



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

Acosta Gavilánez, Alexander Javier

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo

Chávez Larrea María Augusta, PhD (c)

30 de agosto de 2023

## Hoja de resultados de la herramienta de análisis Urkund



### REVISION 4 - TESIS ALEXANDER ACOST...

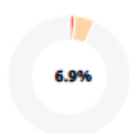
#### Scan details

Scan time: August 29th, 2023 at 14:31 UTC

Total Pages: 48

Total Words: 11824

#### Plagiarism Detection



Types of plagiarism		Words
Identical	1.5%	180
Minor Changes	0%	5
Paraphrased	5.3%	628
Omitted Words	0%	0

#### AI Content Detection



Text coverage

- AI text
- Human text

#### Plagiarism Results: (27)

[Producción de antígenos y estandarización de un EL...](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s2007-112420220...) 1.4%

<https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s2007-112420220...>

Servicios Personalizados Revista Scielo Analytics Google Scholar H5M5 ...

[Evaluación y mejoramiento del ensayo Inmunoenzi...](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0798-...) 1.2%

[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0798-...](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0798-...)

Servicios Personalizados Revista Scielo Analytics Google Scholar H5M5 ...

[Pradere, Pecari](http://ve.scielo.org/pdf/rfvcv/v55n2/art07.pdf) 0.7%

<http://ve.scielo.org/pdf/rfvcv/v55n2/art07.pdf>

Yraceles J.

Rev. Fac. Cs. Vets. UCV. 55(2):112-123. 2014 Parasitología Mecanismos de Variación Antigénica en Anaplasma marginale Mechanisms of Anti...





Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

### Certificación

Certifico que el trabajo de integración curricular: Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *Anaplasma marginale* en ganado bovino de altura, mediante un ELISA indirecto, fue realizado el señor Acosta Gavilánez Alexander Javier el mismo que cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, además fue revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de prevención y/o verificación de similitud de contenidos; razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que se lo sustente públicamente.

Sangolquí, 29 de agosto de 2023



Chávez Larrea, María Augusta Chávez, M. Sc.

C. C. 0201274842



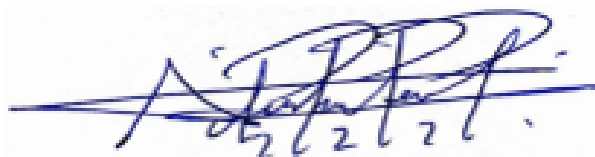
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Responsabilidad de Autoría

Yo, Acosta Gavilánez Alexander Javier, con cédula de ciudadanía N° 1804327037, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *Anaplasma marginale* en ganado bovino de altura, mediante un ELISA indirecto, 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.

Sangolquí, 29 de agosto de 2023



Acosta Gavilánez Alexander Javier

C.C.: 1804327037



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Biotecnología

Autorización de Publicación

Yo, Acosta Gavilánez Alexander Javier, con cédula de ciudadanía N° 1804327037, autorizó a la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *Anaplasma marginale* en ganado bovino de altura, mediante un ELISA indirecto, en el Repositorio institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son mi responsabilidad.**

Sangolquí, 29 de agosto de 2023

Acosta Gavilánez Alexander Javier

C.C.: 1804327037

### **Dedicatoria**

*A mis padres, Iván y Fanny; a mi segunda mamá, Juanita; a mis hermanos, Roberto y Viviana; a mis sobrinos, Max y Victoria; a mi cuñado, David; a mi compañera de vida, Laura, por ser los pilares constantes y mi apoyo incondicional durante todo el proceso.*

**Alexander Javier Acosta Gaviláñez**

## **Agradecimientos**

*A mis padres, Iván y Fanny, por todo su amor, guía, ejemplo y esfuerzo para que pueda lograr lo que me proponga en la vida.*

*A mi segunda mamá, Juanita, por todo su cariño y comprensión en todo momento.*

*A mis hermanos, Viviana y Roberto; a mi cuñado, David, por su apoyo incondicional y por cada consejo que me han hecho crecer como persona.*

*A mis sobrinos, Max y Victoria, por ser esa alegría en cada momento difícil que me hacía falta.*

*A Laura, por ser mi amor, amiga y confidente, por todo el tiempo que me ha brindado, y la paciencia y cariño sincero que me ha demostrado.*

*A mis amigos, Jorge y Jesús, por cada momento que hemos compartido, tanto buenos como malos, gracias por su amistad sincera.*

*A la Dra. María Augusta Chávez, al Dr. Armando Reina y al Dr. Jorge Ron, por su guía, ayuda y apertura durante el desarrollo de mi proyecto integrador profesionalizante.*

*A la Ing. Cristina Cholota, por toda la orientación, enseñanza, paciencia y tiempo, a lo largo de la fase de experimentación de este trabajo.*

*Al proyecto de vinculación “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y la sensibilización, al diagnóstico y al desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y de la tripanosomiasis en Ecuador – BruTryp” (CV-GNP-0056-2020) (ARES – ULg – ESPE), por brindar el material necesario y financiamiento del proyecto.*

**Alexander Javier Acosta Gavilánez**

## Índice de contenido

Dedicatoria .....	6
Agradecimientos .....	7
Abreviaturas .....	14
Resumen.....	15
Abstract .....	16
Capítulo I: Introducción.....	17
Formulación del problema .....	17
Justificación del problema.....	18
Objetivos.....	19
Objetivo general .....	19
Objetivos específicos .....	20
Hipótesis.....	20
Capítulo II: Marco teórico.....	21
Clasificación taxonómica de <i>Anaplasma marginale</i> .....	21
Hospedadores o animales susceptibles .....	21
Transmisión.....	22
Ciclo evolutivo .....	22
Signos clínicos .....	24
Distribución en América del Sur y Ecuador .....	25
Diagnóstico.....	26



Frotis de sangre.....	26
Prueba serológica ELISA .....	27
Antígenos a base de proteínas recombinantes para el diagnóstico .....	27
Proteína MSP5 .....	28
Expresión de proteínas recombinantes .....	29
Purificación de proteínas recombinantes .....	30
Capítulo III: Materiales y métodos .....	32
Participantes.....	32
Zona de Estudio .....	32
Material de Trabajo .....	32
Duración de la investigación.....	32
Obtención de la proteína MSP5r .....	33
Expresión de la proteína MSP5 recombinante en bacterias transformadas E. coli pAR1903 .....	33
Lisis bacteriana.....	34
Purificación de la proteína MSP5r mediante cromatografía por afinidad.....	34
Electroforesis vertical SDS-PAGE .....	35
Diálisis .....	36
Cuantificación por ensayo BCA de la proteína MSP5r .....	36
Controles positivos y negativos .....	37
ELISA indirecto anti-IgG contra A. marginale.....	38

Determinación del cut off.....	39
Validación del ELISA estandarizado.....	39
Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra <i>A. marginale</i> en bovinos de altura.....	40
Análisis estadístico.....	41
Capítulo IV: Resultados .....	42
Expresión de la proteína MSP5r en bacterias transformadas <i>E. coli</i> pAR1903 .....	42
Lisis bacteriana .....	43
Purificación de la proteína MSP5r mediante cromatografía por afinidad. ....	44
Diálisis .....	44
Cuantificación por ensayo BCA de la proteína MSP5r. ....	45
Estandarización del ELISA indirecto anti-IgG contra <i>A. marginale</i> .....	46
Ensayo 1 .....	46
Ensayo 2.....	47
Ensayo 3.....	48
Ensayo 4.....	49
Ensayo 5.....	49
Ensayo 6.....	50
Determinación del cut-off .....	51
Determinación del cut off, sensibilidad y especificidad por curvas ROC.....	51
Validación del ELISA estandarizado.....	52

Determinación de la presencia de anticuerpos tipo IgG contra <i>A. marginale</i> en bovinos de altura.....	54
Capítulo V: Discusión .....	56
Capítulo VI: Conclusiones .....	61
Capítulo VII: Recomendaciones .....	62
Referencias .....	63
Apéndices .....	75

## Índice de tablas

Tabla 1. Preparación de geles de poliacrilamida. ....	35
Tabla 2. Preparación de las diluciones del estándar (BSA). ....	37
<b>Tabla 3.</b> ELISA indirecto anti-IgG contra <i>A. marginale</i> .....	38
Tabla 4. Tabla de cuatro casillas.....	39
<b>Tabla 5.</b> OD <sub>280</sub> posterior al lavado con buffer de lavado (pH=5.3) .....	44
Tabla 6. Cuantificación mediante espectrofotometría.....	45
Tabla 7. Cuantificación por BCA .....	46
Tabla 8. Ensayo 1. Valores de las densidades ópticas de tres concentraciones de antígenos	47
Tabla 9. Ensayo 2. Valores de las densidades ópticas de dos concentraciones de antígenos	47
Tabla 10. Ensayo 3. Valores de las densidades ópticas de cuatro soluciones de bloqueo ..	48
Tabla 11. Ensayo 4. Valores de las densidades ópticas de tres diluciones de suero .....	49
Tabla 12. Ensayo 5. Valores de las densidades ópticas de dos diluciones de suero.....	50
Tabla 13. Ensayo 6. Valores de las densidades ópticas de tres diluciones de conjugado....	50
Tabla 14. Sueros negativos usados para determinar cut-off.....	51
Tabla 15. Tabla de contingencia con sueros validados con PCR y frotis sanguíneo .....	53
Tabla 16. Parámetros de validación del ELISA.....	53
Tabla 17. Resultado de las muestras de la localidad Ilaló.....	54
Tabla 18 Resultado de las muestras de la localidad Ilaló.....	54

### Índice de figuras

Figura 1. Expresión de la proteína MSP5r .....	42
Figura 2. Lisado bacteriano y purificación de la proteína MSP5r .....	43
Figura 3. Curva de Calibración con agua destilada autoclavada como diluyente.....	45
Figura 4. Curva ROC .....	52

### Abreviaturas

<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
<b>g</b>	Fuerza centrífuga relativa
<b>h</b>	Hora
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LB</b>	Luria – Bertani
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramo
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>min</b>	Minuto
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>MSP5</b>	Proteína de superficie de membrana 5
<b>MSP5r</b>	Proteína de superficie de membrana 5 recombinante
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>OD<sub>280</sub></b>	Densidad óptica medida a 280 nanómetros
<b>OD<sub>600</sub></b>	Densidad óptica medida a 600 nanómetros
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>s</b>	Segundo
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramo
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b>V</b>	Voltios
<b>%</b>	Porcentaje

## Resumen

La anaplasmosis bovina es una enfermedad producida por *Anaplasma marginale*, una bacteria intracelular obligada que afecta a los glóbulos rojos parasitándolos, esta infección posee varios hospederos entre los que destacan rumiantes y ungulados. La transmisión de la enfermedad puede darse de forma mecánica y biológica. La prevalencia en América Latina es muy alta y causa grandes pérdidas económicas, por lo cual se requiere el desarrollo de pruebas serológicas de diagnóstico.

Entre las pruebas de diagnóstico utilizadas para la detección de *A. marginale* destaca el ensayo ELISA, mismo que se ha estudiado usando a las proteínas mayores de superficie como antígeno para la detección de anaplasmosis bovina.

En el presente estudio, se estandarizó un ensayo ELISA indirecto anti IgG contra *A. marginale*, para esto primero se expresó y purificó, mediante cromatografía de afinidad, la proteína MSP5 que se utilizara como antígeno en la prueba diagnóstico, misma que se verificó mediante electroforesis SDS-PAGE y se obtuvo a una concentración máxima de 260.16 ng/mL. El ensayo ELISA indirecto se estandarizó con una concentración de antígeno de 1 ug/mL, una dilución de anticuerpo primario de 1/200 y una dilución de anticuerpo secundario de 1/20000. El cut-off fue de 0.6305 y presentó una sensibilidad del 70% y una especificidad del 85.71%. Finalmente, se determinó la presencia de anticuerpos tipo IgG utilizando iELISA previamente estandarizado en ganado bovino de altura, en donde se analizaron 36 muestras de la localidad del Ilaló de las cuales el 100% resultó positivas.

*Palabras clave:* *Anaplasma marginale*, MSP5, ELISA, anaplasmosis bovina.

### Abstract

Bovine anaplasmosis is a disease caused by *Anaplasma marginale*, an obligate intracellular bacterium that affects red blood cells by parasitizing them. This infection has several hosts, among which ruminants and ungulates stand out. Disease transmission can occur mechanically and biologically. The prevalence in Latin America is very high and causes great economic losses, for which the development of diagnostic serological tests is required.

Among the diagnostic tests used for the detection of *A. marginale*, the ELISA assay stands out, which has been studied using the major surface proteins as antigen for the detection of bovine anaplasmosis.

In the present study, an indirect anti-IgG ELISA assay against *A. marginale* was standardized. For this, the MSP5 protein to be used as antigen in the diagnostic test was first expressed and purified by affinity chromatography, which was verified by electrophoresis. SDS-PAGE and a maximum concentration of 260.16 ng/mL was obtained. The indirect ELISA assay was standardized with an antigen concentration of 1 ug/mL, a primary antibody dilution of 1/200, and a secondary antibody dilution of 1/20,000. The cut-off was 0.6305 and presented a sensitivity of 70% and a specificity of 85.71%. Finally, the presence of IgG type antibodies was determined using iELISA previously standardized in high altitude cattle, where 36 samples from the town of Ilaló were analyzed, of which 100% were positive.

