

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

PROYECTO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**“Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra
Anaplasma marginale en ganado bovino de altura, mediante
ELISA indirecto”**

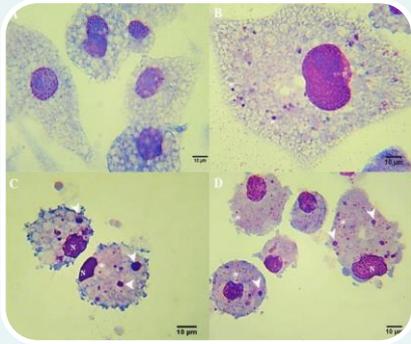
Autor: Acosta Gavilánez, Alexander Javier

Tutora: Chávez Larrea, María Augusta PhD. (c)

Sangolquí, 28 de agosto del 2023



Introducción



Anaplasmosis Bovina

Causada por
Anaplasma marginale

Parasita
glóbulos
rojos.

Huéspedes

Gran
variedad:

Rumiantes

Ungulados.

Transmisión

Agujas

Moscas

Garrapatas

Signos Clínicos

Cansancio

Fiebre

Anemia severa

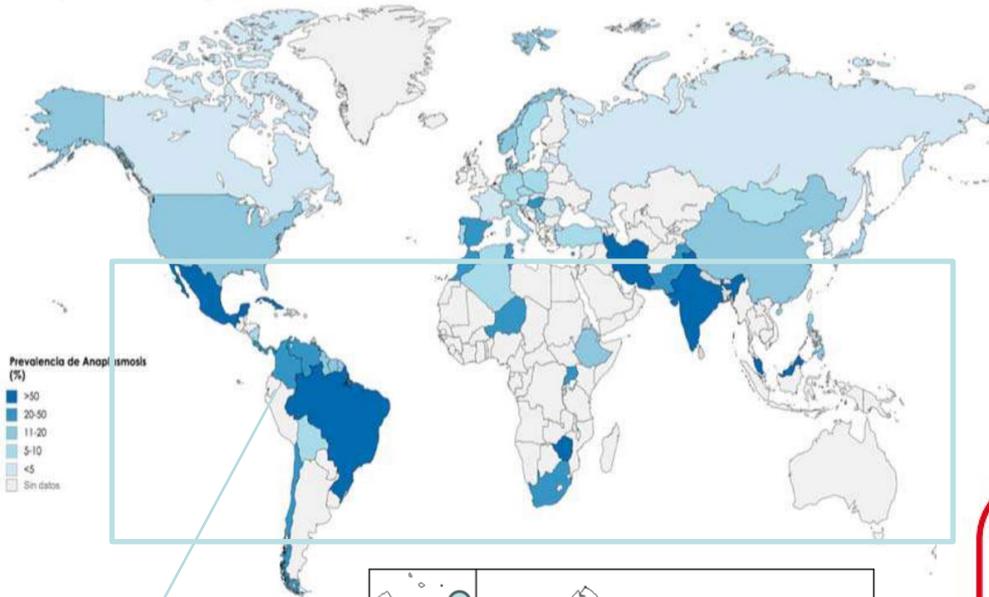
Abortos
espontáneos

Letargo

Muerte por
hipoxia



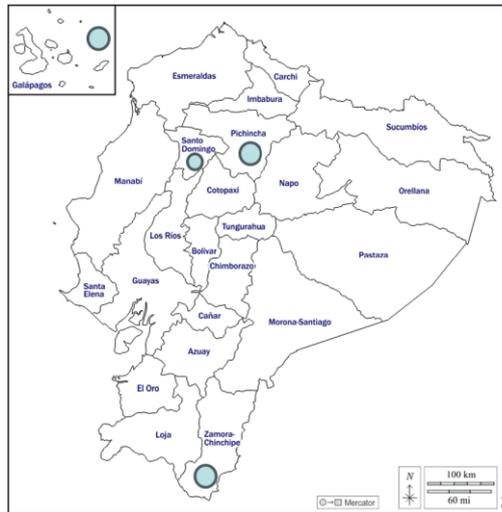
Introducción



Prevalencia de Anaplasmosis (%)

- >50
- 20-50
- 11-20
- 5-10
- <5
- Sin datos

Se ha descrito la prevalencia de anaplasmosis bovina en diferentes provincias del Ecuador.



