se relaciona directamente con la neutralización de patógenos (Brady et al., 2019), además, ayudan a diferenciar entre infecciones agudas y reactivaciones e infecciones primarias, a partir de una sola muestra (Teimouri et al., 2020), la avidéz va a depender de las interacciones entre las moléculas de la superficie celular y a su vez de la maduración de la afinidad de los anticuerpos IgG, esta maduración aumenta conforme los linfocitos B activados desarrollan su respuesta, principalmente cuando existe una exposición repetida a los antígenos (Abbas et al., 2015), es decir, como se ha demostrado en el presente, la avidéz de IgG contra *A. marginale* será mayor en hatos donde la enfermedad es endémica.

Este diagnóstico es ampliamente utilizado en la determinación del estadio de infección por toxoplasmosis en mujeres embarazadas debido a que la enfermedad puede ser transmitida a los recién nacidos y la gravedad de esta va a depender de la edad gestacional en la que se adquiere la infección, de modo que cuando hay una avidéz baja en las madres, los riesgos de transmisión intrauterina al feto son más altos (Teimouri et al., 2020). Asimismo, se utiliza ensayos basados en la avidéz de los anticuerpos en infecciones del Virus del Papiloma Humano (VPH), para conocer la respuesta inmune natural y la respuesta artificial, demostrando que la avidéz es mayor en la vacunación, de ahí la importancia de la inmunización (Brady et al., 2019).

Es necesario mencionar que es la primera vez que se mide la avidéz de anticuerpos anti *A. marginale*, se ha demostrado en el presente que verificar la avidéz de los anticuerpos anti-MSP5 es importante para el diagnóstico de anaplasmosis bovina, debido a que esta enfermedad puede llegar a ser mortal cuando el animal no es tratado a tiempo.

Capítulo VI: Conclusiones

En este estudio se realizó la producción biotecnológica de MSP5 de aproximadamente 22KDa a partir de la cepa *pAR1903* que fue previamente clonada *JM109*, esta se purificó con una resina cargada con cloruro de níquel, obteniendo 2mL de proteína a 5mg/mL, la cual se utilizó como antígeno en una prueba de ELISA que se estandarizó en el laboratorio de inmunodiagnóstico en el Instituto de Investigación en Zoonosis CIZ.

La prueba de ELISA se estandarizó utilizando 50µL/pocillo de MSP5r a 6µL/mL, no se encontró diferencia en la Densidad óptica obtenida con las diferentes diluciones de antígeno aplicadas, en cuanto al buffer de bloqueo se utilizó Suero Fetal Bovino por su potencial de recubrimiento en comparación con BSA y leche descremada, se encontró diferencia estadística en la concentración de los sueros y se determinó una dilución óptima de 1/100 por pocillo, en cuanto al conjugado y al sustrato TMB y la solución de parada, se utilizó la concentración que se encontraba estandarizada en el inserto de ID-VET.

En cuanto a las condiciones de la prueba, la temperatura de incubación fue a 37°C, con agitación 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 mantuvo la temperatura y la agitación, sin embargo el tiempo de incubación fue de 30 minutos; en cuanto al sustrato TMB, este se incubó a temperatura ambiente, sin agitación y en oscuridad por 15 minutos, finalmente se paró la reacción con la solución STOP de ID-VET.

Luego de observar la existencia de proteínas de *E. coli* en el gel de poliacrilamida, se realizó una pre incubación de los sueros con una solución de *E. coli* concentrada, 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 donde se estableció que no existía prevalencia de anaplasmosis bovina a partir de pruebas PCR, el valor de corte se determinó en 0.509, obteniendo una OD desde 0.115 a 0.877 en los sueros estudiados, a partir de ello se obtuvo 22 positivos considerando un valor de S/P superior a 60.

Los sueros positivos se encontraron con mayor frecuencia en el camal analizado y en la finca 2, mientras que en la finca 3 y 4 se encontraron pocos sueros positivos, otorgando a la movilización indiscriminada la causa de la presencia de sueros positivos en regiones donde no hay vectores para *Anaplasma*.

En cuanto a la avidéz, 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, pues la avidéz se considera alta, cabe mencionar que esta no se correlaciona a la densidad óptica obtenida en el ensayo ELISA IgG anti-MSP5. 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.

Capítulo VII: Recomendaciones

Después de la producción de MSP5r, se recomienda alicuotar la proteína en una concentración que sea fácil de diluir, con la finalidad de que esta sufra la menor cantidad de variaciones de temperaturas posibles.

Para validar la prueba de ELISA es importante tener sueros que sean de una zona que no tenga prevalencia de anaplasmosis bovina, con la finalidad de que el punto de corte se acerque a la realidad, además, es recomendable que este se establezca para cada placa que se procese.