*Keywords:* *Anaplasma marginale*, MSP5, ELISA, bovine anaplasmosis.



## Capítulo I: Introducción

### Formulación del problema

La anaplasmosis es una enfermedad bacteriana que afecta a una gran cantidad de especies animales e incluso al hombre. Las especies de *Anaplasma* más importantes que afectan a animales son, *A. ovis*, *A. capra*, *A. marginale*, *A. bovis* y *A. platys*. *A. phagocytophilum*, es un patógeno zoonótico emergente que afecta a humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, burros, camellos y jabalíes, causando anaplasmosis granulocítica. La anaplasmosis bovina es producida principalmente por *A. marginale*, la cual ocasiona importantes pérdidas económicas en los sistemas de producción bovina (Zhang et al., 2022).

La anaplasmosis bovina se transmite a los huéspedes animales principalmente a través de las garrapatas, y se han confirmado experimentalmente 20 especies de garrapatas como vectores eficientes de *A. marginale*. Sin embargo, también existe vectores mecánicos como moscas chupadoras de sangre, cualquier equipo contaminado con sangre y la infección transplacentaria como medios de transmisión (Asif et al., 2022).

En el ganado bovino el desarrollo de la enfermedad clínica depende de la edad en el momento de la infección, así como de factores como la raza del ganado, la virulencia de la cepa, la abundancia de vectores y otros factores que afectan la salud animal, como la cría. Cuando los animales jóvenes (<6 meses de edad) se infectan, generalmente no desarrollan la enfermedad clínica. Por el contrario, cuando se infectan animales maduros, puede producirse una enfermedad clínica grave, con tasas de letalidad que alcanzan el 49 % en el ganado infectado después de los dos años. Los animales que sobreviven a la infección desarrollan un estado de portadores de por vida y están libres de anaplasmosis clínica posterior (Tucker et al., 2016).

En Brasil, la anaplasmosis bovina se considera endémica, causa parasitemia persistente en bovinos de carne y leche de todas las edades. La infección persistente posibilita nuevas infecciones a través de la picadura de artrópodos vectores que circulan entre animales parasitados y animales sanos. Las prevalencias moleculares de esta enfermedad varían según la región de Brasil. En São Paulo, cerca del 98% del ganado es positivo para *A. marginale*, utilizando la técnica de PCR cuantitativa. La anaplasmosis se ha descrito en varios lugares del mundo, incluso donde no existe una enfermedad endémica, y esto se ha atribuido al transporte de ganado (Garcia et al., 2022). Se ha estimado en trabajos anteriores que esta bacteria cuesta más de USD 300 millones anuales a la industria ganadera de EE. UU. y más de USD 800 millones en toda América Latina (Aspinwall et al., 2023).

### **Justificación del problema**

Actualmente, existen diferentes cepas de *A. marginale* a nivel mundial, con diversos comportamientos epidemiológicos, virulencia, patogenicidad, adaptación a nichos ecológicos e inducción de la respuesta inmune del huésped. Las principales proteínas de superficie de membrana (MSP1a, MSP4 y MSP5) se han utilizado para la caracterización molecular de las cepas, ya que son genes únicos que no varían antigénicamente dentro de los aislamientos. En el caso de MSP1, la diversidad genética, la evolución de las relaciones huésped-patógeno y vector-patógeno, y la transmisibilidad de los fenotipos, se ha informado en base a su genoma. Además, estas secuencias se pueden usar para comparar cepas en una región dada (Parodi et al., 2022).

Las proteínas mayores de superficie han sido ampliamente utilizadas como antígenos para el desarrollo de técnicas diagnósticas como ELISA, en el caso del ELISA competitivo utilizando MSP5, se ha demostrado su eficiencia en el diagnóstico y su reactividad frente a

diferentes cepas como: *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*. La técnica ELISA indirecto con MSP5 es una prueba serológica confiable similar al ELISA competitivo. MSP5 ha demostrado su eficacia como antígeno de diagnóstico y se ha utilizado en la serodetección de la infección por *Anaplasma* spp. en varios animales, incluidos rumiantes, equinos y caninos, con un alto nivel de sensibilidad (Zhang et al., 2022).

En el Ecuador, la anaplasmosis bovina ocasionada por *A. marginale* ha sido reportada en varias regiones, en un estudio realizado por Chavez (2023) en dos mataderos del Ecuador, estimó una prevalencia del 60,1 % (Chávez et al., 2023) en los bovinos sacrificados. En otro estudio realizado en la provincia de Zamora Chinchipe de la región amazónica, se determinó una prevalencia del 63.8 % (Muñoz Guarnizo et al 2020) y recientemente también se ha evidenciado en las islas Galápagos (Gioia et al., 2018). En el país al momento no existe una técnica serológica de detección rápida en el ganado bovino que permita ampliar los estudios epidemiológicos a gran escala en las fincas ganaderas, dicho campo de investigación no ha sido explorado a profundidad en el contexto ecuatoriano, por lo que, será de gran utilidad para la evaluación diagnóstica a nivel de hacienda y animal. El estudio, emitirá información significativa para la detección de *A. marginale* en ganado bovino en Ecuador.

## **Objetivos**

### ***Objetivo general***

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

### **Objetivos específicos**

- Obtener la proteína recombinante 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.

## Capítulo II: Marco teórico

### Clasificación taxonómica de *Anaplasma marginale*

*A. marginale* es una bacteria intracelular obligada del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae, que parasita los glóbulos rojos y es el agente causal de la anaplasmosis bovina, que es endémica en las zonas templadas, tropicales y subtropicales de todo el mundo (Aspinwall et al., 2023), se encuentra exclusivamente dentro de las vacuolas unidas a la membrana en el citoplasma de los eritrocitos de los rumiantes. *A. marginale* causa anaplasmosis bovina en animales domésticos y salvajes (Casa et al., 2020).

### Hospedadores o animales susceptibles

*A. marginale* afecta a rumiantes domésticos y silvestres, de igual manera, se sabe que *Anaplasma* spp. puede infectar a ciertas especies de ungulados silvestres (Mínguez, 2021), pero cada vez hay más pruebas de que puede estar implicada en una amplia variedad de huéspedes, como: jirafa (*Giraffa camelopardalis*), el búfalo africano (*Bison bison*), el eland (*Taurotragus oryx*), el kudú mayor (*Tragelaphus strepsiceros*), el nyala (*Tragelaphus angasi*) y el antilope (*Antilope cervicapra*) (van Vuuren & Penzhorn, 2015).

Las infecciones por *Anaplasma* se mantienen fácilmente en las poblaciones de ganado. En el análisis hecho por Parker et al., 1985, se estudió la resistencia a la infección por *A. marginale* entre las razas *Bos indicus* y *Bos taurus*, evidenciando que *Bos indicus* posee mayor resistencia. La importancia, si la hay, de los ungulados salvajes como reservorio para la transmisión de *Anaplasma* spp. al ganado es desconocido (International Development Research Centre, 2016; Rajput et al., 2005).

## Transmisión

La transmisión de *A. marginale* al ganado susceptible ocurre de forma mecánica y biológica y en casi todos los métodos de transmisión parecen depender de la cepa de anaplasmosis, ya que no todas las cepas son infecciosas para las garrapatas o transmisibles por las moscas (Randall, 2019).

La forma mecánica puede darse mediante instrumentos veterinarios como: agujas contaminadas, equipo de castración y marcado, instrumentos quirúrgicos y otras herramientas que pueden servir como fómite para la transferencia de sangre del ganado infectado con anaplasmosis al ganado sin tratamiento previo (Randall, 2019).

La forma biológica de transmisión de *Anaplasma spp.*, ocurre por garrapatas, las cuales ingieren eritrocitos infectados donde la bacteria se replica en el intestino y la glándula salival de la garrapata. Luego, la garrapata puede pasar la bacteria a un huésped no infectado a través de la saliva durante la alimentación (Estrada et al., 2020). La capacidad de una garrapata para obtener la bacteria de un huésped infectado depende de la aparición de la enfermedad. En la fase aguda de la enfermedad, el 95-100% de las garrapatas que se alimentan del animal infectado se infectarán. En cambio, la probabilidad se reduce al 27-84% cuando se alimenta de un animal en fase crónica (Torres et al., 2021).

El último método de transmisión que se ha identificado es la transmisión transplacentaria, que ocurre cuando el ganado hembra adulto transmite la enfermedad a su descendencia (Randall, 2019).

## Ciclo evolutivo

Tras la transmisión al huésped, *A. marginale* tiene que infectar el citoplasma de los eritrocitos del huésped para replicarse y sobrevivir. Dentro de los eritrocitos, se forman inclusiones

unidas a la membrana con alrededor de 4 a 8 rickettsias (Barrera & Rodríguez, 2020). Después de que los eritrocitos del ganado se infectan con este patógeno, hay un período de incubación en el que el patógeno se replica en las células sanguíneas infectadas, duplicándose cada 24 horas (Cardona Arias et al., 2019).

La replicación continúa hasta el punto en que al menos el 1% de los eritrocitos del huésped están infectados. Este proceso suele ocurrir en un período de 3 a 8 semanas. Para determinar si un animal tiene una infección activa por *Anaplasma*, al menos el 15% de todos los eritrocitos deben estar parasitados. Por lo tanto, para que se caracterice la anaplasmosis aguda, el nivel de rickettsemia debe superar los 109 eritrocitos infectados por mL (Mabizari, 2019).

Los huéspedes en la etapa de incubación normalmente no muestran signos clínicos, aunque en algunos casos puede presentarse una fiebre leve. Una vez que los eritrocitos infectados son detectables, el sistema inmunitario del huésped comienza a enviar células reticuloendoteliales bovinas para fagocitar los eritrocitos infectados. Esta etapa puede durar de 4 a 9 días y el huésped mostrará signos de anemia severa. Si el huésped sobrevive a la etapa de desarrollo de la enfermedad, entra en un período de recuperación denominado etapa de convalecencia (Calleja et al., 2019).

Esta etapa se caracteriza por un período de 2 a 3 meses en el que el cuerpo del huésped intenta reponer los niveles de eritrocitos a la normalidad. Una vez que esta etapa termina, el huésped ingresa a la etapa de portador donde se convierte en portador del patógeno de por vida. A pesar de no experimentar ningún signo clínico de enfermedad en esta etapa, la sangre transferida de un huésped portador a uno susceptible inducirá anaplasmosis en el huésped susceptible (Calleja et al., 2019).

## Signos clínicos

El signo clínico principal de la anaplasmosis es la anemia causada por la pérdida de eritrocitos debido a la activación de la respuesta inmunitaria. Este signo se puede identificar por debilidad y letargo en el ganado (Estrada et al., 2020). Otros signos de enfermedad que pueden presentarse son la reducción de la producción de leche, pérdida colosal de peso corporal, fiebre, anorexia, sequedad del hocico, letargo, abortos espontáneos y, finalmente, la muerte por hipoxia. Los abortos por anaplasmosis aguda pueden ocurrir durante la última etapa de la gestación (Mabizari, 2019; Watthanadirek et al., 2019).

El inicio de la enfermedad clínica se caracteriza principalmente por una anemia hemolítica grave. El ganado que sobrevive a la infección aguda se convierte en portador de *A. marginale* y los organismos pueden transmitirse al ganado susceptible mecánicamente o por picadura de garrapata. *A. marginale* persiste en el ganado portador debido a su capacidad para subvertir el sistema inmunitario mediante la variación antigénica en la que se expresan diferentes variantes de proteínas de la membrana externa (Crosby et al., 2014).

Los signos pueden variar de leve a grave, con períodos de recuperación que van desde varios días hasta varios meses según la gravedad, la edad y la etapa de producción. Los signos clínicos de anaplasmosis aparecen con mayor frecuencia en animales mayores, mayores de dos años, mientras que los animales más jóvenes tienen menos probabilidades de presentar signos clínicos graves (Muñoz-Guarnizo et al., 2017). Existen informes anecdóticos de casos clínicos de anaplasmosis, e incluso muertes, en bovinos de hasta 18 meses durante períodos de mayor estrés o presión concomitante de enfermedades (Randall, 2019).

