



Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura



Trabajo de Integración Curricular Previo a la Obtención
del Título de Ingeniera en Biotecnología

Estandarización de un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar65Kda como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis Bovina

Autor: Aguirre Quezada, Jenniffer Alejandra

Director: Reyna Bello, Armando

Santo Domingo
Septiembre del 2023

Introducción

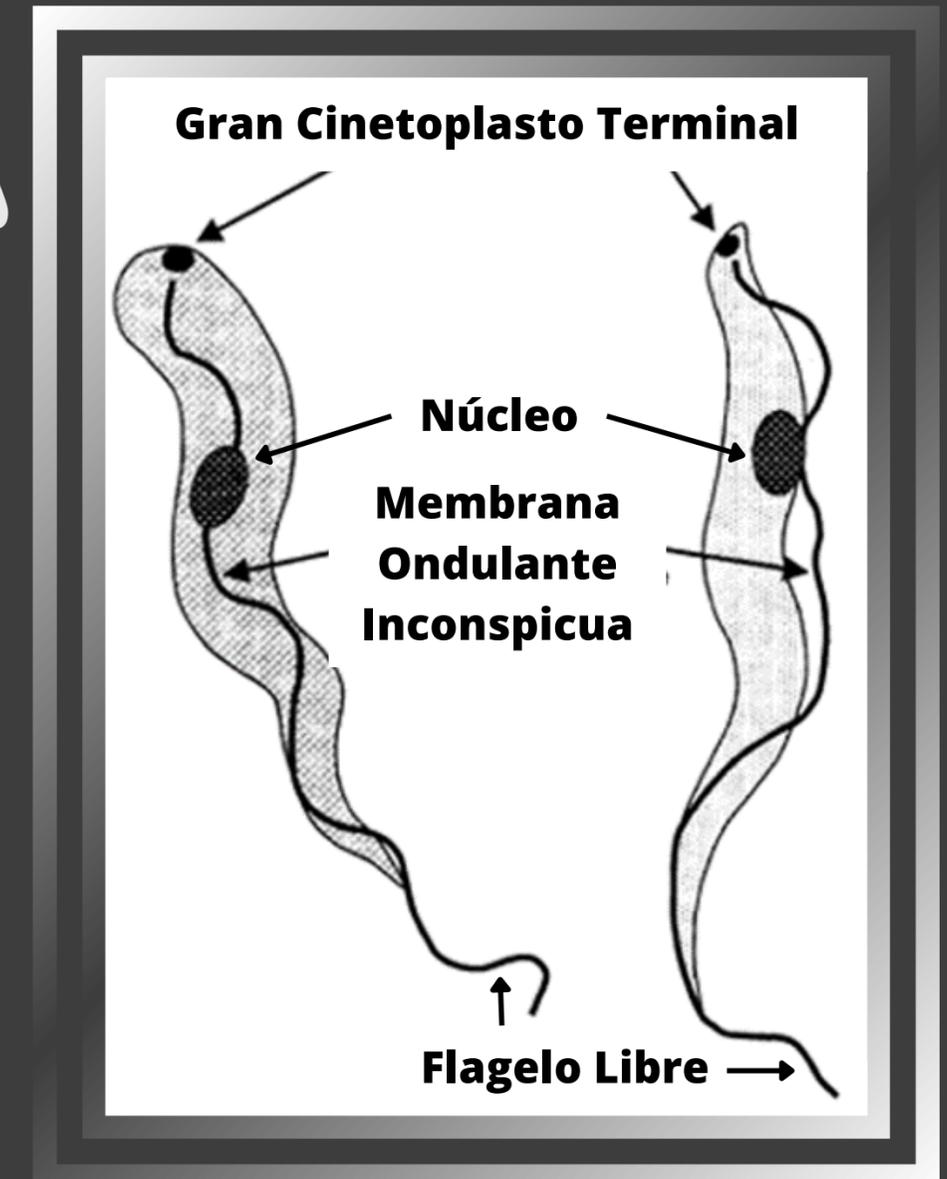
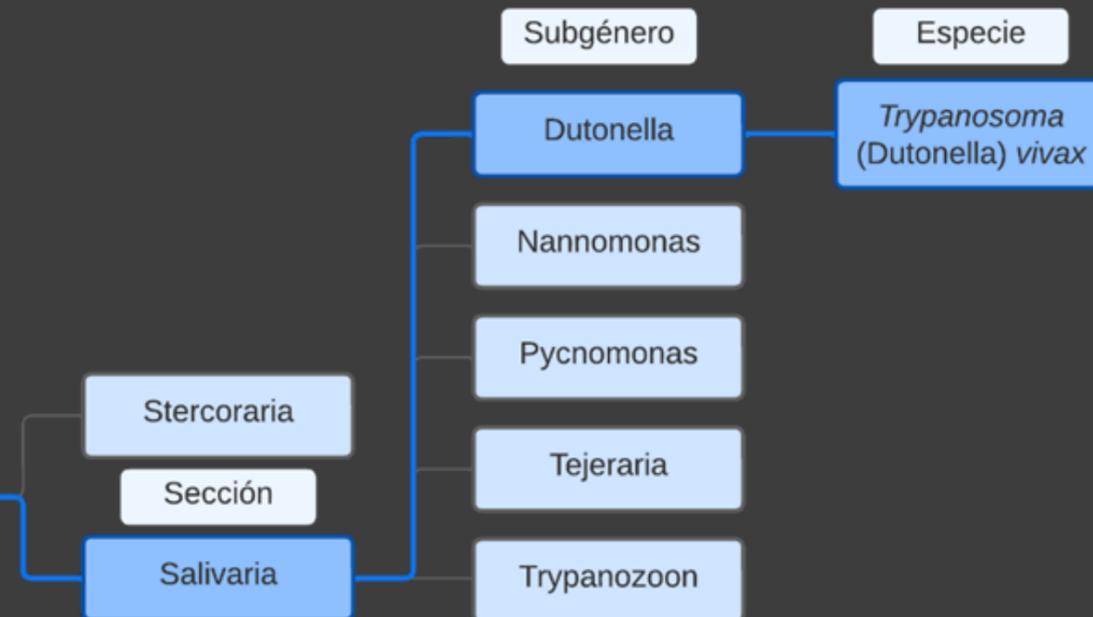
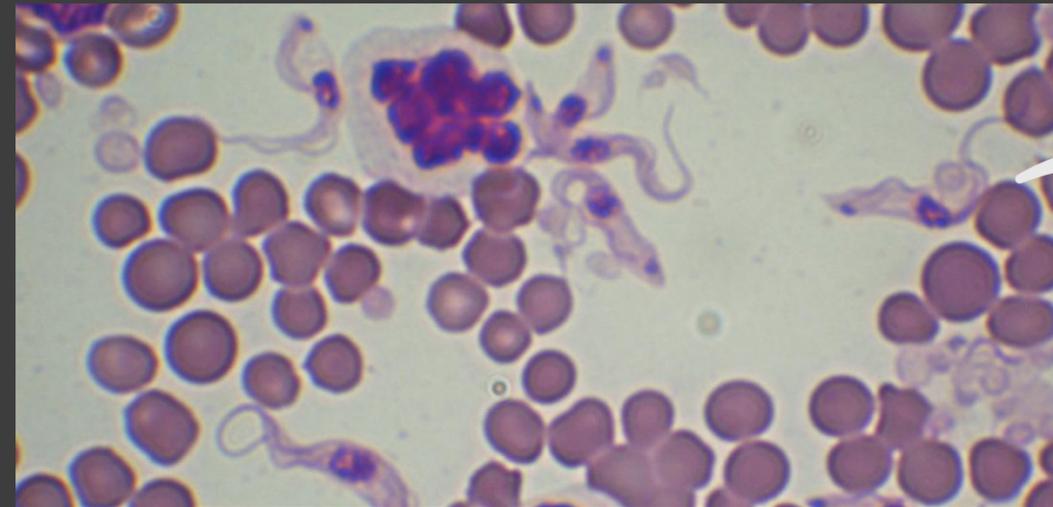