- EEUU - \$300 millones anuales
- América latina - \$800 millones anuales



Técnicas serológicas de detección rápida



Información para detección de *A. marginale*



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Introducción

Frotis sanguíneo

• **Ventajas**

- Fácil
- Rápido
- Bajo costo

• **Desventajas**

- Fase aguda
- Menos sensibilidad y especificidad

Pruebas serológicas - ELISA

• **Ventajas**

- Mas sensible y especifica que frotis
- Flexibilidad
- Coste
- Estudios epidemiológicos

• **Desventajas**

- Menos específico y sensible que PCR
- Necesario incubación
- Reactividad cruzada

PCR

• **Ventajas**

- Mayor sensibilidad y especificidad
- Reproducibilidad

• **Desventajas**

- Costo
- Materiales
- Cuidado

Proteínas mayores de superficie

- **MSP1a**
- MSP1B
- MSP2
- MSP3
- **MSP4**
- **MSP5**

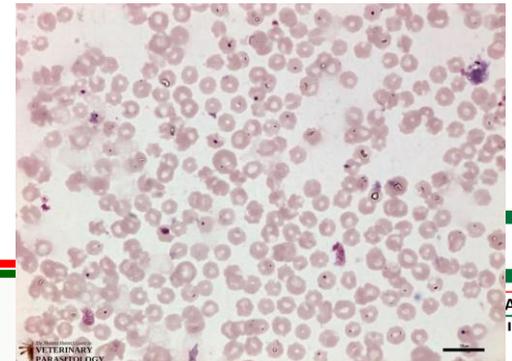
MSP5

→ **Codificación por un gen**

→ **Altamente conservada**

→ **Inmunogenicidad**

→ **Importancia en diagnóstico**



Objetivos

Objetivo general:

- Determinar la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *Anaplasma marginale* en ganado bovino de altura, mediante ELISA indirecto.

Objetivos específicos:

- Obtener la proteína MSP5 de *Anaplasma marginale* de *E. coli* que contiene el plásmido recombinante.
- Optimizar el ensayo ELISA indirecto para detectar anticuerpos contra la proteína recombinante MSP5 de *Anaplasma marginale*.
- Determinar la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *Anaplasma marginale* en bovinos de altura del banco de sueros del proyecto BruTryp.



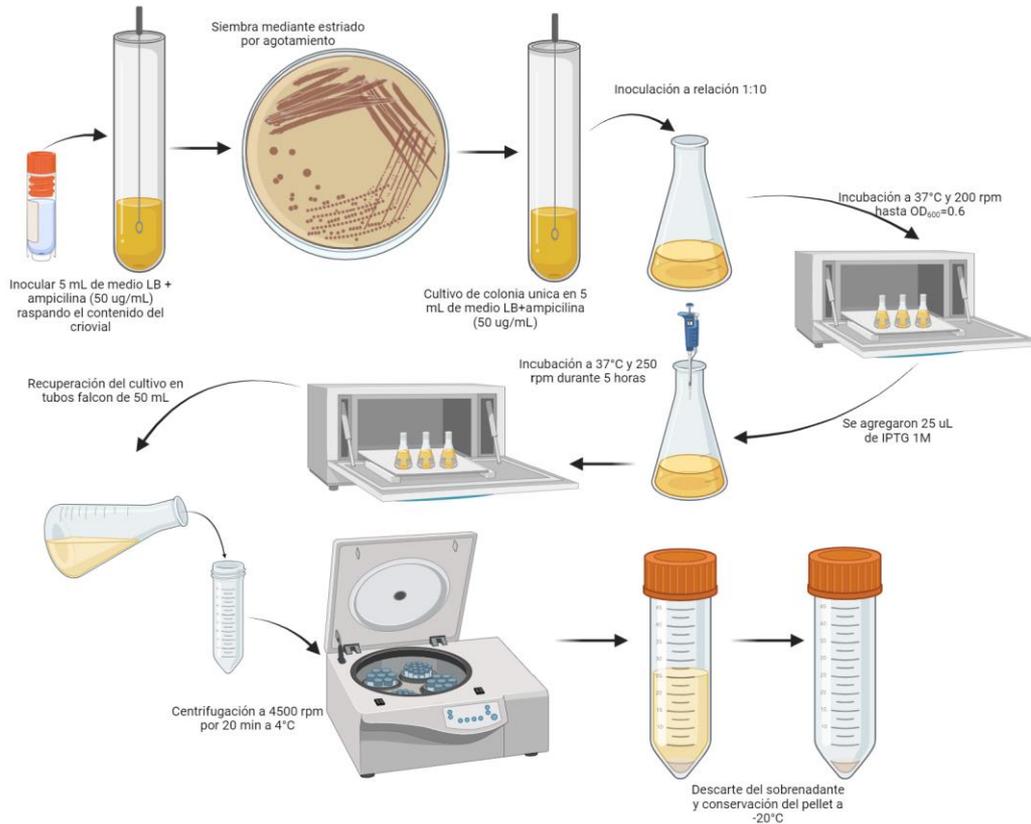
Hipótesis

- El ELISA indirecto permite evidenciar la presencia de anticuerpos IgG contra *Anaplasma marginale* en muestras de sueros de ganado bovino de altura.