Después de un período prepatente natural, que generalmente varía entre 15 y 36 días (con un promedio de 26 días), aunque puede llegar a los 100 días, puede seguir una anaplasmosis hiperaguda, aguda o crónica (International Development Research Centre, 2016):



- La anaplasmosis hiperaguda, rara y generalmente fatal, ocurre con mayor frecuencia en animales de raza pura y vacas lecheras de alta producción. Además de la anemia, cesa la producción de leche y hay salivación excesiva, respiración acelerada, comportamiento irracional y signos de nerviosismo, después de la aparición de los signos clínicos los animales mueren.
- La forma aguda se caracteriza esencialmente por la palidez de las mucosas, depresión, inapetencia, disminución de la producción de leche, debilidad general y parasitemia de rápido aumento. En algunos animales, la fiebre proporciona evidencia clínica inicial y persistente de anaplasmosis, pero esto no es consistente. El curso de la enfermedad aguda generalmente es prolongado y puede durar dos semanas o más antes de que haya evidencia de mejoría en la condición del animal.
- La anaplasmosis crónica se manifiesta por una recuperación lenta después de una enfermedad aguda y puede persistir por un período de entre dos semanas y tres meses. Se caracteriza por falta de apetito, pérdida de peso y diversos grados de deshidratación, anemia e ictericia que suelen ser más leves que en la enfermedad aguda.

### **Distribución en América del Sur y Ecuador**

En el continente americano, *Anaplasma* spp. se encuentra distribuido en todos los países, en donde tiene carácter de zoonótico y los brotes ocurren esporádicamente ocasionando alta morbilidad y mortalidad especialmente en animales susceptibles. En Argentina, se han detectado brotes de anaplasmosis al sur de la zona endémica debido al movimiento de ganado portador a áreas no endémicas. La anaplasmosis aguda afecta principalmente a bovinos adultos. Se debe destacar que a pesar de que un animal supere la enfermedad aún puede ser un reservorio de la misma (Primo et al., 2019).

En Colombia, se reportó una prevalencia del 90,3% obtenida por prueba de aglutinación; la realización de un ELISA utilizando proteína recombinante MSP5 como antígeno reveló una prevalencia que oscila entre el 47% y el 94% en Venezuela. En Costa Rica se estimó una prevalencia de 20,0 a 72,0% utilizando un kit ELISA/MSP5r (VMRD Inc.™) (Tana-Hernández et al., 2017).

A pesar de la distribución tropical de la anaplasmosis bovina, se ha hecho poco para confirmar la presencia de la enfermedad en el ganado ecuatoriano, a pesar de que los tábanos y las garrapatas *R. microplus* están presentes en Ecuador (Muñoz-Guarniz et al., 2017). Sin embargo, ni la distribución espacio-temporal, ni los factores de riesgo asociados a la enfermedad, ni la caracterización del agente causal han sido profundamente estudiados en el país (Tana-Hernández et al., 2017)

### **Diagnóstico**

El diagnóstico de laboratorio de la anaplasmosis bovina se realiza para la confirmación de la enfermedad en un animal individual, la clasificación epidemiológica de la enfermedad en una población bovina o para la caracterización genómica de la bacteria *Anaplasma*, incluida la diferenciación de cepas o la diferenciación de anticuerpos. En el pasado, varios métodos de prueba para detectar la presencia de anticuerpos contra la anaplasmosis incluían pruebas de fijación del complemento (FC), pruebas de aglutinación rápida en tarjeta (RCA) y frotis de sangre (Al-gharban, 2015).

#### ***Frotis de sangre***

Los frotis de sangre teñidos con Giemsa, Wright-Giemsa o Diff-Quick se utilizan para detectar *A. marginale* y diagnosticar la anaplasmosis bovina durante las fases agudas de la enfermedad. En esta prueba, se preparan frotis de sangre finos para su examen microscópico

utilizando protocolos de tinción estándar. Los frotis se examinan en busca de inclusiones intraeritrocíticas (Al-gharban, 2015). Aunque esta prueba se usa de forma rutinaria para la confirmación de casos clínicos (OIE, 2018) carece de sensibilidad, por ende, no es útil para detectar la enfermedad en bovinos subclínicos o portadores debido al bajo número de células infectadas en circulación, y solo puede detectar >104 parásitos/ml de sangre (Randall, 2019).

### **Prueba serológica ELISA**

ELISA competitivo es otro método de diagnóstico para la infección por *A. marginale* y la anaplasmosis bovina y actualmente es el más preciso (Salinas et al., 2022). La prueba utiliza el anticuerpo monoclonal ANAF16C1 para reconocer MSP5 en *A. marginale* y *A. centrale*. Se detectan anticuerpos séricos que se dirigen a MSP5 y pueden determinar la infección por *Anaplasma spp.* Actualmente cELISA es el método más práctico de prueba para la anaplasmosis bovina en un gran número de bovinos, tiene una sensibilidad del 95% y una especificidad del 98% (Salinas et al., 2022)

Aunque esta prueba es más sensible que los frotis de sangre, tiene una capacidad limitada para diferenciar entre especies de *Anaplasma* cuando ocurre una coinfección entre *A. centrale*, *A. marginale* y *A. phagocytophilum*. Esto se debe a que estas tres especies contienen el antígeno MSP5 y producen los mismos anticuerpos. Otra limitación es la detección de baja sensibilidad en las primeras etapas de la infección (Rodríguez Peraza et al., 2020).

### **Antígenos a base de proteínas recombinantes para el diagnóstico**

*A. marginale* posee varias proteínas de la membrana externa. Algunas se clasifican como proteínas de superficie de membrana (MSP), incluidas MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Watthanadirek et al., 2019). En cuanto a las MSP1a, MSP1b y MSP2, se ha informado sobre la función de estas proteínas que son adhesinas para los eritrocitos bovinos.

Además, también se demostró que la función de MSP1a es la adhesina para las células intestinales de garrapata, mientras que la función de MSP3, MSP4 y MSP5 aún no se ha informado (Watthanadirek & Doungdaolek, 2018).

### **Proteína MSP5**

MSP5 es una proteína inmunodominante codificada por un solo gen. El gen MSP5 está presente en los eritrocitos bovinos en todos los estadios de *A. marginale* (Watthanadirek & Doungdaolek, 2018).

La proteína MSP5, es codificada por el gen MSP5, mismo que se encuentra altamente conservado entre diferentes especies de *Anaplasma*, es de poca complejidad estructural, igualmente conservada e induce altos títulos de anticuerpos, por lo que es un fuerte candidato para el diagnóstico de anaplasmosis bovina (Corona et al., 2009).

El desarrollo de pruebas serológicas para detectar anticuerpos anti-A específicos ha sido muy aplicado, y se ha demostrado que las pruebas serológicas no pueden distinguir entre animales infectados o no infectados, sin embargo, estos anticuerpos específicos se usan para la eliminación de reactivos positivos cuando se introduce o compra ganado en un área libre de anaplasmosis. La eficacia de la prueba es de gran importancia y los datos serológicos también pueden ser valiosos para evaluar la eficacia de la vacuna (Salinas et al., 2022).

La Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), recomienda kits ELISA comerciales para la detección de anticuerpos contra *A. marginale*. Estos incluyen un ELISA de competencia (cELISA) basado en una proteína MSP5 recombinante y un kit ELISA indirecto convencional (iELISA) también basado en rMSP5, también recomienda el uso de iELISA interno (Salinas et al., 2022).

## **Expresión de proteínas recombinantes**

La proteína recombinante se origina a partir de la tecnología del ADN recombinante, es decir, la unión de moléculas de ADN de diferentes fuentes. El ADN recombinante es, por ejemplo, la combinación de un vector de ADN y un fragmento de ADN insertado. Las proteínas recombinantes se expresan a partir de moldes de ADN clonados (Langlais, 2009).

La expresión de proteínas recombinantes en bacterias requiere la inserción de un fragmento de ADN en un vector de expresión, habitualmente un vector plasmídico y la transferencia de este vector a células bacterianas. A continuación, las células se cultivan y se inducen a expresar la proteína deseada (González & Fillat, 2018). Las células se recogen mediante centrifugación, las muestras se preparan y las proteínas se detectan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y posterior tinción del gel con Coomassie Brilliant Blue o tinción de plata o mediante inmunotransferencia. La expresión de proteínas en bacterias es altamente escalable y se puede ajustar desde crecimiento sólido (expresión de colonias), matraces cónicos para cultivos líquidos, cámaras de reacción de fermentación (Langlais, 2009).

El creciente campo de la proteómica está dando como resultado una demanda cada vez mayor de producción y purificación de proteínas recombinantes para estudios estructurales y funcionales, ya que puede llevar mucho tiempo aislar proteínas de baja abundancia de su fuente nativa en tejidos o células (González & Fillat, 2018). Por lo tanto, los métodos de alto rendimiento para la expresión y caracterización de proteínas recombinantes son esenciales para obtener cantidades suficientes de proteína para su uso en investigación. Una ventaja de la expresión de proteínas recombinantes es que la proteína seleccionada se puede expresar con una etiqueta de fusión como His-Tag/6xHis, GST y MBP, lo que puede facilitar considerablemente la identificación y purificación de la proteína, así como mejorar tanto el nivel de expresión como la solubilidad (Vargas, 2017).

La expresión de proteínas recombinantes en células bacterianas se ha convertido en el método más común para expresar grandes cantidades de proteína y *E. coli* es el sistema de expresión procariótico más utilizado para la producción de alto nivel de proteínas recombinantes (Andrade et al., 2021). El uso de *E. coli* tiene muchas ventajas, incluida la facilidad de crecimiento y manipulación del organismo, la disponibilidad de muchos vectores diferentes y cepas huésped que se han desarrollado a lo largo de los años y la cantidad de información sobre la genética y la fisiología de *E. coli*. Sin embargo, el sistema de expresión de *E. coli* también tiene limitaciones, como la incapacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas (Langlais, 2009).

Otro problema puede ser la producción de proteínas mal plegadas o agregadas en cuerpos de inclusión insolubles o problemas con la expresión de productos génicos tóxicos. Algunos productos genéticos pueden ser tóxicos para el huésped bacteriano, alterar el metabolismo normal y causar que las bacterias mueran o reduzcan su tasa de crecimiento, lo que hace casi imposible generar cantidades suficientes de proteína para análisis posteriores (Andrade et al., 2021).

### **Purificación de proteínas recombinantes**

Hay varios vectores disponibles que permiten la expresión de proteínas recombinantes que están fusionadas en su extremo N-terminal o C-terminal con polipéptidos o secuencias de aminoácidos más largas. Estas etiquetas pueden facilitar enormemente la purificación de la proteína expresada, ya que se unen a las resinas de afinidad. Algunas de las etiquetas más populares incluyen la etiqueta 6×His (que se une a la resina Ni-NTA), GST (que se une a la glutatión-Sepharose), la proteína de unión a maltosa (MBP, que se une a la resina de amilosa) o la proteína A estafilocócica (que se une a la resina de amilosa) (Duong-Ly & Gabelli, 2015).

Se han ideado protocolos de purificación simples para estas y otras etiquetas, lo que hace que el uso de una etiqueta sea uno de los métodos más comunes para limpiar una proteína. Pueden incluirse sitios de escisión específicos en la secuencia de la proteína para permitir que la etiqueta se elimine después de la purificación. Esto es importante para los estudios funcionales, ya que la etiqueta puede interferir con el correcto plegamiento y/o función de la proteína. Las proteínas expresadas sin una etiqueta se pueden purificar mediante técnicas como la filtración en gel, el intercambio iónico o la hidroxapatita, que separan las muestras según el tamaño o la carga de la proteína (Nemergut et al., 2021).

Los investigadores utilizan proteínas expresadas en bacterias para dilucidar su función y estructura cristalina, o para encontrar nuevos socios de interacción de la proteína relevantes para el desarrollo y la progresión de enfermedades humanas (Nemergut et al., 2021). Las proteínas recombinantes se pueden usar para una gran cantidad de aplicaciones diferentes, como estudios de localización subcelular que usan proteínas etiquetadas o producción de anticuerpos (Guevara-Hernández et al., 2013).

Otras aplicaciones incluyen ensayos funcionales de nuevas proteínas o el desarrollo de chips de proteínas para analizar o encontrar proteínas que interactúan. Las interacciones de proteínas también pueden estudiarse utilizando proteínas recombinantes en sistemas de dos híbridos o ensayos basados en perlas y los complejos de proteínas pueden ensamblarse *in vitro* utilizando proteínas recombinantes y, por lo tanto, estudiarse en un entorno controlado (Bonhoure et al., 2018).

### **Capítulo III: Materiales y métodos**

#### **Participantes**

El presente proyecto de integración curricular fue elaborado por Alexander Javier Acosta Gavilánez, estudiante de la carrera de Biotecnología, bajo la tutoría de la Dra. María Augusta Chávez Larrea, PhD (c), docente-investigadora de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” sede Matriz, el Dr. Armando Reyna Bello PhD, docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” sede Santo Domingo de los Tsáchilas, el Dr. Jorge Ron, docente-investigador de la Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE” IASA I y la Ing. Cristina Cholota, técnico del laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

#### **Zona de Estudio**

El presente proyecto de integración curricular se realizó en el laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, ubicado en la Av. Gral. Rumiñahui S/N, Sangolquí 171103.

#### **Material de Trabajo**

Las muestras biológicas, así como los materiales y reactivos para el desarrollo del presente proyecto, fueron proporcionados por el proyecto de vinculación “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y la sensibilización, al diagnóstico y al desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y de la tripanosomiasis en Ecuador – BruTryp” (CV-GNP-0056-2020) (ARES – ULg – ESPE).