- **Tripanosomosis Bovina**
 - Nagana - África.
 - Cachera, Huequera, Secadera en América Latina.
- *Trypanosoma vivax*
 - Tsétse - África.
 - Transmisión Cíclica.
 - Tábanos - América latina.
 - Transmisión Mecánica.
- Pérdidas Económicas.
 - Disminución:
 - Producción de carne y leche.
 - Capacidad reproductiva.

Introducción

Trypanosoma vivax

Dominio	Eukaryota
Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Clado	Discoba
Filo	Euglenozoa
Clase	Kinetoplastea
Subclase	Metakinetoplastina
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>



Desquesnes (2004); Gonzatti et al. (2014).

Introducción

Distribución e Importancia



32.43%
81,399 / 251,000



US\$ 58,802
(2020)



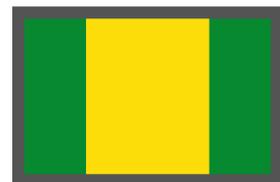
14.47%
32,213 / 222,624

US\$ 32,631
(1995)



16.83%
135,558 / 805,455

US\$ 5,654
(1978)



17.65%
24,754 / 140,254

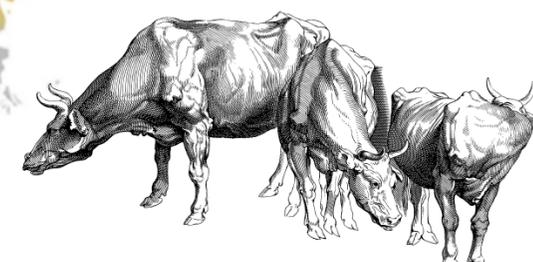
33.5€ - 3.3%
(1992)



3.9 millones de cabezas de ganado (2022)