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.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2014). Inmunología básica. En I. Juan (Ed.), *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana* (4ta ed., Vol. 25, Número 5). Elsevier.
- Abbas, A., Lichtman, A., & Pillai, S. (2015). Inmunología celular y molecular. En *Elsevier* (8va ed.). Elsevier.
- Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario, A., & Ministerio de Agricultura y Ganadería, M. (2016). *Programa Nacional Sanitario de Vigilancia y Prevención de la Encefalopatía Espongiforme Bovina* (Norma 7.5; Vol. 1). Registro Oficial AGROCALIDAD.
- Asero, R., Wopfner, N., Gruber, P., Gadermaier, G., & Ferreira, F. (2006). Artemisia and Ambrosia hypersensitivity: co-sensitization or co-recognition? *Clinical and experimental allergy*, 36(15), 658–665. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02477.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2006.02477.x)
- Bauer, G., Struck, F., Schreiner, P., Staschik, E., Soutschek, E., & Motz, M. (2021). The challenge of avidity determination in SARS-CoV-2 serology. *Journal of Medical Virology*, 93(5), 3092–3104. <https://doi.org/10.1002/jmv.26863>
- Brady, A. M., Unger, E. R., & Panicker, G. (2019). Description of a novel multiplex avidity assay for evaluating HPV antibodies. *HSS Public access*, 447, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.04.004>.Description
- Celada, F., Schmidt, D., & Strom, R. (1969). Determination of Avidity of Anti-Albumin Antibodies in the Mouse: Influence of the number of cells transferred on the quality of the secondary adoptive response. *Immunology*, 17, 189. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/libproxy1.nus.edu.sg/pmc/articles/PMC1455973/pdf/immunology00379-0037.pdf>
- Corona, B., Machado, H., Rodríguez, M., & Martínez, S. (2009). Characterization of recombinant msp5 *Anaplasma marginale* havana isolate. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4), 972–

979. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000400032>

Corona, G. B., Obregón, D. A., Alemán, Y., Alfonso, P., Vega, E., Díaz, A., Martínez, S., Corona, B.

G., Obregón, D. A., Alemán, Y., Alfonso, P., Vega, E., Díaz, A., & Martínez, S. (2014).

Tendencias en el diagnóstico de la anaplasmosis bovina. *Rev. Salud Anim*, 36(2), 73–79.

Corporation, M. (2022). *Microsoft Excel* (Núm. 2013).

da Silva Silveira, Caroline Parodi, P., Menchaca, A., & Giannitti, F. (2022). *Anaplasmosis - Buenas*

prácticas de vacunación para prevenir brotes de la enfermedad. Ergomix.

[https://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/noticias/anaplasmosis-buenas-](https://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/noticias/anaplasmosis-buenas-practicas-vacunacion-t28020/165-p0.htm)

[practicas-vacunacion-t28020/165-p0.htm](https://www.engormix.com/MA-ganaderia-leche/sanidad/noticias/anaplasmosis-buenas-practicas-vacunacion-t28020/165-p0.htm)

Di Rienzo, J., Balzarini, M., Gonzalez, L., Casanoves, F., Tablada, M., & Robledo, C. W. (s/f).

InfoStat (Núm. 2014). Universidad Nacional de Córdoba.

Eisen, H. N. (2014). Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced

early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer immunology research*, 2(5), 381–392.

<https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0029>

Eleizalde, M., Caballero, H., & Reyna-Bello, A. (2007). Evaluation and Improvement of an

Immunoenzimatic Assay (ELISA) for Diagnosis of Bovine Anaplasmosis, Using Recombinant MSP5 as Antigen . *Revista Científica FCV-LUZ*, XVII(4), 349–356.

Escobar, A., Cevallos, O., Villarreal, P., Carranza, M., Carranza, H., & Pinargote, E. (2015).

Prevalence and detection by nested PCR of *Anaplasma marginale* in cattle and tick in the center of the coast of Ecuador. *Ciencia y Tecnología* 2015, 8(1), 11–17.