#### **Duración de la investigación**

La investigación tuvo una duración de 4 meses, desde mayo de 2023 hasta septiembre de 2023.



### **Obtención de la proteína MSP5r**

Para el proceso de expresión y purificación de la proteína MSP5r se utilizó la cepa de *E. coli* pAR1903, producida a partir de la cepa *E. coli* JM109 por (Reyna-Bello et al., 1998), misma que se encontraba criopreservada en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología Animal de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.

### ***Expresión de la proteína MSP5 recombinante en bacterias transformadas E. coli pAR1903***

Para la obtención de colonias únicas del control negativo, se inocularon 5 mL de medio LB con una perla del criovial con bacterias *E. coli* JM109 criopreservadas, se incubó durante toda la noche a 37°C y 200 rpm.

Posteriormente, en una placa con medio LB, se sembró mediante estriado por agotamiento el medio líquido previamente inoculado con *E. coli* JM109 y en otra placa con LB + ampicilina (100 µg/mL) se cultivó las bacterias transformadas criopreservadas *E. coli* pAR1903. Se dejó incubar las placas durante toda la noche a 37°C.

Al día siguiente, se cultivó una colonia única de las placas inoculadas en 5 mL de medio LB y LB + ampicilina (50 µg/mL) y se dejó incubar durante toda la noche a 37°C y 200 rpm. Más adelante, se agregaron 2.5 mL del inóculo, tanto de bacterias transformadas de *E. coli* pAR1903 como comerciales de *E. coli* JM109. En un matraz Erlenmeyer previamente autoclavado de 250 mL con 25 mL de medio LB y LB + ampicilina (50 µg/mL), respectivamente, se dejó incubar a 37°C y 250 rpm hasta alcanzar un  $OD_{600}=0.6$ .

Al momento en el que el cultivo alcanzó una absorbancia de  $OD_{600}=0.6$ , se agregó 25 µL de IPTG (1M), y se dejó incubar a 37°C y 250 rpm por 5 h. Después, se recuperó el cultivo, y se centrifugó a 4500 rpm por 20 min a 4°C, finalmente, se descartó el sobrenadante y se conservó el pellet a -20°C.

### ***Lisis bacteriana***

Se agregaron 10 mL del tampón de guanidina-HCl (guanidina-HCl 6M, Tris-HCl 10 mM y bifosfato de sodio 100 Mm) al pellet obtenido de 50 mL del cultivo de expresión, se agitó por inmersión a velocidad mínima por 1 h hasta obtener una solución traslúcida. A continuación, se llevó a centrifugar a 4500 rpm por 20 min, se recuperó el sobrenante que se examinó mediante electroforesis vertical SDS-PAGE y se agregó imidazol hasta obtener una concentración final de 30 Mm. Finalmente, los lisados fueron cuantificados por espectrofotometría a 280 nm, para evidenciar la presencia de la proteína MSP5r.

### ***Purificación de la proteína MSP5r mediante cromatografía por afinidad***

Para el proceso de purificación de la proteína MSP5r mediante cromatografía por afinidad, se utilizó un sistema Ni-NTA mediante una resina ProBond™ (Invitrogen, USA), en virtud de que el vector utilizado para expresar la proteína MSP5r deja un residuo de 6-His que tiene afinidad por metales como el níquel. De igual manera, después de agregar cada uno de los buffers se resuspendió la resina y se centrifugó a 70 g por 2 min.

Primero se resuspendió la resina hasta obtener una solución homogénea, se colocaron 5 mL de la misma en un tubo falcon de 15 mL, se centrifugó a 70 g por 2 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, se agregaron 8 mL de agua destilada estéril se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Por último, se equilibró la columna agregando 8 mL del buffer de unión (pH=7.8) con imidazol (30mM), se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, el proceso de equilibrar la columna se repitió una vez más.

En el tubo con la resina previamente equilibrada se añadieron 10 mL de la solución de lisis que contiene la proteína MSP5r, se resuspendió la resina por inmersión durante 1 hora, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente, se midió la absorbancia a OD<sub>280</sub>, utilizando el buffer guanidina-HCl como blanco.

Para llevar a cabo la eliminación de las proteínas no unidas a la resina, se realizó un lavado con 8 mL de buffer de unión (pH=7.8), que se agitó por inmersión por 2 minutos, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. A continuación, se repitió el proceso con el buffer de lavado (pH=6) y buffer de lavado (pH=5.3), respectivamente, hasta obtener una absorbancia  $OD_{280}$  cercana a 0. Adicionalmente, todos los sobrenadantes obtenidos se midieron a  $OD_{280}$ , para verificar la concentración de proteínas desprendida en cada etapa.

Para la elución de la proteína MSP5r se agregaron 10 mL del buffer de elución (pH=4), se mezcló por inmersión hasta resuspender completamente toda la resina, se centrifugó, se recogió el sobrenadante que contenía la proteína eluída y se midió la absorbancia a  $OD_{280}$ .

### **Electroforesis vertical SDS-PAGE**

Se utilizó una cámara Mini-Protean® Tetra Vertical Electrophoresis Cell (BioRad, CA, USA) para electroforesis vertical para verificar la expresión proteica.

Para la preparación de las muestras para electroforesis vertical se utilizó un buffer de carga Laemmli (2X). En el caso de muestras de pellet, se añadieron 50  $\mu$ L del buffer de carga y se mezcló por pipeteo hasta conseguir una solución homogénea, se incubó a 100°C por 5 min y se centrifugó por 20 s a 12000 rpm. Para muestras de sobrenadante, se agregó buffer Laemmli (2x) a la muestra hasta llegar a una concentración final de 1X y se dió un spin.

Para el gel de electroforesis vertical SDS-PAGE, se prepararon 2 geles de poliacrilamida, uno de concentración y otro de separación, acorde a lo indicado en la tabla 3.

### **Tabla 1**

*Preparación de geles de poliacrilamida.*

	Gel (%)	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> (mL)	Acrilamida / Bis acrilamida (37.5:1) (40%) (mL)	Buffer de concentración o separación (mL)	APS (10%) (μL)	TEMED (μL)
<b>Gel de concentración</b>	4	3	0.5	1.25	25	8
<b>Gel de separación</b>	12	4.4	3	2.5	50	14

Luego se cargaron 15 μL de las muestras previamente preparadas en cada pocillo, en el caso de proteínas, se cargaron 100 mg/mL, así mismo, se cargó 4 μL del marcador de peso molecular para proteínas Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, CA, USA). Por último, se corrió el gel a 120 V por 90 minutos.

Luego, se descartó el gel de concentración y se tiñó el gel de separación con la solución de azul brillante de Coomassie R-250 por 30 min a 300 rpm. Pasado el tiempo indicado se descartó el colorante y se agregó la solución decolorante, que se llevó a agitación a 300 rpm por 1 h, realizando 3 lavados con la misma solución. Por último, se visualizaron los geles utilizando el equipo ChemiDoc™ Touch Imaging System (Biorad, CA, USA).

### Diálisis

Se utilizaron membranas de celulosa para diálisis FisherBrand® Regenerated Cellulose Tubular Membrane (Thermo Fisher Scientific, USA) con la proteína eluída y se sumergió en 600 mL de agua destilada autoclavada durante toda la noche y se recuperó la proteína situada dentro de la membrana de celulosa.

### Cuantificación por ensayo BCA de la proteína MSP5r

Para la cuantificación de la proteína MSP5r por ensayo BCA, se utilizó el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, USA). Primero se prepararon las diluciones del estándar de acuerdo a las instrucciones del fabricante señaladas en la tabla 4. Luego, se calculó y

preparó el volumen de la solución de trabajo, que contuvo el reactivo A y B del kit antes mencionado, en relación 50:1, basado en el número de estándares y las muestras a cuantificar mediante la siguiente fórmula:

$$V_{ST} = (\# \text{ estándares} + \# \text{ muestras}) * (\# \text{ réplicas}) * (V_{ST} \text{ por muestra})$$

Después, en una microplaca se agregaron, en cada pocillo, 10  $\mu\text{L}$  de cada estándar y muestra por duplicado con 200  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo, se agitó la placa a 250 rpm por 30 segundos, se tapó e incubó a 37 °C por 30 minutos en cámara húmeda, se enfrió a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 562 nm. De igual manera, para conocer la concentración proteica en las muestras cuantificadas se realizó una curva de calibración de los estándares de BSA y en base a dicha curva se calculó la concentración de la proteína MSP5r.

**Tabla 2**

*Preparación de las diluciones del estándar (BSA).*

Estándar	Volumen del diluyente ( $\mu\text{L}$ )	Volumen y fuente de BSA ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final de BSA ( $\mu\text{g/mL}$ )
A	0	300 (BSA kit)	2000
B	125	375 (BSA kit)	1500
C	325	325 (BSA kit)	1000
D	175	175 (estándar B)	750
E	325	325 (estándar C)	500
F	325	325 (estándar E)	250
G	325	325 (estándar F)	125
H	400	100 (estándar G)	25
I	400	0	0

### Controles positivos y negativos

Los controles tanto positivos como negativos fueron sueros previamente analizados mediante PCR y frotis del banco de sueros del banco de sueros del proyecto BruTryp.

**ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale*****Tabla 3.***ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale*.*

<b>Etapas</b>	<b>Producto</b>	<b>Volumen/Pocillo</b>	<b>Incubación</b>
<b>Sensibilización</b>	Proteína MSP5r diluida en buffer carbono bicarbonato (50 mM, pH=9)	100 µL	Toda la noche a 4°C
<b>Lavado (2 veces)</b>	Solución de lavado (NaCl 150 mM + Tween-20 0.1%)	200 µL c/lavado	-
<b>Bloqueo</b>	Solución de bloqueo (Leche descremada en polvo o líquida)	200	1 h a 37°C
<b>Lavado (2 veces)</b>	Solución de lavado	200 µL c/lavado	-
<b>Adición del suero</b>	Suero bovino diluido en PBS-T con 0.1% Tween 20	100 µL	1 h a 37°C
<b>Lavado (5 veces)</b>	Solución de lavado	200 µL c/lavado	-
<b>Añadidura del conjugado</b>	Conjugado anti-bovino diluido en Buffer PBS-T	50 µL	1 h a 37°C
<b>Lavado (5 veces)</b>	Solución de lavado	200 µL c/lavado	-
<b>Adición del cromógeno</b>	Cromógeno TMB	50 µL	Agitación a T amb por 30 min, en oscuridad
<b>Parado de la reacción</b>	Stop-solution	50 µL	-

*Nota.* Obtenido del protocolo propuesto por Reyna-Bello, 1998.

En cada una de las etapas se probaron diferentes diluciones: antígeno (0.5 ug/mL, 1 ug/mL, 2 ug/mL y 3 ug/mL), solución de bloqueo (leche descremada en polvo al 5%, leche tru al

5, 10 y 100%), dilución del suero (1/50, 1/100, 1/200 y 1/400) y dilución del conjugado (1/10000, 1/15000 y 1/20000).

Por último, se leyó la placa utilizando el equipo Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific, USA), a 450-630 nm.

#### **Determinación del cut off**

El punto de corte o cut-off se determinó mediante 2 métodos: obteniendo el promedio de 8 sueros negativos  $\pm$  2 desviaciones estándar y utilizando curvas ROC. Las muestras que presentaron valores inferiores a los del cut-off fueron consideradas como negativas, mientras que las muestras con valores superiores al cut-off fueron consideradas como positivas.

#### **Validación del ELISA estandarizado**

Se realizó mediante una tabla de cuatro casillas, los cálculos de diversos parámetros para la validación del ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale* como: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, % de falsos negativos, % de falsos positivos y exactitud. Los diferentes componentes de la tabla de cuatro casillas se determinaron al analizar sueros mediante el ensayo ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale* frente a los obtenidos mediante PCR y frotis sanguíneo.

**Tabla 4. Tabla de cuatro casillas**

*Tabla de contingencia.*

	<b>Controles Positivos</b>	<b>Controles Negativos</b>
<b>Resultado positivo con ELISA IgG para <i>A. marginale</i></b>	(VP)	(FP)
<b>Resultado negativo con ELISA IgG para <i>A. marginale</i></b>	(FN)	(VN)

*Nota.* VP: Verdaderos positivos, VN: verdadero negativo, FN: falso negativo, VN: verdaderos negativos

Fórmula sensibilidad

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

Fórmula especificidad

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

Fórmula valor predictivo positivo

$$\text{Valor predictivo positivo} = \frac{VP}{VP + FP}$$

Fórmula valor predictivo negativo

$$\text{Valor predictivo negativo} = \frac{VN}{VN + FN}$$

Fórmula % de falsos positivos

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

Fórmula % de falsos negativos

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

Fórmula de exactitud

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

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

Las muestras de bovinos de altura analizadas fueron seleccionadas del banco de sueros del proyecto BruTryp, se analizaron 36 muestras procedentes de la Hacienda San José, ubicada en la provincia de Pichincha, cantón Quito, parroquia Cumbayá, localidad Ilaló.



**Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se aplicó estadística descriptiva, utilizando medidas de tendencia central y dispersión. En el caso de la repetibilidad de los datos, se analizó mediante el coeficiente de variación (CV) y reproducibilidad se valoró mediante índice Kappa sobre repeticiones de sueros escogidos al azar del banco de sueros del proyecto BruTryp.

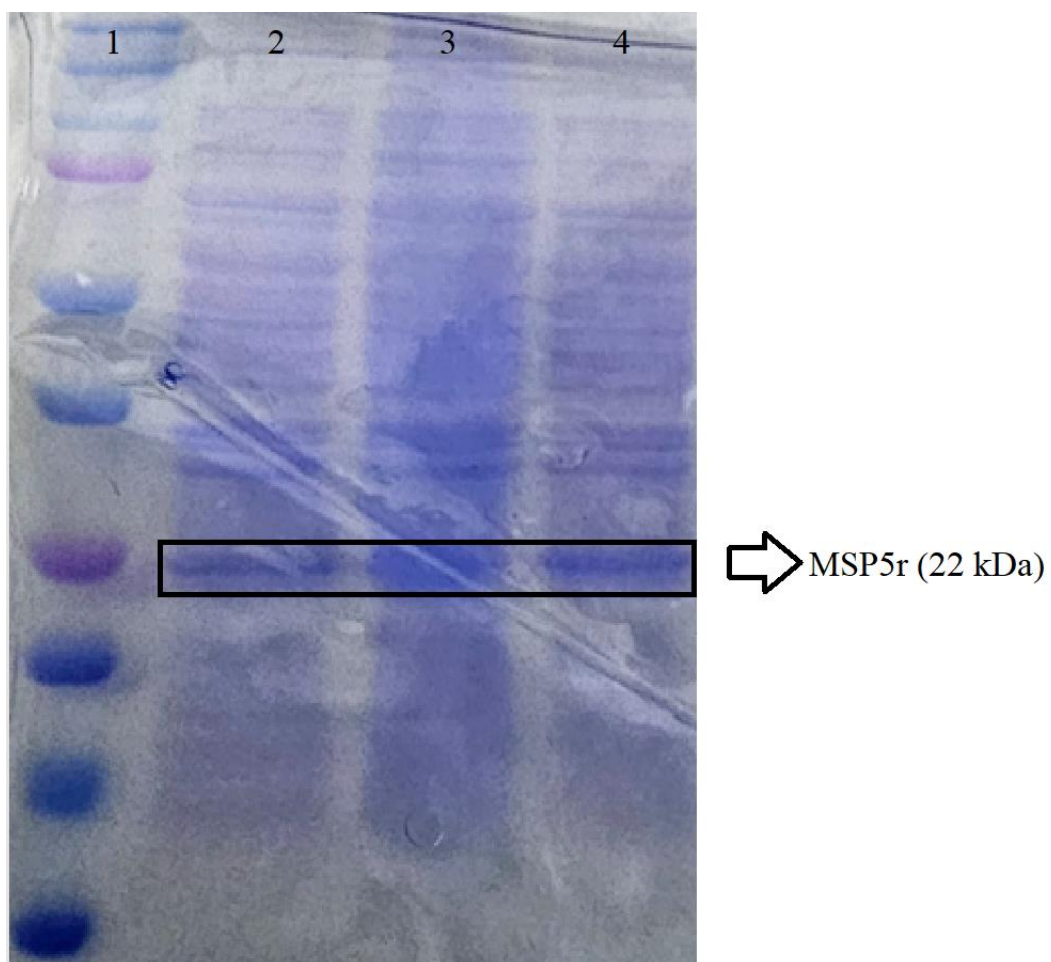
## Capítulo IV: Resultados

### Expresión de la proteína MSP5r en bacterias transformadas *E. coli* pAR1903

Al realizar la expresión en *E. coli* pAR1903, producida a partir de la cepa *E. coli* JM109, y realizar electroforesis SDS-PAGE, como se muestra en la figura 1, se evidenció que la proteína MSP5r se expresó dentro de cuerpos de inclusión de manera intracelular.

#### Figura 1

*Expresión de la proteína MSP5r*



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

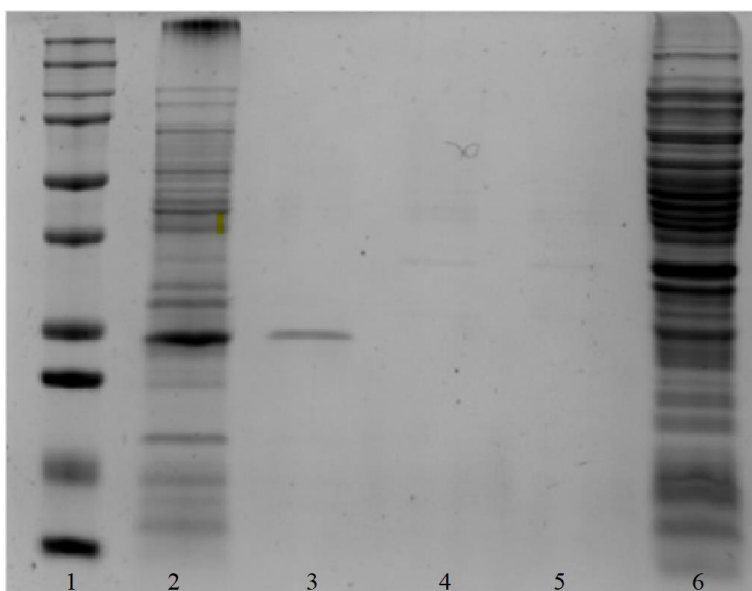
En la figura 1, los carriles del 2 al 4, presentaron diferentes bandas que corresponden a proteínas producidas en *E. coli* pAR1903. De acuerdo al análisis de la electroforesis SDS-PAGE, MSP5r se encuentra entre 20 y 25 kDa, de acuerdo al marcador de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, CA, USA) (carril 1), lo cual concuerda con su peso teórico de 19 kDa.

### Lisis bacteriana

Al utilizar 10 mL del tampón guanidina-HCl en un pellet de 50 mL del cultivo de la expresión de la proteína MSP5r y realizar electroforesis SDS-PAGE, se identificó la presencia de MSP5, como se indica en la figura 2. El carril 6, correspondiente a *E. coli* JM109, la banda correspondiente a MSP5r no se apreció.

### Figura 2

*Lisado bacteriano y purificación de la proteína MSP5r*



*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).

### Purificación de la proteína MSP5r mediante cromatografía por afinidad.

Posterior a realizar el proceso de cromatografía por afinidad mediante un sistema Ni-NTA mediante una resina ProBond™ (Invitrogen, USA), se observó que luego del lavado con buffer de lavado (pH=5.3), los diferentes lisados obtuvieron un OD<sub>280</sub> con un rango entre 0.1 y 0.02, lo cual se plasmó en la tabla 5, por lo cual, se decidió no realizar más lavados y proceder a la elución de la proteína con el buffer de elución (pH=4).

**Tabla 5**

*OD<sub>280</sub> posterior al lavado con buffer de lavado (pH=5.3)*

Muestra	OD <sub>280</sub>
<b>MSP5r-1</b>	0.11
<b>MSP5r-2</b>	0.05
<b>MSP5r-3</b>	0.02

Posterior a la elución de la proteína, se obtuvo la proteína ya purificada, misma que se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE. En la figura 2, se observa en el carril 3 a la proteína purificada, una sola banda que se ubicó respecto al marcador estándar de peso molecular Precision Plus Protein Dual Color Standards (BioRad, CA, USA), entre 20 y 25 kDa, lo cual corresponde a la proteína MSP5r purificada. Se verificó también la inexistencia de proteínas nativas de *E. coli* JM109, lo cual predice una alta pureza de la proteína.

### Diálisis

MSP5r se recuperó de la membrana de celulosa suspendida en agua destilada autoclavada y se cuantificó por espectrofotometría a 280 nm (tabla 6), y se identificó una concentración máxima de proteína de 0.324 ng/mL.

**Tabla 6**

*Cuantificación mediante espectrofotometría*

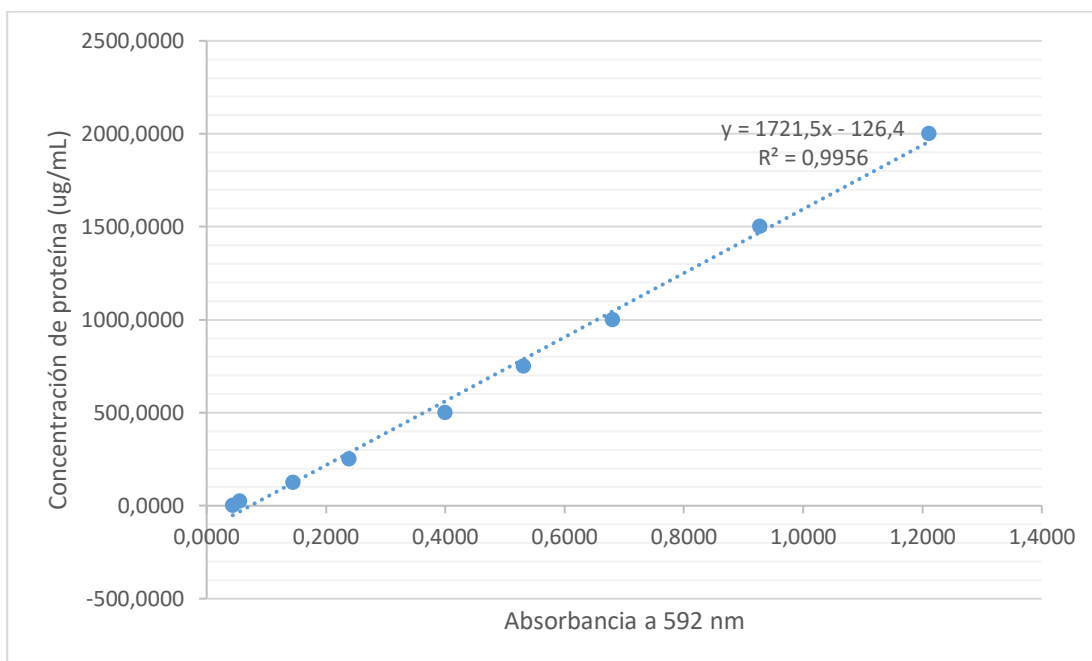
Proteína MSP5r	Concentración de proteína (ng/mL)
<b>MSP5r-1</b>	0.198
<b>MSP5r-2</b>	0.249
<b>MSP5r-3</b>	0.324

### Cuantificación por ensayo BCA de la proteína MSP5r.

Para la cuantificación por BCA de la proteína MSP5r dializada en agua, se realizó una curva de calibración utilizando agua destilada autoclavada como diluyente (figura 4).

### Figura 3

*Curva de Calibración con agua destilada autoclavada como diluyente*



Se sometieron las muestras de la proteína MSP5r dializada al ensayo BCA. Utilizando la curva de calibración obtenida utilizando agua destilada autoclavada como diluyente, se correlacionaron las absorbancias obtenidas de las muestras con la fórmula de la linealización y se obtuvo una concentración máxima de proteína de 260.16 ng/mL (tabla 7).

**Tabla 7**

*Cuantificación por BCA*

<b>Proteína MSP5r</b>	<b>Concentración de proteína (ng/mL)</b>
<b>MSP5r-1</b>	156.27
<b>MSP5r-2</b>	212.56
<b>MSP5r-3</b>	260.16

### **Estandarización del ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale***

Para la estandarización del ELISA indirecto anti-IgG contra *A. marginale*, se utilizaron 10 controles positivos tanto a PCR como a frotis sanguíneo de acuerdo a la base de datos de sueros del proyecto de vinculación “Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y la sensibilización, al diagnóstico y al desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y de la tripanosomiasis en Ecuador – BruTryp” (CV-GNP-0056-2020) (ARES – ULg – ESPE), y 10 controles negativos a PCR y frotis, originarios de la sede IASA-I de la Universidad de las Fuerzas Armadas – ESPE.

#### **Ensayo 1**

Para el primer ensayo se probó el antígeno a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 ug/mL), con una dilución del suero de 1/200 y para el conjugado de 1/20000.

**Tabla 8**

*Ensayo 1. Valores de las densidades ópticas de tres concentraciones de antígenos*

<b>Ag: 1 ug/mL</b>		<b>Ag: 2 ug/mL</b>		<b>Ag: 3 ug/mL</b>	
<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>
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	0.5882	1.0552	0.6990	1.2373	0.9232

Nota. Ag (Antígeno), CP (Controles Positivos), CN (Controles Negativos)

Los resultados de este ensayo, mostrados en la tabla 8, permitieron determinar que a una concentración de Ag=1 ug/mL.

La diferencia entre los promedios de los resultados positivos y negativos fue mayor que en lo observado a otras concentraciones, por lo cual se decidió probar si a menor concentración de proteína existían mayores diferencias entre los controles positivos y negativos.

### **Ensayo 2**

Para comprobar la hipótesis planteada en el ensayo 1, se probaron concentraciones diferentes de Ag (0.1, 0.5 y 1 ug/mL) y se mantuvieron constantes la concentración de suero (1/200) y de conjugado (1/20000).