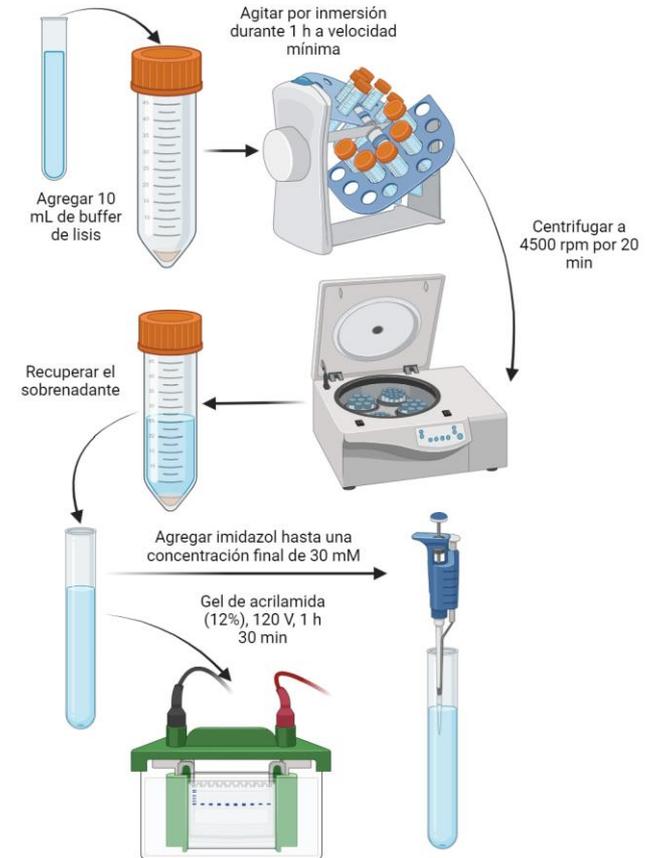


Materiales y métodos

Expresión de la proteína MSP5r

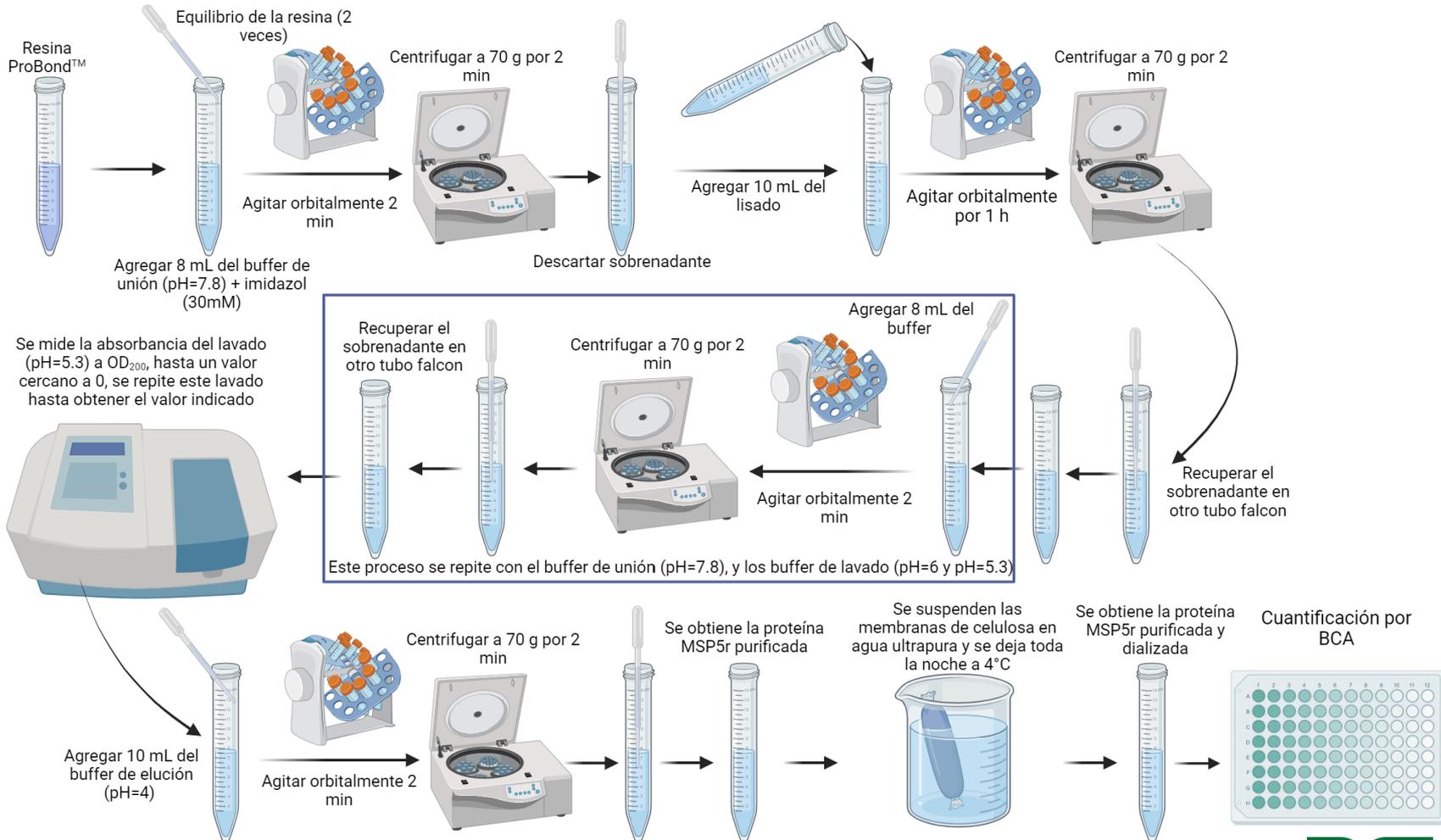


Lisis Bacteriana



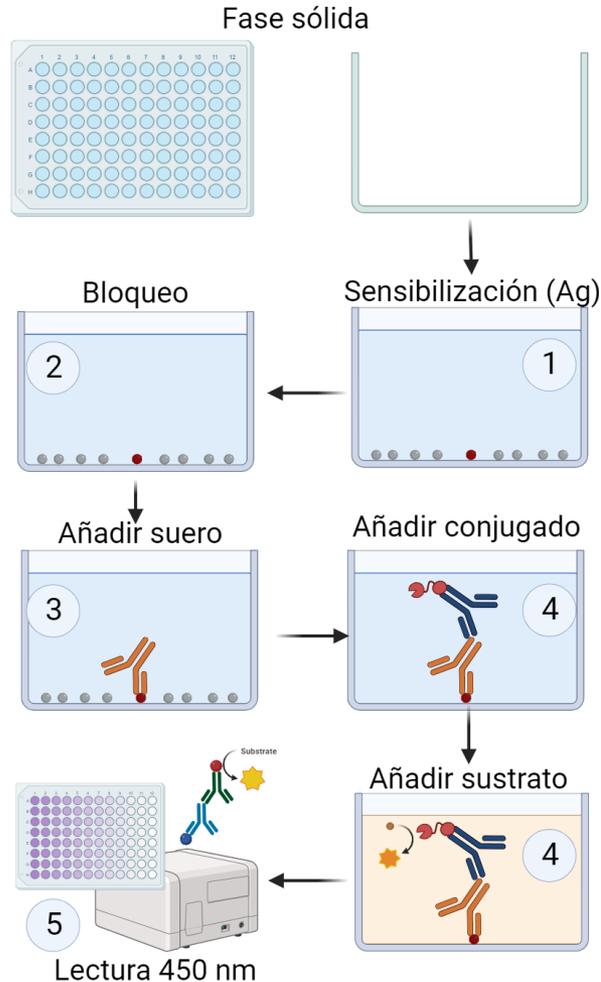
Materiales y métodos

Purificación por cromatografía de afinidad y diálisis de la proteína MSP5r



Materiales y métodos

ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale*



Etapa	Producto	Volumen/Pocillo	Incubación
Sensibilización	Proteína MSP5r diluida en buffer carbono bicarbonato (50 mM, pH=9)	100 µL	Toda la noche a 4°C
Lavado (2 veces)	Solución de lavado (NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%)	200 µL c/lavado	-
Bloqueo	Solución de bloqueo	200	1 h a 37°C
Lavado (2 veces)	Solución de lavado	200 µL c/lavado	-
Adición del suero	Suero bovino diluido en PBS-T con 0.1% Tween 20	100 µL	1 h a 37°C
Lavado (5 veces)	Solución de lavado	200 µL c/lavado	-
Adición del conjugado	Conjugado antibovino diluido en Buffer PBS-T	50 µL	1 h a 37°C
Lavado (5 veces)	Solución de lavado	200 µL c/lavado	-
Adición del cromógeno	Cromógeno TMB	50 µL	Agitación a T amb por 30 min, en oscuridad
Parada de la reacción	Solución de parada	50 µL	-