[http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8_N1_2Escobar et al.pdf](http://www.uteq.edu.ec/revistacyt/publico/archivos/C2_V8_N1_2Escobar%20et%20al.pdf)

Gioia, G. V., Vinueza, R. L., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., Boulouis, H. J.,

Moutailler, S., Monroy, F., Coello, M. A., Gondard, M., Bournez, L., Haddad, N., & Zanella,

- G. (2018). Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(5), 1262–1271.
<https://doi.org/10.1111/tbed.12866>
- Guarnizo, T. R. M., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Cabezas-Cruz, A., Gutiérrez, L. Z., Marrero, S. M., & Corona-González, B. (2020). Epidemiology and genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 11(3), 101380. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101380>
- Guazha, C., & Koch, A. (2020). *Aislamiento e identificación de bacterias patógenas presentes en leche de vacas con mastitis de las Islas Santa Cruz e Isabela, de la provincia de Galápagos - Ecuador* (Número 1). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Guevara, Á., Vivero, S., Nipaz, V., Guaraca, V., & Coloma, J. (2021). A low-cost SARS-CoV-2 rRBD ELISA to detect serostatus in ecuadorian population with COVID-19. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(4), 1513–1515. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-1420>
- Hsu, C.-H., Hsue, C., Wang, C.-L., Wu, Y.-C., Wu, C.-C., Liu, C.-C., Yu, J.-S., Chang, Y.-S., & Yu, C.-J. (2016). *Identification and characterization of potential biomarkers by quantitative tissue proteomics of primary lung adenocarcinoma*.
- IBM International Bussines Machines. (2016). *SPSS statistics* (Núm. 24). IBM.
- Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). Inmunología de Kuby. En *INMUNOLOGIA de Kuby*.
- Kreier, J., & Ristic, M. (1963). Anaplasmosis. XI. Morphologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *American journal of veterinary research*, 24, 688–696.
- Lee, J., Gantulga, P., Lee, C., Jeong, K., Lee, E., & Lee, S. (2021). A preliminary study on cross-reactivity of heat-treated quail and hen's egg white proteins in young children. *Nutrients*,

13(7), 1–10. <https://doi.org/10.3390/nu13072172>

Lynch, N. R., Wilkes, L. K., Hodgen, A. N., & Turner, K. J. (1988). Specificity of Toxocara ELISA in tropical populations. *Parasite immunology*, 10(3), 323–337.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.1988.tb00224.x>

Malgorzata, P. (1999). Immunoglobulin G avidity in diagnosis of toxoplasmic lymphadenopathy and ocular toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 6(4), 514–518.

<https://doi.org/10.1128/cdli.6.4.514-518.1999>

Mattos Ferreira, G. C., Andrighetto Canozzib, M. E., Peripollia, V., Mourac, G. de P., Sánchez, J., & Nogueira Martins, C. E. (2022). Prevalence of bovine Babesia spp., Anaplasma marginale, and their co-infections in Latin America: Systematic review-meta-analysis. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 13(4). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.101967>

Menu, E., Kopec, L., Luciani, L., Legrand, S., & L'Ollivier, C. (2021). Measurement of the igg avidity index in the diagnosis of clinical toxocariasis patients. *Pathogens*, 10(9), 1–16.

<https://doi.org/10.3390/pathogens10091086>

Muhammad, M., Muhammad, T., Muhammad, S., Muhammad, S., Muhammad, I., Mehmet, O., Qudratullah, Siddique, F., & Junejo, Y. (2022). Review on anaplasmosis in different ruminants. *Zeugma Biological Science*, 3(2), 32–45.

https://vpl.bibliocommons.com/item/show/2730542038_muhammad

National Library of Medicine (US). (2022). *Anaplasma marginale*. Genome-National Center for Biotechnology Information (NCBI).

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=anaplasma+marginale>

Noh, S. M., Ueti, M. W., Palmer, G. H., Munderloh, U. G., Felsheim, R. F., & Brayton, K. A. (2011). Stability and tick transmission phenotype of gfp-transformed Anaplasma marginale through a complete in vivo infection cycle. *Applied and Environmental*

Microbiology, 77(1), 330–334. <https://doi.org/10.1128/AEM.02096-10>

Olguin, A., & Bernal. (2017). Anaplasmosis. *Sitio Argentino de Producción Animal*, 1–3.

Olsen, A., Nielsen, H. V., Alban, L., Houe, H., Jensen, T. B., & Denwood, M. (2022).

Determination of an optimal ELISA cut-off for the diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in pigs using Bayesian latent class modelling of data from multiple diagnostic tests.

Preventive Veterinary Medicine, 201(July 2021), 105606.

<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105606>

Primo, M. E., Thompson, C. S., Valentini, B. S., Sarli, M., Novoa, M. B., Mangold, A. J., & De

Echaide, S. T. (2019). Development of a novel fusion protein with *Anaplasma marginale* and A. Centrale MSP5 improved performance of *Anaplasma* antibody detection by cELISA in infected and vaccinated cattle. *PLoS ONE*, 14(1), 1–13.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211149>

Quiroz-Castañeda, R. E., Amaro-Estrada, I., & Rodríguez-Camarillo, S. D. (2016). *Anaplasma marginale*: Diversity, Virulence, and Vaccine Landscape through a Genomics Approach.