**Tabla 9**

*Ensayo 2. Valores de las densidades ópticas de dos concentraciones de antígenos*

<b>Ag: 0.5 ug/mL</b>		<b>Ag: 1 ug/mL</b>	
<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>
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

Nota. Ag (Antígeno), CP (Controles Positivos), CN (Controles Negativos)

Acorde a los resultados observados en la tabla 9, se identificó que la concentración óptima de antígeno para el ensayo ELISA fue de 1 ug/mL, ya que al utilizar una concentración menor la diferencia entre controles positivos y negativos disminuyó.

### **Ensayo 3**

Posterior a la identificación del título óptimo del antígeno, se probaron diferentes sustancias para la etapa de bloqueo: leche descremada en polvo (5%) y leche TRU descremada (5%, 10% y 100%), todos los reactivos de bloqueo fueron disueltos en PBS. Se mantuvieron constantes las siguientes concentraciones: Ag (1 ug/mL), anticuerpo primario (1/200) y anticuerpo secundario (1/20000).

**Tabla 10**

*Ensayo 3. Valores de las densidades ópticas de cuatro soluciones de bloqueo*

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

Nota. CP (Controles Positivos), CN (Controles Negativos)



Conforme a los resultados representados en la tabla 10, la mejor solución de bloqueo fue leche descremada en polvo disuelta (5%) en PBS.

#### **Ensayo 4.**

Se probaron diluciones del anticuerpo primario (1/50, 1/100, 1/200), manteniendo constante las concentraciones de antígeno (1 ug/mL) y anticuerpo secundario (1/20000).

**Tabla 11**

*Ensayo 4. Valores de las densidades ópticas de tres diluciones de suero*

<b>Suero: 1/50</b>		<b>Suero: 1/100</b>		<b>Suero: 1/200</b>	
<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>
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

Nota. CP (Controles Positivos), CN (Controles Negativos)

Acorde a lo que indica la tabla 11, una dilución de 1/200 del anticuerpo primario mostro una mayor diferencia entre controles positivos y negativos. Gracias a esta información se logró inferir que una mayor dilución de los sueros logra una mayor diferencia entre positivos y negativos.

#### **Ensayo 5**

Se probó la hipótesis del ensayo 4, por lo cual se realizó una dilución más de los sueros (1/400). Las concentraciones de antígeno y conjugado se mantuvieron constantes como se indicó en el ensayo 4.

**Tabla 12**

*Ensayo 5. Valores de las densidades ópticas de dos diluciones de suero*

<b>Suero: 1/200</b>		<b>Suero: 1/400</b>	
<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>
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

Nota. CP (Controles Positivos), CN (Controles Negativos)

Se determinó que el título óptimo del anticuerpo primario fue de 1/200, ya que a menor o mayor dilución del suero la diferencia entre los controles es menor.

### **Ensayo 6**

Con los resultados previamente obtenidos, se experimentó con diferentes diluciones del anticuerpo secundario (1/10000, 1/15000 y 1/20000) manteniendo constantes las concentraciones de antígeno (1 ug/mL) y del anticuerpo primario (1/200).

**Tabla 13**

*Ensayo 6. Valores de las densidades ópticas de tres diluciones de conjugado*

<b>Conjugado: 1/10000</b>		<b>Conjugado: 1/15000</b>		<b>Conjugado: 1/20000</b>	
<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>	<b>CP</b>	<b>CN</b>
2.8227	0.7485	2.64456	0.6726	1.7654	0.4608
2.4703	0.6713	2.1983	0.5576	1.3851	0.4030
2.6763	0.8213	2.2453	0.6885	1.5226	0.4870
2.8560	0.6952	2.6227	0.6141	1.8235	0.4254
2.5200	0.6562	2.3096	0.5919	1.4984	0.4287
2.5270	0.7538	2.3651	0.7934	1.4847	0.5065

Nota. CP (Controles Positivos), CN (Controles Negativos)

A probar diferentes diluciones de conjugado (tabla 13), se identificó que el título óptimo del anticuerpo secundario fue de 1/20000.

#### **Determinación del cut-off**

Para el cálculo del cut off se tomaron las densidades ópticas de 8 sueros negativos como lo indica la tabla 14.

**Tabla 14**

*Sueros negativos usados para determinar cut-off*

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

Se calculó que los sueros presentan una desviación estándar de 0.0525 y un promedio de 0.5812, utilizando estos 2 parámetros se calculó el cut off y se obtuvo un cut-off=0.6862.

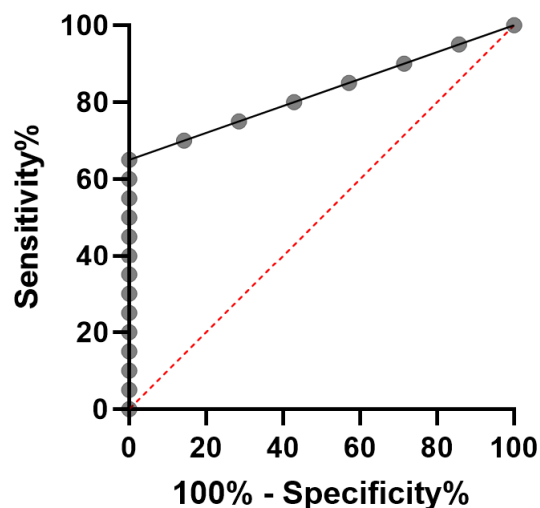
#### **Determinación del cut off, sensibilidad y especificidad por curvas ROC.**

Para la determinación del cut off, sensibilidad y especificidad por curvas ROC se analizaron muestras positivas (14) y negativas (12) a PCR y frotis sanguíneo, y los controles

negativos especificados en el punto anterior. Las curvas ROC, se obtuvieron mediante el programa GraphPad Prisma 9.0. y se observan en la figura 4.

#### Figura 4

Curva ROC



Además, de la curva ROC, se obtuvo un área bajo la curva de 0.8250, además, se determinó que con un punto de corte de 0.6305, la prueba muestra una sensibilidad del 70% y una especificidad del 85.71%.

#### Validación del ELISA estandarizado

Mediante una tabla de contingencia se compararon muestras positivas (14) y negativas (12) a *A. marginale* por PCR y frotis sanguíneo, frente a los resultados obtenidos mediante el iELISA contra IgG para *A. marginale*.

**Tabla 15**

*Tabla de contingencia con sueros validados con PCR y frotis sanguíneo*

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

Al analizar la tabla 15 se calcularon los diferentes parámetros de validación del ELISA, y se obtuvieron los valores para cada uno indicados en la tabla 14.

**Tabla 16**

*Parámetros de validación del ELISA*

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

Al utilizar como punto de corte el promedio de los sueros negativos + 2 desviaciones estándar (0.6862), la especificidad y sensibilidad de la prueba es similar a la obtenida mediante las curvas ROC.

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

Al analizar las 36 muestras provenientes de la localidad Ilaló, misma que se encuentra a 2200 m.s.n.m, mediante el iELISA estandarizado, las densidades ópticas resultantes se detallan en la tabla 15.

#### Tabla 17

*Resultado de las muestras de la localidad Ilaló*

#### Tabla 18 Resultado de las muestras de la localidad Ilaló

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
19	1.4970	Positivo

---

<b>20</b>	2.0752	Positivo
<b>21</b>	1.2757	Positivo
<b>22</b>	1.4404	Positivo
<b>23</b>	1.4099	Positivo
<b>24</b>	1.9255	Positivo
<b>25</b>	1.3091	Positivo
<b>26</b>	1.3380	Positivo
<b>27</b>	1.1030	Positivo
<b>28</b>	1.4228	Positivo
<b>29</b>	1.1162	Positivo
<b>30</b>	1.4101	Positivo
<b>31</b>	1.4417	Positivo
<b>32</b>	1.5313	Positivo
<b>33</b>	1.3683	Positivo
<b>34</b>	1.3279	Positivo
<b>35</b>	1.4214	Positivo
<b>36</b>	2.2861	Positivo

---

Se logró identificar 36 bovinos de altura que presentaban anticuerpos tipo IgG contra *A. marginale*, es decir, el 100% de los bovinos analizados son positivos al análisis.

## Capítulo V: Discusión

El proceso de expresión proteica es un paso clave dentro de la producción de proteínas recombinantes, por ende, es necesario tomar en cuenta diferentes parámetros para lograr una correcta expresión. Uno de los puntos críticos para la obtención de proteínas recombinantes es la elección del vector de expresión, de acuerdo con González & Fillat, (2018), el uso de vectores procariotas, como *E. coli*, ha sido muy utilizado por que presenta una fácil manipulación y bajos costos.

Al expresar proteínas recombinantes utilizando *E. coli*, es importante la selección de la cepa, Cárcamo (2013), demostró que la cepa de *E. coli* BL21, presenta una tasa específica de crecimiento crítica más elevada, lo cual permite un crecimiento acelerado, mejorando el rendimiento del proceso que con la cepa *E. coli* JM109. De acuerdo a lo descrito anteriormente el usar la cepa JM109 podría haber provocado un menor rendimiento en la producción de la proteína MSP5r.

Falero et al. (2015), afirma que existen desventajas del uso de *E. coli* como sistema de expresión, en el caso de proteínas insolubles, como MSP5r, se forman agregados insolubles conocidos cuerpos de inclusión que contienen la proteína recombinante, por ende, es necesario el aislamiento y purificación de los cuerpos de inclusión para una posterior solubilización y renaturalización de la proteína para volverla funcional.

Para la purificación de los cuerpos de inclusión, se han descrito diversos métodos, entre los cuales destacan la lisis bacteriana, tanto por métodos mecánicos como no mecánicos, uso de agentes desnaturizantes, detergentes, entre otras Falero et al. (2015). En el presente estudio se utilizó un agente desnaturizante, guanidina-HCl 6M, para la lisis bacteriana similar a lo descrito por Bisen et al. (2021), que realizaron la lisis bacteriana utilizando un agente desnaturizante, en su caso urea 8M. Por otra parte, Palacios et al. (2014) y Wattahanadirek et al.



(2021), aplican un proceso de lisis mediante sonicación en hielo, como una opción para la obtención de proteína MSP5r.

La cromatografía por afinidad, es una de las opciones más utilizadas para la purificación de proteínas recombinantes. Paz (2016), asegura que la fusión de una cola de 6-His con el extremo N-terminal de la proteína permite llevar a cabo este tipo de cromatografía, mediante la cual se logra obtener proteínas en grandes cantidades, con alto nivel de pureza y en forma soluble. En el caso de proteínas que se encuentren en cuerpos de inclusión, acorde a lo dicho por Lin (2007), se debe realizar purificaciones en condiciones desnaturizantes, esto es necesario ya que la proteína que se encuentra en el cuerpo de inclusión no se encuentra en su estado natural o no son funcionales. Los agentes más utilizados son guanidina-HCl 6M o urea 8M, y ayudan a la resolubilización y replegamiento de la proteína de interés. Si bien estos 2 agentes desnaturizantes han sido ampliamente utilizados, Bhuyan (2002), determinó que si bien ambos agentes estabilizan las proteínas, en la guanidina-HCl se debe tomar en cuenta también que el efecto electrostático contribuye a la estabilidad proteica y esta dependerá del grado de interacciones iónicas entre los sitios cargados en la proteína y los iones desnaturizantes.

Acorde a lo observado en la sección de resultados, posterior al proceso de purificación se obtuvo una concentración máxima de MSP5r de 260.15 ug/mL, lo cual es una concentración mayor a lo obtenido por Palacios et al. (2014) y Primo et al. (2019), que obtuvieron una concentración final de proteína de 72 ug/mL y 60 ug/mL, respectivamente.

Finalmente, al verificar la pureza de la proteína mediante electroforesis SDS-PAGE, solamente se observó una banda correspondiente a la proteína MSP5r, a diferencia de lo analizado por Reyna-Bello et al. (1998), en donde se observan diferentes bandas correspondientes a proteínas nativas de *E. coli* JM109.

Para la estandarización del ensayo ELISA indirecto, se utilizó como protocolo base el propuesto por Reyna-Bello et al. (1998), variando concentraciones de antígeno, anticuerpo

primario y secundario hasta optimizar la prueba ELISA, de acuerdo a lo descrito por Crowther (2009), se calculó el ratio o la relación de unión entre los resultados de los controles negativos y positivos, lo cual permite analizar cuáles son las mejores condiciones para cada uno de los elementos y es muy utilizado en caso de desarrollar pruebas con fines diagnósticos.

La concentración óptima de antígeno a utilizarse, fue de 1ug/mL, manteniendo constante la concentración mencionadas en el protocolo base de la dilución del suero en 1/200 y de conjugado en 1/20000, se identificó que a una concentración de 1 ug/mL, el ratio es mayor que con las demás concentraciones, esto varía con lo propuesto por el protocolo base que indica una concentración de antígeno de 2 ug/mL, esto puede deberse a la pureza de la proteína ya que una proteína que presente más impurezas puede causar interferencias en la unión del antígeno con el suero, Falcón et al. (2006), afirma que en el caso de pruebas diagnósticas como ELISA, es necesario un antígeno con un alto grado de pureza, lo cual brinda una sensibilidad y especificidad óptima de la prueba.