Materiales y métodos

Validación del ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale*

Controles utilizados

- Controles positivos a PCR y frotis sanguíneo, del banco de sueros del proyecto BruTryp.
- Controles negativos a PCR y frotis sanguíneo, procedentes de la sede IASA-I de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

Determinación del cut-off

1. Promedio de 8 sueros negativos + 2 desviaciones estándar.
2. Curvas ROC.

Tabla de contingencia

		Resultados PCR y frotis sanguíneo	
		Positivo	Negativo
iELISA	Positivo	VP	FP
	Negativo	FN	VN

VP=verdaderos positivos; FP=falsos positivos; FN=falsos negativos; VN=verdadero negativo

Parámetros a calcular:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{FP + VN}$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{VP}{VP + FP} \quad \text{Valor predictivo negativo} = \frac{VN}{VN + FN}$$

$$\% \text{ de falsos positivos} = 100 - \text{sensibilidad}$$

$$\% \text{ de falsos negativos} = 100 - \text{especificidad}$$

$$\text{Exactitud} = \frac{VP + VN}{\text{número total de muestras}}$$

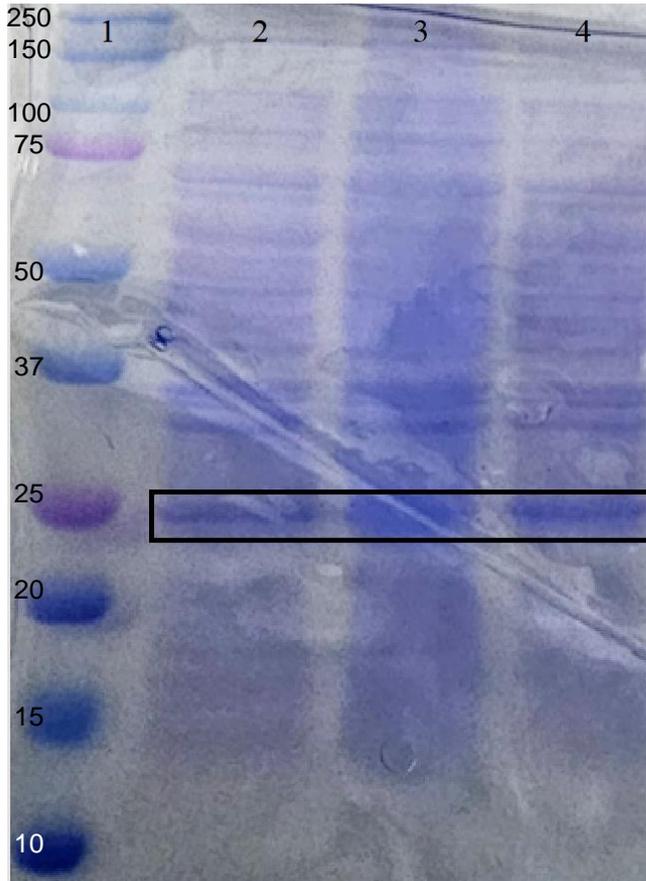
Se analizaron 36 muestras aleatorias procedentes de la Hacienda San José, provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Cumbayá, localidad Ilaló



Resultados y Discusión

Expresión de la proteína MSP5r

Expresión de la proteína MSP5r



⇒ MSP5r (22 kDa)