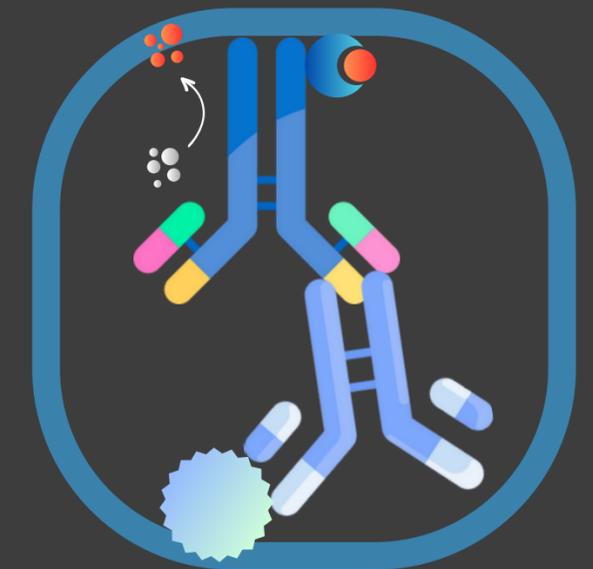


US\$ 1.0 - 1.2
Billones



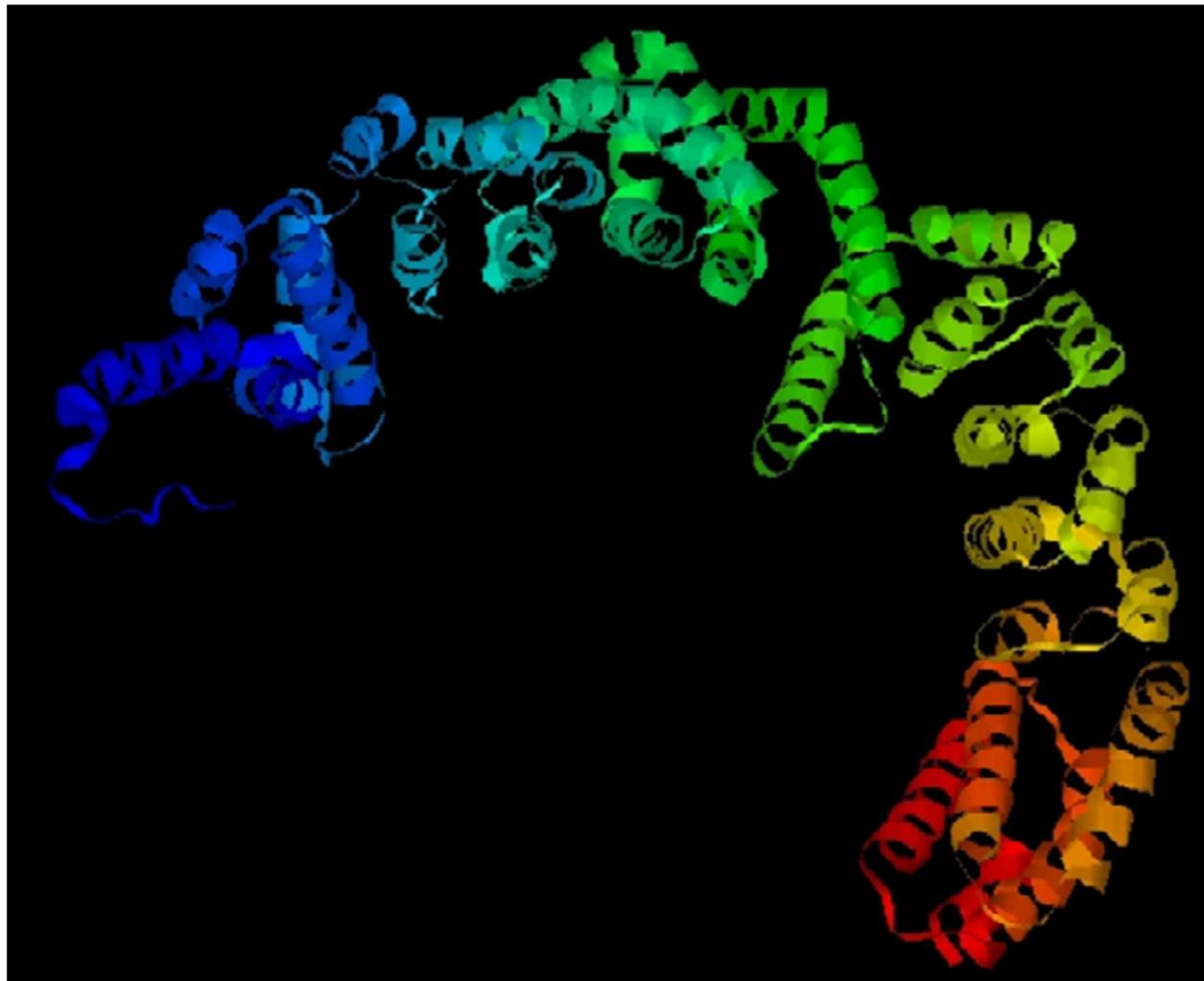
Introducción

Aspectos Clínicos y Diagnóstico



Introducción

Paraflagelar65KDa



>TVMIRANOV_C30

```
1  MSAKEVGTVPADQQQPAVPEVTDITLEAARKQKIHNKLTACLSTNEEYVQDLHVSTWS
61  ETQRQKLQTAHEKAHELLAAVEGGTKWSLTEAYDIRKLMRVCGLELSVRELYKPEDKPQF
121 MEIVALKKTLNELKQHNNKTRTVSFTGTIDNAIAKLEKIEDELRRSQLDASEMAQVPVAM
181 LKNVEDCMNVTVVQTALLGNEEQIKLQLEAIKKASDIRNVAIADGEMAI AEEQYYIKAQL
241  LEHLVELVADKFR IIGQTE DENKQFSKIHEVQKKS FQEAAA IKDAKRRLKQRCEDDLKSL
301  HDTIQKADLEDAEAMKRFASQKEKSERF IHNLDKQDEAWRRIQELERVLQRLGTERFEE
361  VKRRIEENDREEKRKVEYQQFLDVC GQHKKLLELSVYNCDLALRCMGMLEEIMAE GCSAI