BioMed Research International, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9032085>

Rar, V., Tkachev, S., & Tikunova, N. (2021). Genetic diversity of *Anaplasma* bacteria: Twenty years later. *Infection, Genetics and Evolution*, 91(November 2020), 104833.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104833>

Reyna-Bello, A., Cloeckert, A., Vizcaíno, N., Gonzatti, M. I., Aso, P. M., Dubray, G., & Zygmunt,

M. S. (1998). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5 for serological diagnosis of bovine anaplasmosis in Venezuela.

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 5(2), 259–262.

<https://doi.org/10.1128/cdli.5.2.259-262.1998>

Rochlin, I., & Toledo, A. (2020). *Emerging tick- - borne pathogens of public health importance : a*

mini- review. 781–791. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001206>

Rodríguez, S., García, M. A., Torres, J., & Alarcón, R. (2003). Inmunología e inmunoprofilaxis de la anaplasmosis bovina. *Ciencia Veterinaria, clínica veterinaria*, 123–164.

Rodríguez, Y., & Reyna-Bello, A. (2020). *Evaluación de la transmisión transovárica de Anaplasma marginale y Babesia spp. en garrapatas teleoginas Rhipicephalus microplus de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas* (Vol. 68, Número 1) [Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE].

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ndteint.2014.07.001><https://doi.org/10.1016/j.ndteint.2017.12.003><http://dx.doi.org/10.1016/j.matdes.2017.02.024>

Rosas, J., & Ibarra, E. (2021). *Prevalencia de Tuberculosis bovina TBB mediante el uso de aislamiento microbiológico de lesiones compatibles de la enfermedad en animales faenados en el camal de Tulcán de la provincia del Carchi* (Vol. 3, Número March). Universidad Politécnica Estatal del Carchi.

Tabar, A. (2022). Anaplasmosis in Ruminants. En *Blood parasites*. MERCK.

Tana-hernández, L., Navarrete-arroyo, K., Ron-román, J., Reyna-bello, A., & Chávez-larrea, M. A. (2017). *PCR-diagnosis of Anaplasma marginale in cattle populations of Ecuador and its molecular identification through sequencing of ribosomal 16S fragments*. 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1311-1>

Teimouri, A., Mohtasebi, S., Kazemirad, E., & Keshavarz, H. (2020). Role of toxoplasma gondii IgG avidity testing in discriminating between acute and chronic toxoplasmosis in pregnancy. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(9), 1–13. <https://doi.org/10.1128/JCM.00505-20>

Thelie, A. (1911). Anaplasma marginale. *Annals of the Transvaal Museum*, 53–55.

Torioni De Echaide, S., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez, C. E., & McElwain,

- T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, *36*(3), 777–782.
<https://doi.org/10.1128/jcm.36.3.777-782.1998>
- Truchan, H. K., Cockburn, C. L., Hebert, K. S., Magunda, F., Noh, S., & Carlyon, J. (2016). The Pathogen-Occupied Vacuoles of *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma marginale* Interact with Endoplasmic Reticulum. *Frontiers in Infection Microbiology*, *6*(22).
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00022>
- Urán, J., & Cardona Arias, J. A. (2020). Prevalencia de *Anaplasma* spp. en el ámbito mundial: Revisión sistemática 1978–2018. *Hechos Microbiológicos*, *10*(1–2), 30–38.
<https://doi.org/10.17533/udea.hm.v10n1a04>
- Virviescas, F. (1936). Tripanosomiasis, Anaplasmosis en el Ganado Bovino. *Medicina Veterinaria*, *67*. [https://www.lasalle.edu.co/pregrado/medicina-veterinaria%0Ahttp://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=580D82E82C236CCADB6E9C2FEF045397?request_locale=es&recordID=ES19940089485&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=&](https://www.lasalle.edu.co/pregrado/medicina-veterinaria%0Ahttp://agris.fao.org/agris-search/search.do;jsessionid=580D82E82C236CCADB6E9C2FEF045397?request_locale=es&recordID=ES19940089485&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=)
- Visser, E. S., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Davis, W. C., Shkap, V., Pipano, E., & Knowles, D. P. (1992). The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infection and Immunity*, *60*(12), 5139–5144.
<https://doi.org/10.1128/iai.60.12.5139-5144.1992>
- Weber, T., & Wagner, K. (2021). Replacing Fetal Bovine Serum (FBS) in Research and Testing. *Altex*, *38*(1), 163–164. <https://doi.org/10.14573/altex.2012141>
- World Organization of Animal Health. (2015). Anaplasmosis Bovina. En *Manual terrestre*.

WOAH.

Zabel, T. A., & Agosto, F. B. (2018). Transmission Dynamics of Bovine Anaplasmosis in a Cattle

Herd. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/4373981>