E. coli como vector de expresión

Selección de cepa

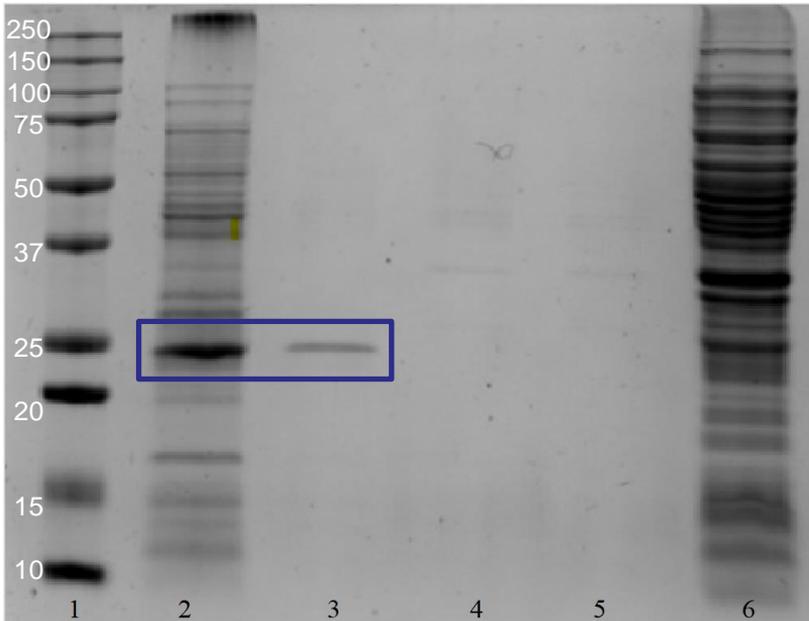
Formación de cuerpos de inclusión

Nota. Carril 1 (Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, CA, USA), carril 2 (MSP5r-1), carril 3 (MSP5r-2) y carril 4 (MSP5r-3).

Resultados y Discusión

Lisis bacteriana y purificación de la proteína MSP5r

Lisado bacteriano y proteína MSP5r purificada



Nota. Carril 1 (Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, CA, USA), carril 2 (Lisado bacteriano), carril 3 (MSP5r purificada), carril 4 (lavado pH=6), carril 5 (lavado pH=5.3) y carril 6 (*E.coli* JM109).

1

Lisis mecánica y desnaturalizante

2

Cromatografía por afinidad

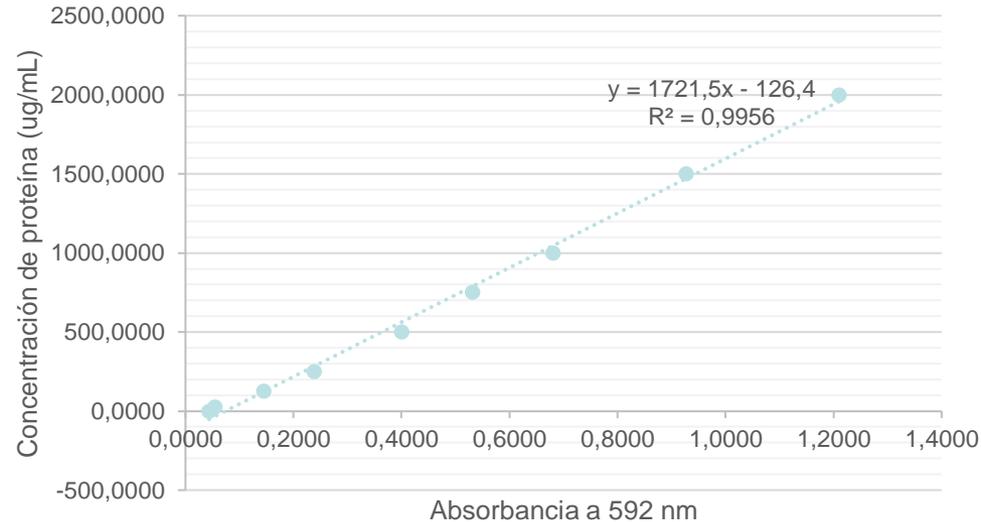
3

Pureza de la proteína MSP5r

Resultados y Discusión

Cuantificación por ensayo BCA

Curva de calibración con agua ultrapura como diluyente



Cuantificación de la proteína MSP5r por BCA

Proteína MSP5r	Concentración de proteína (ng/mL)
MSP5r-1	156,27
MSP5r-2	212,56
MSP5r-3	260,16



Resultados y Discusión

Título óptimo antígeno

Ensayo 1

Ag: 1 ug/mL		Ag: 2 ug/mL		Ag: 3 ug/mL	
CP	CN	CP	CN	CP	CN
0.9954	0.2531	0.8043	0.2669	0.9515	0.2811
1.1120	0.2992	0.8680	0.3384	0.9978	0.4062
0.9264	0.5940	1.0772	0.6796	1.1338	0.8162
1.0003	0.2502	0.7741	0.2259	0.9805	0.2846
1.0615	0.3106	0.8899	0.3507	1.0286	0.3967
0.9381	0.3182	1.0552	0.5990	1.2373	0.6232
2.9793		2.2226		2.2541	

