

Resumen

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

Palabras Clave: ELISA, MSP5, MSP5r, avididad.

Abstract

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

Key Words: ELISA, MSP5, MSP5r, avidity.