421 KSRHDKTCEELASLSLQVHQEYLEAFRRLYKTLGQLVYKKEKRLEEIDRNI RTTHIQLEF
481 AIETFDPNAKQHS DRKKELYKLRAQVEE ELEM LKDKMAQALEMFGPTEDALNQAGIEFVH
541 PAEEVEDGNMNRRSKMVEYRAHLAKQEEVKIAAEREELKRSKMLQSQQHRGRTVQQIT
```

Regiones antigénicas



Objetivos

Objetivo General

Estandarizar un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar 65KDa como antígeno para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina.

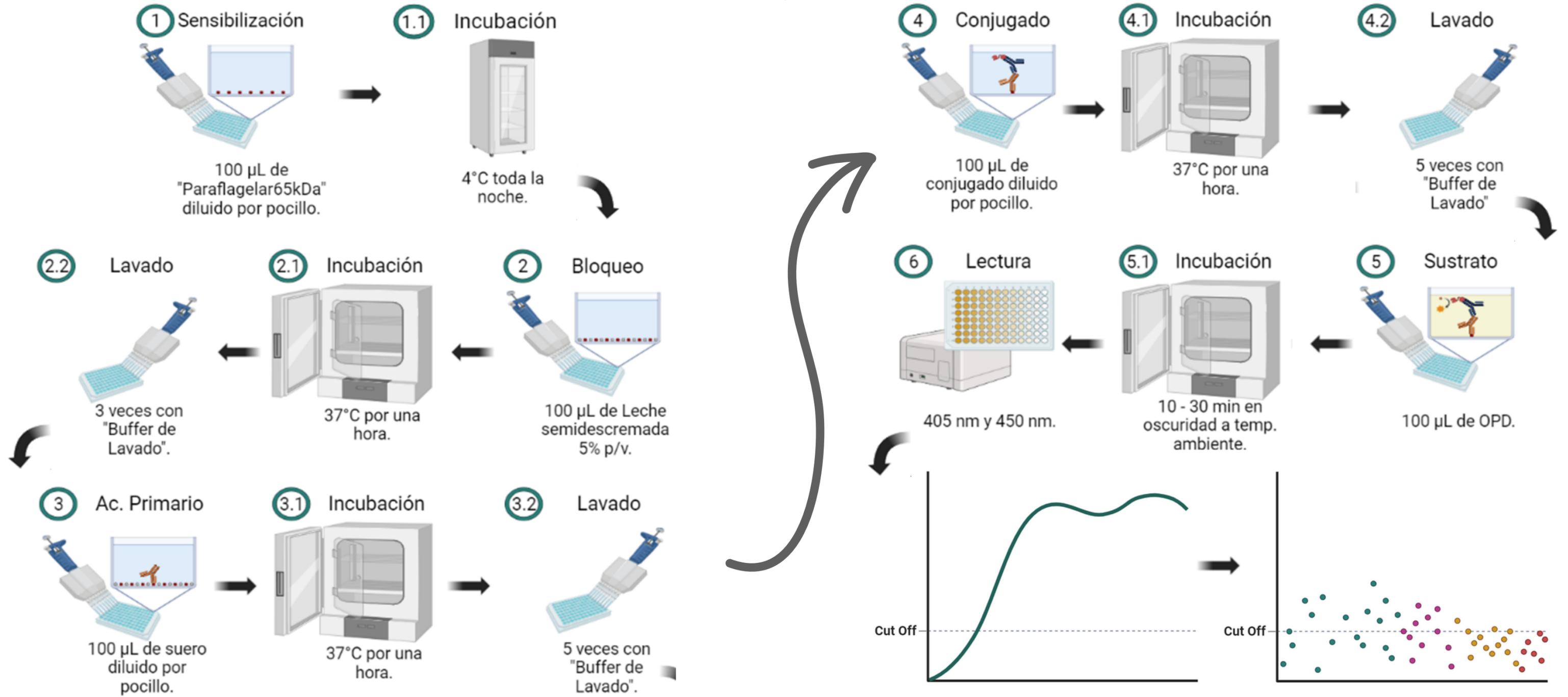
Objetivos Específicos

- Estandarizar un ELISA utilizando la proteína recombinante Paraflagelar 65KDa como antígeno.
- Evaluar la fiabilidad del ELISA frente a sueros provenientes de infecciones experimentales.
- Determinar la sensibilidad y especificidad del ELISA frente a una prueba PCR.