Ensayo 2

Ag: 0.5 ug/mL		Ag: 1 ug/mL	
CP	CN	CP	CN
0.5733	0.2273	1.2058	0.3300
0.5548	0.1968	0.8485	0.2741
0.6907	0.1489	1.2298	0.1901
0.5933	0.2507	0.9884	0.3250
0.5687	0.2390	0.7997	0.2768
0.7135	0.1499	1.2174	0.2483
3,0465		3,8250	

A tomar en cuenta:

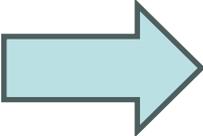
- Bandas inespecíficas
- Grado de pureza
 - Especificidad
 - Sensibilidad



Resultados y Discusión

Título óptimo solución de bloqueo

Ensayo 3



Leche descremada en polvo (5%)		Leche TRU descremada (5%)		Leche TRU descremada (10%)		Leche TRU descremada (100%)	
CP	CN	CP	CN	CP	CN	CP	CN
1.7359	0.3230	2.3454	0.4046	2.3970	0.4323	2.2897	0.5795
1.3598	0.2418	1.6949	0.5672	1.8589	0.5352	1.8565	0.7935
1.0618	0.4028	1.3649	1.0281	1.4802	0.7168	1.4853	1.0518
2.1383	0.3560	2.3468	0.4273	2.4419	0.4108	2.1046	0.5745
1.5966	0.2305	1.6815	0.5281	1.8034	0.6011	1.8097	0.8555
0.9028	0.4885	1.3306	0.8315	1.4318	0.8206	1.4824	0.8668
4,3059		2,8425		3,2453		2,3357	

Evita

- Uniones inespecíficas
- Ruido de fondo
- Falsos positivos

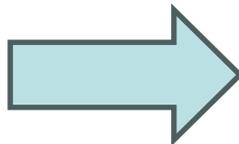
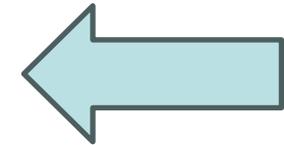


Resultados y Discusión

Diluciones del suero

Ensayo 4

Ac1: 1/50		Ac1: 1/100		Ac1: 1/200	
CP	CN	CP	CN	CP	CN
1.0743	0.6028	0.9202	0.3266	0.4748	0.2294
1.1822	0.4346	0.9820	0.3284	0.4368	0.1919
1.0895	0.4597	0.9152	0.2509	0.5924	0.1550
0.9715	0.5730	0.9010	0.4793	0.4892	0.2258
1.1692	0.4460	0.9346	0.3529	0.4926	0.1968
1.0626	0.4586	0.9330	0.3159	0.6449	0.1430
2,2017		2,6595		2,7415	



Ensayo 5

Ac1: 1/200		Ac1: 1/400	
CP	CN	CP	CN
0.8043	0.2669	0.6319	0.2453
0.8680	0.3384	0.9127	0.3441
1.0772	0.2514	0.9784	0.5016
0.7741	0.2259	0.6119	0.2355
0.8899	0.3507	0.7681	0.3333
1.0552	0.2836	0.9220	0.5244
3,1852		2,2090	



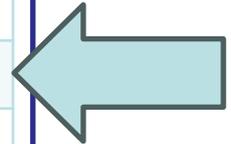
ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

Resultados y Discusión

Diluciones del conjugado

Ensayo 6

Ac2: 1/10000		Ac2: 1/15000		Ac2: 1/20000	
CP	CN	CP	CN	CP	CN
2.8227	0.7485	2.6445	0.6726	1.9458	0.4908
2.4703	0.6713	2.1983	0.5576	1.5851	0.4330
2.6763	0.8213	2.2453	0.6885	1.7226	0.4370
2.8560	0.6952	2.6227	0.6141	1.9235	0.4554
2.5200	0.6562	2.3096	0.5919	1.5984	0.4587
2.5270	0.7538	2.3651	0.7934	1.5847	0.5365
3,6519		3,6715		3,6856	