En el ensayo 3, se determinó la solución óptima del bloqueo, JoVE Science Education Database, 2023, asevera que la fase de bloqueo es esencial en ensayos como ELISA, ya que esto evita uniones inespecíficas de los anticuerpos, al rellenar los espacios no ocupados por el antígeno inmovilizado, esto evita el ruido de fondo y los posibles falsos positivos. Se estableció que la solución de bloqueo óptima fue leche descremada al 5% diluida en PBS (pH=7.2)

Posterior a la determinación de la concentración óptima del antígeno, en los ensayos 4 y 5, se probaron diferentes diluciones del suero desde 1/50 hasta 1/400, el mayor ratio se observó con una dilución de 1/200, lo cual concuerda con el protocolo base y con lo descrito por Bisen et al. (2021), quienes estandarizaron el ensayo ELISA con una dilución del suero de 1/200 en PBS con Tween-20 al 0.1%, por otro lado, Eleizalde et al. (2007), determinó que el título óptimo de suero para un ensayo ELISA indirecto utilizando MSP5r como antígeno, se encuentra entre el rango de 1/100 y 1/200. Finalmente, en la estandarización del ELISA, en el

ensayo 6, se determinó la dilución óptima del anticuerpo secundario, para esto se probaron diluciones desde 1/10000 a 1/20000, concluyendo que la concentración óptima del conjugado es de 1/20000. El determinar la dilución óptima de los anticuerpos, según Abyntek (2019), permite que las interferencias y ruidos de fondo sean mínimas, además, minimizan costos de los reactivos utilizados.

La determinación del punto de corte o cut-off, es clave dentro del proceso de estandarización de una prueba ELISA, ya que en el punto de corte determina la calidad diagnóstica de un ELISA y mediante este cálculo, se podrán obtener valores correspondientes a parámetros de validez del ensayo, como la sensibilidad y especificidad García et al. (2011). En el presente estudio se determinó el cut-off por 2 métodos, el promedio de 8 sueros negativos + 2 desviaciones estándar, y mediante el análisis de curvas ROC, si bien, tanto el punto de corte, como los parámetros de validación no variaron de manera significativa entre ambos métodos, se seleccionó como óptimo el cut-off y valores de especificidad y sensibilidad obtenidos mediante curvas ROC, esto debido a que de acuerdo con lo descrito por Cerda & Cifuentes (2012), el usar curvas ROC presenta varias ventajas entre las cuales destaca, que se analizan diferentes puntos de corte para determinar cual es el mejor en base al objetivo del estudio, en el caso del presente trabajo, mediante el índice de Youden, se pudo identificar el cut-off que cuenta con una mayor sensibilidad y especificada conjuntamente.

Mediante el ensayo ELISA estandarizado se logró determinar la presencia de anticuerpos tipo IgG contra *A. marginale* en bovinos de altura, el estudio en ganado de altura es de gran relevancia para determinar la seroprevalencia de la enfermedad a nivel nacional, ya que los principales estudios acerca de *A. marginale* en el Ecuador se llevaron a cabo en ganado de zonas bajas, sin embargo de acuerdo a lo propuesto por Oliveira et al. (2011), si bien el ganado de zonas bajas presenta una gran prevalencia de la enfermedad, el ganado de altura se considera altamente susceptible a esta infección. En ese estudio, se estudiaron 36 muestras de la

Hacienda San José, de la localidad Ilaló y se identificó que el 100% del ganado analizado fue positivo para *A. marginale*. Esta alta prevalencia concuerda con otros estudios realizados en diferentes provincias del Ecuador, por ejemplo, Muñoz et al. (2020), utilizó PCR para determinar la prevalencia de la infección por *A. marginale* en la provincia de Zamora Chinchipe e identificó una alta prevalencia mayor al 50% en todos los cantones, e incluso observó una máxima prevalencia correspondiente al 89.3%, en el caso de, Soto (2010), identificó que en camales del Distrito Metropolitano de Quito, existe una prevalencia del 91.7%. Por otra parte, Tana-Hernández et al. (2017), realizó un estudio de la prevalencia de anaplasmosis bovina en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, en donde concluyó que existía una alta proporción de animales infectados por rebaño, incluso en 3 de las granjas estudiadas, el 100% de animales se encontraban infectados por *A. marginale*. Los autores aclaran también que la distribución y alta prevalencia de *A. marginale* depende de los vectores de la enfermedad, en el caso de América Latina, el contagio de *A. marginale* se da principalmente mediante vía iatrogénica, transmisión diptérica o mediante moscas chupadoras de sangre, esto concuerda, además, con lo especificado por Medina et al. (2017).

## Capítulo VI: 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 estandarizó con: MSP5r como antígeno a una concentración de 1 ug/mL, dilución del suero a 1/200, solución de bloque a base de leche descremada en polvo al 5% la dilución del conjugado de 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 específica que podría ser utilizada para la detección de IgG contra *A. marginale* en estudios epidemiológicos

## Capítulo VII: 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.

## Referencias

- Betancur, O., Jimenez, P., & Giraldo, C. (2016). Reproductive failures associated with *Trypanosoma (Duttonella) vivax*. *Veterinary Parasitology*, 229(1), 54-59.
- Abdala, A., Larriestra, A., & Signorini, M. (2020). Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(2), 115.
- Aguilar, R., Silva, J. A., Schneider, R. C., Freitas, J., Mesquita, D., Mesquita, T., . . . Barbosa, M. E. (1996). outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovines of the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 5(1), 561-562.
- Alhajj, M., & Farhana, A. (2022). Enzyme Linked Immunosorbent Assay. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Anziani, O. (2010). *Mosca brava (Stomoxys calcitrans) (biología, importancia económica, aspectos epidemiológicos y tendencias estacionales en el área central de la Argentina, control)*. Obtenido de INTA: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-ficha-3\\_27-02.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-ficha-3_27-02.pdf)
- Aronstein, W., Lewis, S., Norden, A., Dalton, J., & Strand, M. (1986). Molecular identity of a major antigen of *Schistosoma mansoni* which cross-reacts with *Trichinella spiralis* and *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, 92(1), 133-151.
- Asghar, M. M., & Rassouli, M. (2022). First identification of *Trypanosoma vivax* among camels (*Camelus dromedarius*) in Yazd, central Iran, jointly with *Trypanosoma evansi*. *Parasitology International*, 86(1).
- Azeredo, T., Marques, A., Souza, A., De Carvalho, D., Beltrán, D., Nicaretta, J., . . . Zanetti, W. (2020). Comparison of therapeutic efficacy of different drugs against *Trypanosoma vivax* on experimentally infected cattle. *Preventive Veterinary Medicine*, 181, 105040.

- Baral, T. (2009). Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, 1-24.
- Baral, T. N. (2010). Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Batista, J., Riet, F., Teixeira, M., Madruga, C., Simoes, S., & Maia, T. (2007). Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Veterinary Parasitology*, 143(1), 174-181.
- Benfodil, K., Büscher, P., Abdelli, A., Van, N., Mohamed, A., Ansel, S., . . . Ait, K. (2020). Comparison of serological and molecular tests for detection of *Trypanosoma evansi* in domestic animals from Ghardaïa district, South Algeria. *Veterinary Parasitology*, 280.
- Betancourt, J. A., & Wells, E. A. (1979). Pérdidas económicas en un brote de tripanosomiasis bovina causada por *Trypanosoma vivax*. *Revista Acovez*, 3(9), 6-9.
- Birhanu, H., Fikru, R., Said, M., Kidane, W., Gebrehiwot, T., Hagos, A., . . . Büscher, P. (2015). Epidemiology of *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax* in domestic animals from selected districts of Tigray and Afar regions, Northern Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 8(212), 1-11.
- Blandino, R., & Baumgarth, N. (2019). Secreted IgM: New Tricks for an Old Molecule. *106*(5), 1021-1034.
- Boeira, P., Fortes, F., Garcia, G., Da Silva, M., Oliveira, C., Resende, E., . . . Ferreira, J. (2018). Parasitological and immunological evaluation of cattle experimentally infected with *Trypanosoma vivax*. *Experimental Parasitology*, 185(1), 98-106.
- Boulangé, A., Pillay, D., Chevtzoff, C., Biteau, N., Comé, V., Rempeters, L., . . . Baltz, T. (2017). Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*, 233(1), 32-38.



- Boulangé, A., Pillay, D., Chevtzoff, C., Biteau, N., Comé, V., Rempeters, L., . . . Baltz, T. (2017). Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*, 233(1), 32-38.
- Boulanger, N. (2018). Insect-Borne Pathogens and Skin Interface: Flagellate Parasites and Skin Interface. En *Skin and Arthropod Vectors* (págs. 193-238). Academic Press.
- Boxler, D. (Febrero de 2015). *NebGuide*. Obtenido de The Horn Fly:  
<https://entomology.unl.edu/livestock/hornfly.pdf>
- Cayla, M., Rojas, F., Silvester, E., Venter, F., & Matthews, K. (2019). African trypanosomes. *Parasites & Vectors*, 12(1), 190.
- Chávez, M. A., Medina, M., Cholota, C., Jumbo, J., Saegerman, C., Proaño, F., . . . Reyna, A. (2021). First report and molecular identification of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* outbreak in. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(4), 2422-2428.
- Cox, F. (2001). Concomitant infections, parasites and immune responses. *Parasitology*, 122(1), 23-38.
- Dagnachew, S., & Bezie, M. (2015). Review on *Trypanosoma vivax*. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 7(1), 41-64.
- Dagnachew, S., Terefe, G., Abebe, G., Barry, D., McCulloch, R., & Goddeeris, B. (2015). In vivo experimental drug resistance study in *Trypanosoma vivax* isolates from tsetse infested and non-tsetse infested areas of Northwest Ethiopia. *Acta Tropica*, 146(1), 95-100.
- Dávila, A., & Silva, R. (2006). Animal Trypanosomiasis in South America: Current Status, Partnership, and Information Technology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 916(1), 199-212.
- Desquesnes, M. (2004). *Livestock trypanosomoses and their vectors in Latin America*. Paris: OIE.

- Desquesnes, M. (2017). *Compendium of Diagnostic Protocols of the OIE Reference Laboratory for Animal Trypanosomoses of African Origin*. Obtenido de [https://www.woah.org/nttat/Attached%20files/A16-REC-COMPENDIUM\\_PROTOCOLES\\_TRYPANO-En.pdf](https://www.woah.org/nttat/Attached%20files/A16-REC-COMPENDIUM_PROTOCOLES_TRYPANO-En.pdf)
- Desquesnes, M., Bengaly, Z., & Dia, M. (2003). Evaluation de la persistance des anticorps détectés par Elisa-indirect *Trypanosoma vivax* après traitement trypanocide chez des. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, 56(3), 141-144.
- Desquesnes, M., Gonzatti, M., Sazman, A., Thévenon, S., Bossard, G., Boulangé, A., . . . Berthier, D. (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. *Parasites & Vectors*, 15(64), 1-24.
- Desquesnes, M., Rocque, S., & Peregrine, A. (1995). French Guyanan stock of *Trypanosoma vivax* resistant to diminazene aceturate but sensitive to isometamidium chloride. *Acta Tropica*, 60(1), 133-136.
- Desquesnes, M., Sazmand, A., Gonzatti, M., Boulangé, A., Bossard, G., Thévenon, S., . . . Hébert, L. (2022). Diagnosis of animal trypanosomoses: proper use of current tools and future prospects. *Parasites & Vectors*, 15(235), 1-22.
- Dias, R., Azeredo, T. S., Heller, L. M., Monteiro, L. F., Beltrán, D. M., Cavalcante, A., . . . Zanetti, W. D. (2022). How many cattle can be infected by *Trypanosoma vivax* by reusing the same needle and syringe, and what is the viability time of this protozoan in injectable veterinary products? *Parasitology*, 149(2), 270-282.
- Duszynski, D., Kvičerová, J., & Seville, R. (2018). Chapter 18—Treatment and Drug Therapies of Coccidiosis in Carnivora. En *The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Carnivores of the World* (págs. 445-463). Academic Press.
- Dvm, A., & Rovid, S. (2018). African Trypanosomiasis. *The Center for Food Security & Public Health*, 1(1), 1-8.