Hipótesis

La proteína recombinante “Paraflagelar65KDa” es antigénica y puede emplearse para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina mediante un ELISA indirecto estandarizado.

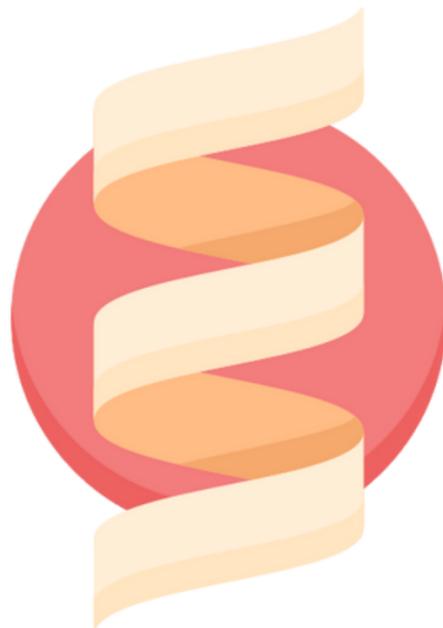
Materiales y Métodos



Resultados y Discusión

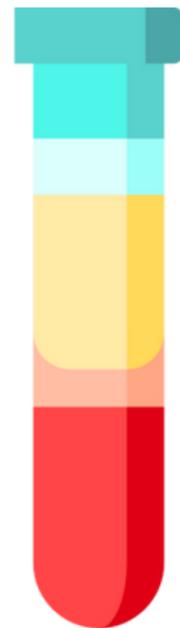
Estandarización

Antígeno



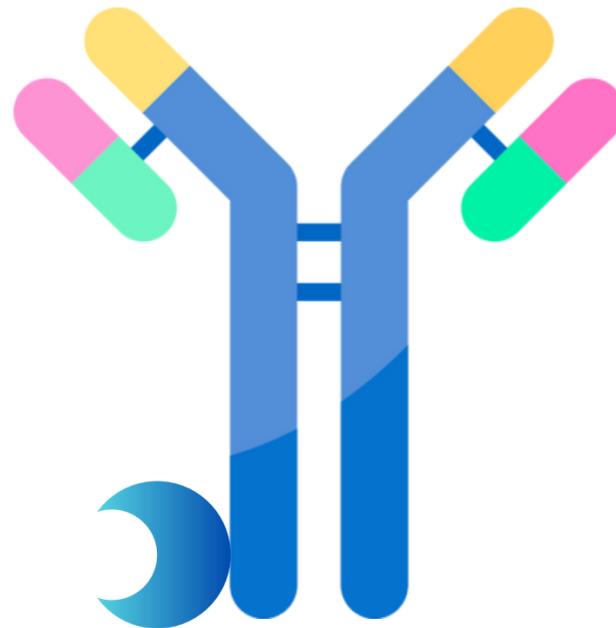
2 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Suero