Resultados y Discusión

Determinación del cut-off

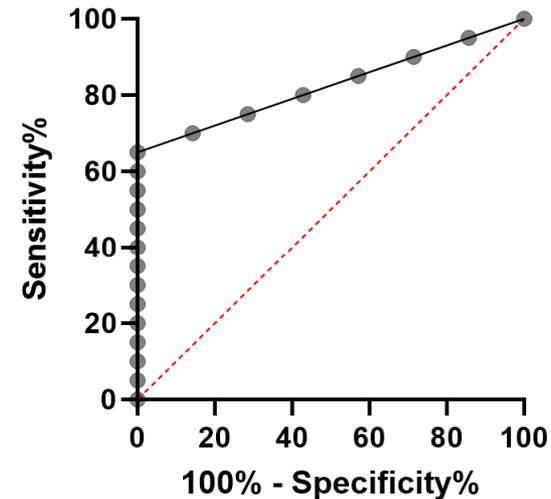
Controles negativos

Código del suero	Densidades ópticas
SuBo-002-R IASA	0.5589
SuBo-2022 IASA	0.6332
SuBo-2023 IASA	0.4773
SuBo-2308 IASA	0.5539
SuBo-2311 IASA	0.6276
2312-IASA Control -	0.5747
SuBo-2312 IASA	0.6277
SuBo-23117 IASA	0.5960

Determinación del cut-off

Parámetro	Valor
Desviación estándar	0.0525
Promedio	0.5812
Cut-off	0.6862

Curva ROC



- Cut-off = 0,6305
- Sensibilidad = 70%
- Especificidad = 85,71%
- Área bajo la curva = 0,8250



Resultados y Discusión

Validación del ELISA estandarizado

- Se compararon muestras positivas (14) y negativas (12) a *A.marginale* por PCR y frotis sanguíneo, frente a los resultados obtenidos mediante el iELISA estandarizado

Parámetros de validación del ELISA

Resultados tabla de contingencia

		Resultados PCR y frotis sanguíneo		Total
		Positivos	Negativos	
iELISA	Positivo	10	2	12
	Negativo	4	10	14
Total		14	12	26

Parámetro	Resultado (%)
Sensibilidad	71.43
Especificidad	83.33
Valor predictivo positivo	83.33
Valor predictivo negativo	71.43
% de falsos positivos	28.57
% de falsos negativos	16.67
Exactitud	76.92



Resultados y Discusión

Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *A. marginale* en bovinos de altura

Número de muestra	Densidad óptica	Resultado
1	2.0685	Positivo
2	1.5582	Positivo
3	2.2249	Positivo
4	1.6953	Positivo
5	2.1073	Positivo
6	2.1308	Positivo
7	1.1948	Positivo
8	1.5876	Positivo
9	1.0843	Positivo
10	1.2328	Positivo
11	1.2429	Positivo
12	1.1177	Positivo
13	1.7620	Positivo
14	1.6891	Positivo
15	1.4809	Positivo
16	1.3950	Positivo
17	1.1602	Positivo
18	1.3080	Positivo

Número de muestra	Densidad óptica	Resultado
19	1.4970	Positivo
20	2.0752	Positivo
21	1.2757	Positivo
22	1.4404	Positivo
23	1.4099	Positivo
24	1.9255	Positivo
25	1.3091	Positivo
26	1.3380	Positivo
27	1.1030	Positivo
28	1.4228	Positivo
29	1.1162	Positivo
30	1.4101	Positivo
31	1.4417	Positivo
32	1.5313	Positivo
33	1.3683	Positivo
34	1.3279	Positivo
35	1.4214	Positivo
36	2.2861	Positivo



Conclusiones

- Al expresar y purificar la proteína MSP5r se logró una concentración máxima de proteína de 260.16 ng/mL, así como una pureza adecuada para ser utilizado en el ensayo ELISA.
- El protocolo del ELISA indirecto contra IgG para *A. marginale* se estandarizo con: MSP5r como antígeno a una concentración de 1 ug/mL, dilución del suero 1/200 y dilución del conjugado 1/20000.
- Se determinó la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *A. marginale* en el 100% de los bovinos de altura de la localidad de Ilaló analizados.
- La técnica ELISA estandarizada en el presente estudio permitió crear una técnica sensible y especifica que podría ser utilizada para la detección de IgG contra *A. marginale* en estudios epidemiológicos



Recomendaciones

- El proceso de diálisis de la proteína MSP5r purificada puede realizarse mediante una filtración por centrifugación con tubos Amicon, para aumentar la concentración de proteína obtenida.
- En la recuperación de la proteína dializada de las membranas de celulosa se debe tener cuidado de recuperar toda la proteína, sin importar que esta se encuentre en estado sólido o líquido.
- Para evaluar la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *A. marginale* en bovinos de altura, se podría analizar un mayor número de muestras, ampliando también, las localidades de donde provienen los bovinos.



Agradecimiento

A mis tutores



Dra. María Augusta Chávez Larrea

Dr. Jorge Ron



Dr. Armando Reyna

Ing. Cristina Cholota



A mis padres, familia, novia y

amigos