- Eisler, M., Lessard, P., Masake, R., Mooloo, S., & Peregrine, A. (1998). Sensitivity and specificity of antigen-capture ELISAs for diagnosis of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, *79*, 187-201.
- Eloi, O., Oliveira, L., Bezerra, M., Lopes, C., Aparecida, M., . . . Aparecida, G. (2017). Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *26*(4), 516-520.
- Fetene, E., Leta, S., Regassa, F., & Büscher, P. (2021). Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & Vectors*, *14*(1), 80.
- Fidelis, O., Sampaio, P., Gonçalves, L., André, M., Zacarias, R., Wijffels, G., & Cadioli, F. (2019). Comparison of conventional and molecular techniques for *Trypanosoma vivax* diagnosis in experimentally infected cattle. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, *28*(2), 203-209.
- García, I., Muñoz, B., Aguirre, A., Polo, I., García, A., & Refoyo, P. (2008). Manual de laboratorio de Parasitología 2. Flagelados sanguíneos y tisulares. *Revista Reduca*, *1*(2), 7-19.
- Garcia, K., Cruz, A., Fidelis, O., Beterquini, W., Rogério, M., Geraldes, M., . . . Cadioli, F. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, *30*(1), 1-12.
- Garcia, K., Da Cruz, A., Fidelis, O., Nagata, W., André, M., Geraldes, M., . . . Cadioli, F. (2021). Follow-up of dairy cattle naturally infected by *Trypanosoma vivax* after treatment with isometamidium chloride. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*, *30*(1), 1-12.
- Gardiner, P. R. (1989). Recent Studies of the Biology of *Trypanosoma vivax*. *Advances in Parasitology*, *28*(1), 229-317.

- Giordani, F., Morrison, L., Rowan, T., De Koning, H., & Barrett, M. (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. *Parasitology*, 143(14), 1862-1889.
- Gomide, G., Lopes, L., Teixeira, A., Santos, M., Ferreira, Á., Steindel, M., . . . Toshio, R. (2021). A recombinant protein (MyxoTLm) for the serological diagnosis of acute and chronic *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 296.
- Gomide, G., Lopes, L., Teixeira, A., Santos, M., Ferreira, Á., Steindel, M., . . . Toshio, R. (2021). A recombinant protein (MyxoTLm) for the serological diagnosis of acute and chronic *Trypanosoma vivax* infection in cattle. *Veterinary Parasitology*, 296.
- Gutiérrez, H., & Vara, R. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. México: Mc Graw Hill.
- Hailu, M., Endale, G., & Gemedo, L. (2019). Review on Diagnostic Methods of Trypanosomosis. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(3), 1-5.
- Hailu, M., Endale, G., & Gemedo, L. (2019). Review on Diagnostic Methods of Trypanosomosis. *Journal of Dairy & Veterinary Sciences*, 11(3), 1-5.
- Hilali, M., Abdel, A., Nassar, A., Magnus, E., & Büscher, P. (2004). Evaluation of the card agglutination test (CATT/T. evansi) for detection of *Trypanosoma evansi* infection in water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Veterinary Parasitology*, 121(1), 45-51.
- Hnasko, R. (2015). *ELISA: Methods and Protocols*. New York: Humana Press.
- Inojosa, W., Augusto, I., Bisoff, Z., Josenado, T., Abel, P., Stich, A., & Whitty, C. (2006). Diagnosing human African trypanosomiasis in Angola using a card agglutination test: Observational study of active and passive case finding strategies. *BMJ: British Medical Journal*, 332(7556), 1-5.
- INTA EEA. (2012). *Tábanos*. Obtenido de Grupo de Ecología de Poblaciones de Insectos INTA EEA: [https://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna\\_insectos/07-tabanos.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/fauna/Fauna_insectos/07-tabanos.pdf)

- Jackson, A., Goyard, S., Xia, D., Foth, B., Sanders, M., Wastling, J., . . . Berriman, M. (2015). Global Gene Expression Profiling through the Complete Life Cycle of *Trypanosoma vivax*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(8), 1-29.
- Kakundi, E. (2008). *Molecular analysis of the congopain gene family*. Pietermaritzburg.
- Magez, S., Pinto, J., Obishakin, E., & Radwanska, M. (2020). Infections With Extracellular Trypanosomes Require Control by Efficient Innate Immune Mechanisms and Can Result in the Destruction of the Mammalian Humoral Immune System. *Frontiers in Immunology*, 11(382), 1-19.
- Magez, S., Pinto, J., Oh, S., & Radwanska, M. (2021). Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System. *Pathogens*, 10(6), 679.
- Monteiro, L. F., Maffini, L., Beltrán, D. M., Moura, M., Lage, G., Souza, A., . . . Zanetti, W. (2022). Presence of *Trypanosoma vivax* DNA in cattle semen and reproductive tissues and related changes in sperm parameters. *Veterinary Parasitology*, 309(1).
- Murphy, N., Cardinal, V., Bhattacharyya, T., Enriquez, G., Macchiaverna, N., Alvedro, A., . . . Miles, M. (2021). Assessing antibody decline after chemotherapy of early chronic Chagas disease patients. *Parasites & Vectors*, 14(543), 1-12.
- Nok, A. (2009). Chapter 62 - African Trypanosomiasis. En A. Barrett, & L. Stanberry, *Vaccines for Biodefense and Emerging and Neglected Diseases* (págs. 1255-1273). Academic Press.
- OIE. (2018). *Manual Terrestre de la OIE*. Obtenido de [https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/3.04.16\\_TRYPANOSOMOSIS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/3.04.16_TRYPANOSOMOSIS.pdf)
- Orbe, D., & Cuichán, M. (2022). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. Retrieved from INEC: <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

inec/Estadisticas\_agropecuarias/espac/espac-  
2021/Bolet%C3%ADn%20t%C3%A9cnico.pdf

- Ortega, H., Ron, J., Reyna, A., & Chavez, M. A. (2014). Primer reporte e identificación molecular de *Trypanosoma vivax* en bovinos del Ecuador. *Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE*.
- Osório, A. L., Madruga, C., Desquesnes, M., Soares, C., Rios, L., & Gonçalves da Costa, S. (2008). *Trypanosoma* (Duttonella) *vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 1-13.
- Radwanska, M., Vereecke, N., Deleeuw, V., Pinto, J., & Magez, S. (2018). Salivarian *Trypanosomosis*: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System. *Frontiers in Immunology*, 9(2253), 1-20.
- Ramírez, R., Angulo, F., Gil, M., Parra, O., Tavares, L., Holzmüller, P., . . . Reyna, A. (2015). Respuesta inmunitaria de ovinos (*Ovis aries*) frente a dos aislados Venezolanos de *Trypanosoma vivax*. *Revista Científica*, 25(5), 361-367.
- Ramirez, R., Reyna, A., Parra, O., Valeris, R., Tavares, L., Brizard, J. P., . . . Holzmuller, P. (2019). *Trypanosoma vivax* infection in sheep: Different patterns of virulence and pathogenicity associated with differentially expressed proteomes. *Veterinary Parasitology*, 276(1), 1-14.
- Ramirez, R., Reyna, A., Parra, O., Valeris, R., Tavares, L., Brizard, J. P., . . . Holzmuller, P. (2019). *Trypanosoma vivax* infection in sheep: Different patterns of virulence and pathogenicity associated with differentially expressed proteomes. *Veterinary Parasitology*, 276(1), 1-14.

- Reck, C., Menin, Á., Batista, F., Oliveira, P., & Miletti, L. (2021). Evaluation of buffered Trypanosoma evansi antigen and rapid serum agglutination test (BA/Te) for the detection of anti-T. evansi antibodies in horses in Brazil. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, 1(1), 1-4.
- Reyna, A., Eleizalde, M., & Silva, A. (2007). Assessment of Chromogen Suitability in ELISA for the Detection of Anaplasmosis and Trypanosomosis. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 28(1), 1-11.
- Reyna, A., García, F., Rivera, M., Sánso, B., & Aso, P. (1998). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of anti-Trypanosoma evansi equine antibodies. *Veterinary Parasitology*, 80(1), 149-157.
- Reyna-Bello, A., Cloeckert, A., Vizcaíno, N., Gonzatti, M., Aso, P., Dubray, G., & Zygmunt, M. (1998). *Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Recombinant Major Surface Protein 5 for Serological Diagnosis of Bovine Anaplasmosis in Venezuela*. doi:<https://doi.org/10.1128/cdli.5.2.259-262.1998>
- Richards, S., Morrison, L., Torr, S., Barrett, M., Manangwa, O., Mramba, F., & Auty, H. (2021). Pharma to farmer: Field challenges of optimizing trypanocide use in African animal trypanosomiasis. *Trends in Parasitology*, 37(9), 831-843.
- Rodrigues, C., Garcia, H., Rodrigues, A., Costa-Martins, A., Pereira, C., Pereira, D., . . . Teixeira, M. (2017). New insights from Gorongosa National Park and Niassa National Reserve of Mozambique increasing the genetic diversity of Trypanosoma vivax and Trypanosoma vivax-like in tsetse flies, wild ungulates and livestock from East Africa. *Parasites & Vectors*, 10(337).
- Rodríguez, N. (2011). *Epidemiología clínica y molecular de la tripanosomosis animal por Trypanosoma evansi en Canarias*. Tesis Doctoral.

- Schroeder, H., & Cavacini, L. (2010). Structure and Function of Immunoglobulins. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(202), 41-52.
- Seidl, A., Dávila, A., & Silva, R. (1999). Estimated Financial Impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 269-272.
- Sekoni, V. O. (1994). Reproductive disorders caused by animal trypanosomiasis: A review. *Theriogenology*, 42(4), 557-570.
- Sellon, D. (2007). CHAPTER 61 - Miscellaneous Parasitic Diseases. En D. Sellon, & M. Long, *Equine Infectious Diseases* (págs. 473-480). Saunders.
- Seyoum, W., Tora, E., Kore, K., & Lejebo, F. (2022). Seasonal Patterns: Bovine Trypanosomosis, *Glossina pallidipes* Density, and Infection in Rift Valleys of Gamo Zone, Southern Ethiopia. *Frontiers in Veterinary Science*, 1(1), 1-13.
- Shivam, S., EL-Matbouli, M., & Kumar, G. (2021). Kinetics of Parasite-Specific Antibody and B-Cell-Associated Gene Expression in Brown Trout, *Salmo trutta* during Proliferative Kidney Disease. *Biology*, 10, 1-17.
- SIPA. (2021). *Indicadores sectoriales*. Obtenido de <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/indicador-agroeconomico>
- Suárez, C., García, F., Román, D., Coronado, A., Perrone, T., Reyna, A., & Parra, N. (2009). Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 27(4), 363-372.
- Suárez, C., García, F., Román, D., Coronado, A., Perrone, T., Reyna, A., & Parra, N. (2009). Factores de riesgo asociados a la tripanosomosis bovina en explotaciones ganaderas de Venezuela. *Zootecnia Tropical*, 27(4), 363-372.
- Tamasaukas, R., Tamasauskas, C., Cobo, M., & Rivera, S. (2017). Evaluación en campo de un ELISA indirecto, desarrollado con productos antigénicos especie-específicos de



- Trypanosoma vivax para el diagnóstico de la tripanosomosis bovina. Fases: I- Preparación y rendimiento de los antígenos, y II-Validación del Ac-ELISA h. *Maskana*, 8, 29-35.
- Tehseen, S., Jahan, N., Qamar, M. F., Desquesnes, M., Shahzad, M. I., Deborggraeve, S., & Philippe, B. (2015). Parasitological, serological and molecular survey of Trypanosoma evansi infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasites & Vectors*, 415(8).
- Tizard, I. (2009). *Veterinary Immunology*. Barcelona: Elsevier.
- Uzcanga, G., Mendoza, M., Aso, P., & Bubis, J. (2002). Purification of a 64 kDa antigen from Trypanosoma evansi that exhibits cross-reactivity with Trypanosoma vivax. *Parasitology*, 124(3), 287-299.
- Uzcanga, G., Pérez, Y., Camargo, R., Izquier, A., Noda, J., Chacín, R., . . . Bubis, J. (2016). Serodiagnosis of bovine trypanosomosis caused by non-tsetse transmitted Trypanosoma (Duttonella) vivax parasites using the soluble form of a Trypanozoon variant surface glycoprotein antigen. *Veterinary Parasitology*, 218(1), 31-42.
- Uzcanga, G., Perrone, T., Noda, J., Pérez, J., Medina, R., Hoebeke, J., & Bubis, J. (2004). Surface glycoprotein from Trypanosoma evansi is partially responsible for cross-reaction between Trypanosoma evansi and Trypanosoma vivax. *Biochemistry*, 43(3), 595-606.
- Uzcanga, G., Perrone, T., Noda, J., Pérez, J., Medina, R., Hoebeke, J., & Bubis, J. (2004). Surface Glycoprotein from Trypanosoma eVansi Is Partially Responsible for Cross-Reaction between Trypanosoma eVansi and Trypanosoma ViVax. *Biochemistry*, 43(3), 595-606.
- Vásconez, L. (22 de Noviembre de 2017). Las reses mueren en Chone por la tripanosomiasis. *El Comercio*.

- Wells, E. A., Betancourt, A., & Page, W. A. (1970). The epidemiology of bovine trypanosomiasis in Colombia. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2(1), 111–125.
- Wells, E. A., Betancourt, A., & Ramirez, L. E. (1977). Serological evidence for the geographical distribution of *Trypanosoma vivax* in the New World. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1(5), 448-449.
- Zanette, M., Felix, V., Laurenti, M., Rossi, C., Vides, J., Costa, R., . . . Marcondes, M. (2013). Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.

## Apéndices