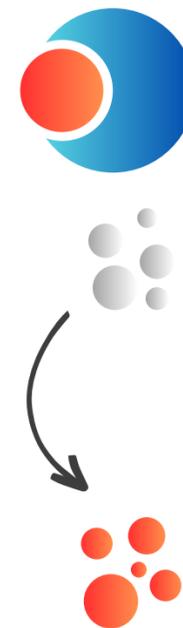
1/200

Conjugado



1/4000

Sustrato



OPD - 30 min

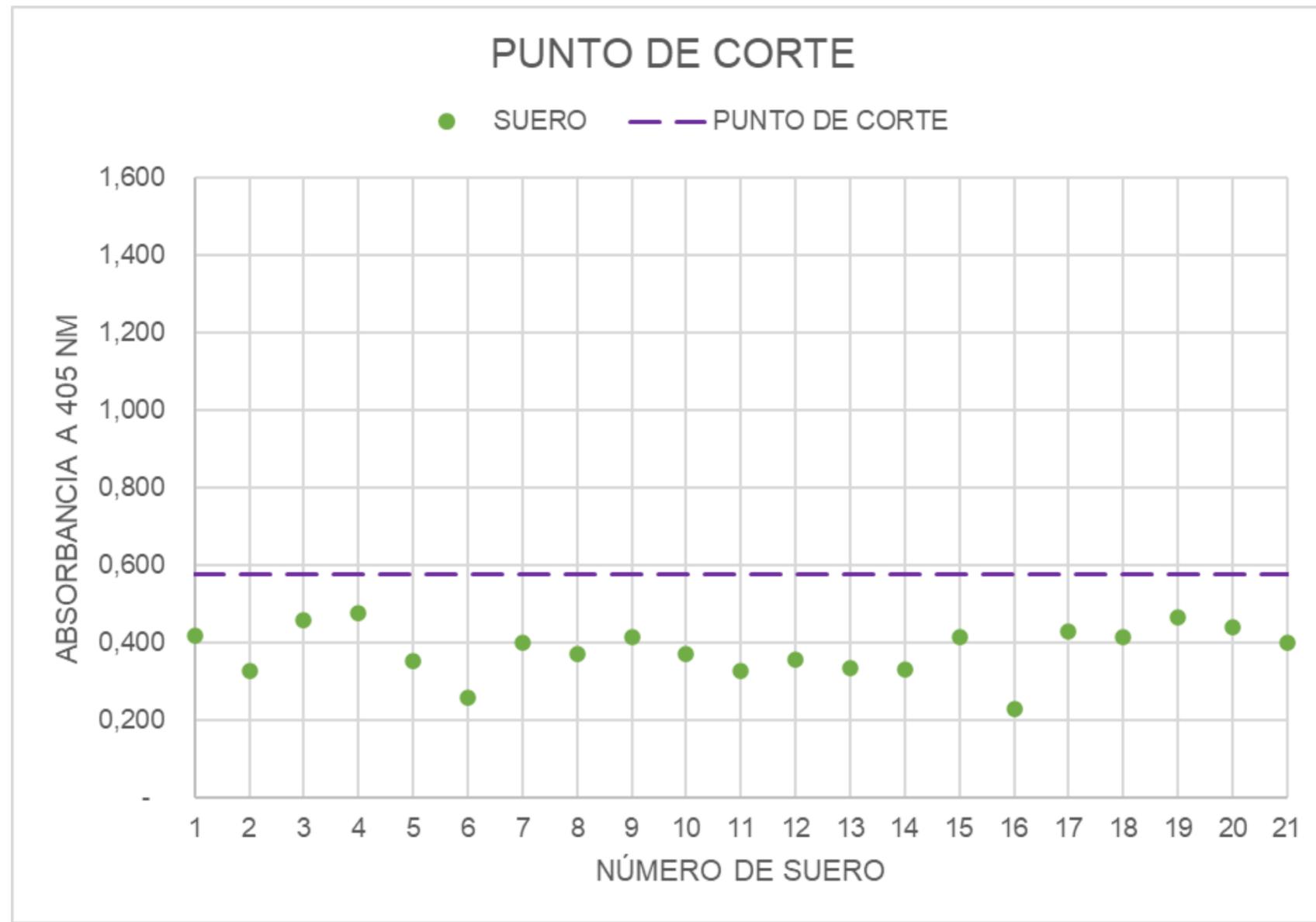
Lectura



405 nm

Resultados y Discusión

Punto de Corte



IASA - Zona libre de
Trypanosoma vivax

21 sueros negativos para *T. vivax*

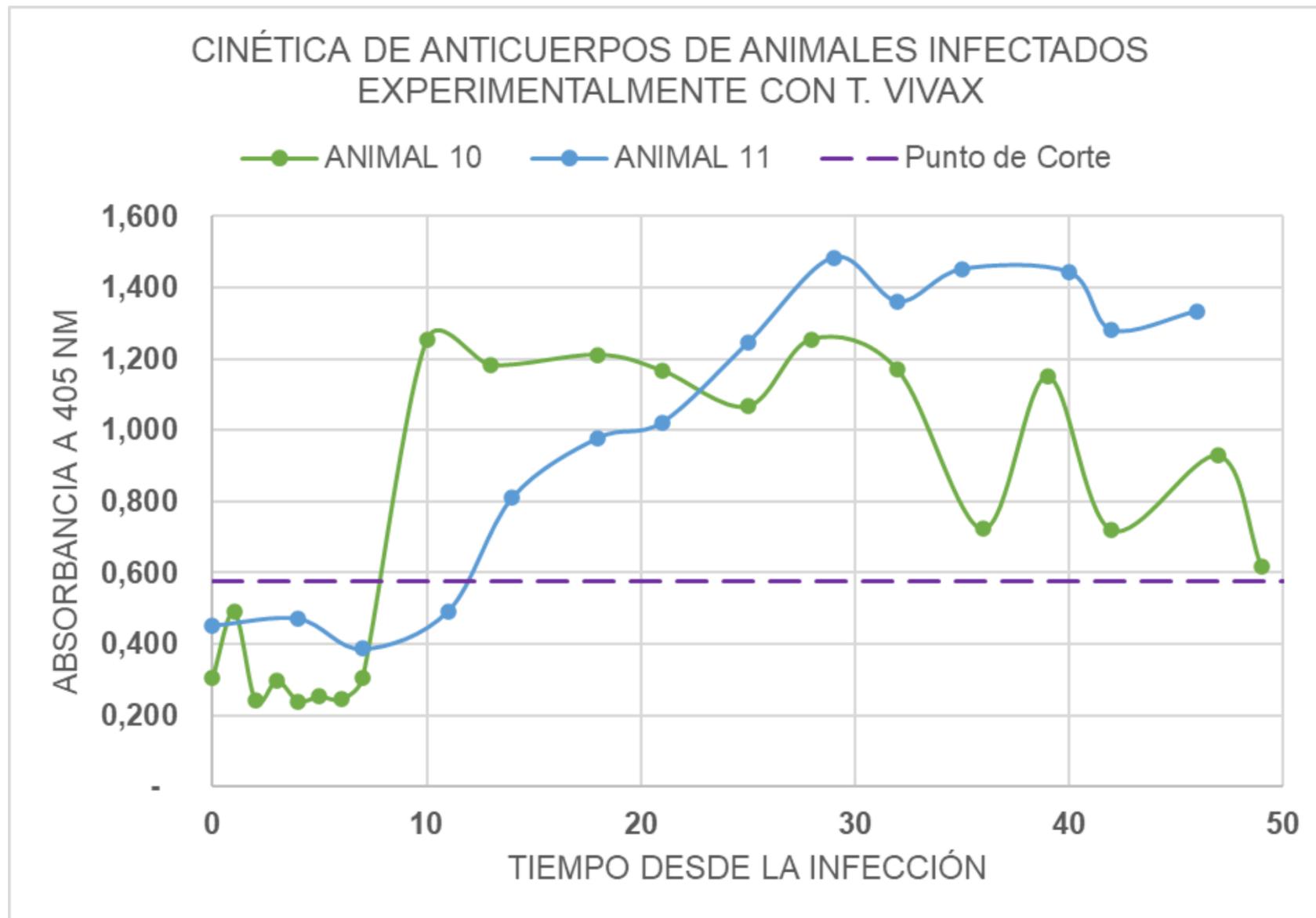
$$\text{Punto de Corte} = \bar{X} + 3\sigma$$

$$\text{Punto de Corte} = 0.381 + 3(0.065)$$

$$\text{Punto de Corte} = 0.575$$

Resultados y Discusión

Cinética de Anticuerpos



Infección Experimental



Animal 10

"Donante"

20 sueros

Día 10

Animal 11

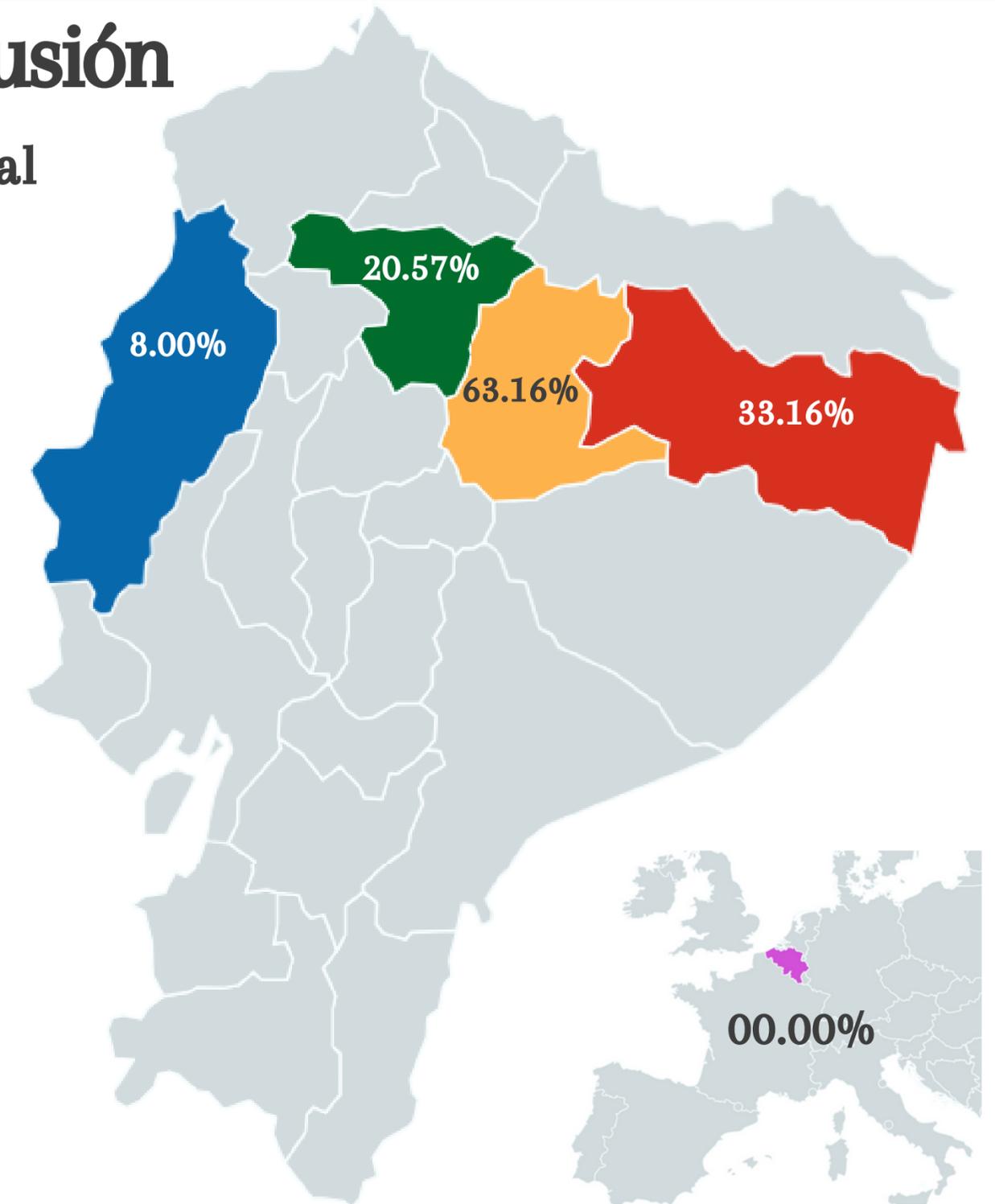
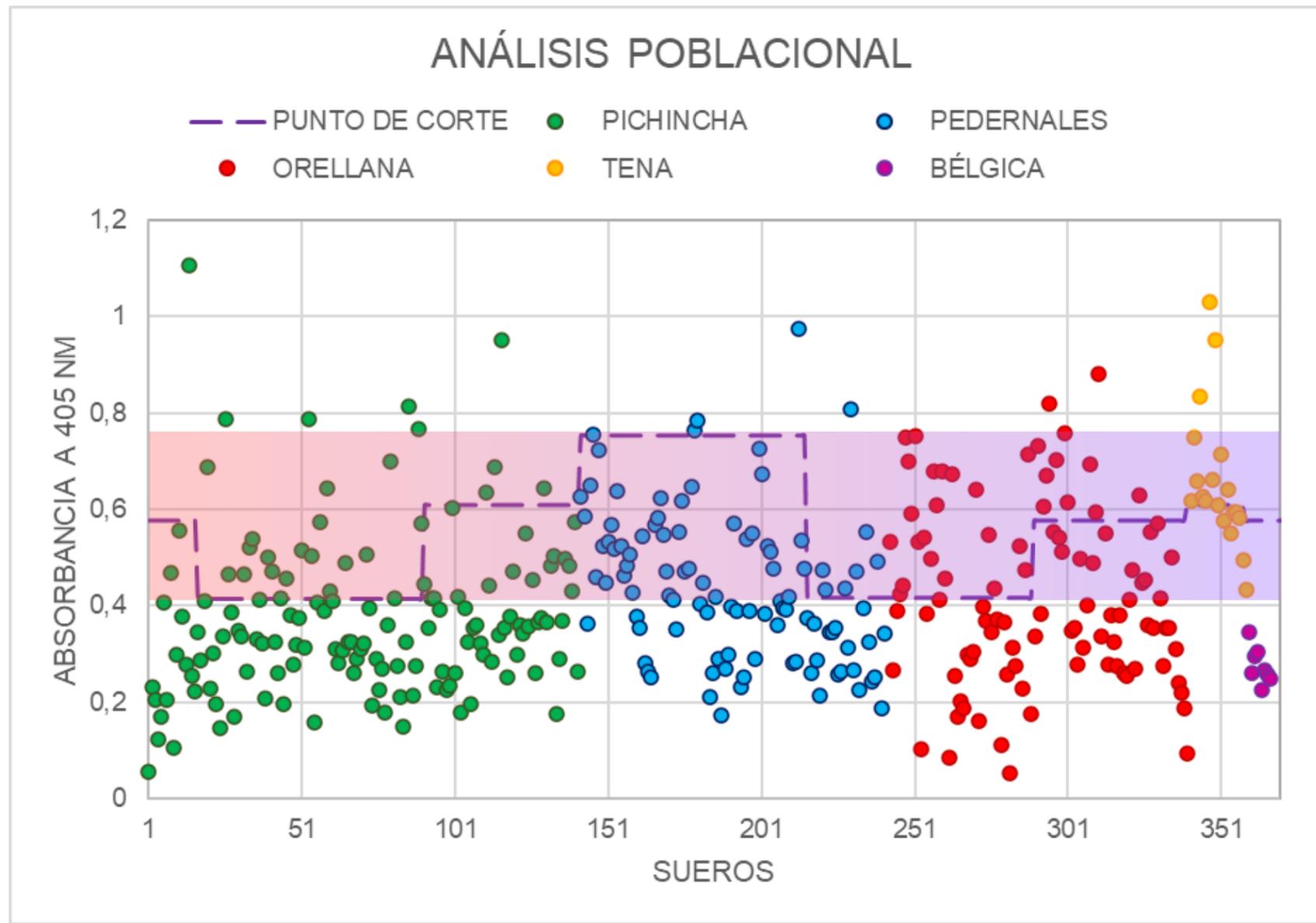
"Control Positivo"

14 sueros

Día 14

Resultados y Discusión

Análisis Poblacional



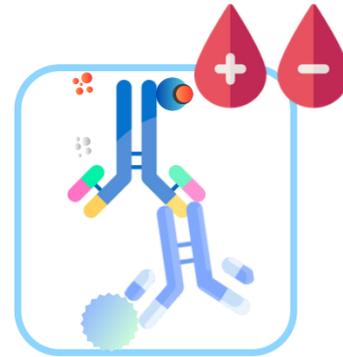
Resultados y Discusión

Sensibilidad Global: 5.26% ≠ 98% Desquesnes et al. (2022).

VPP: 1.1%

✓ Positivo

✓ Infectado

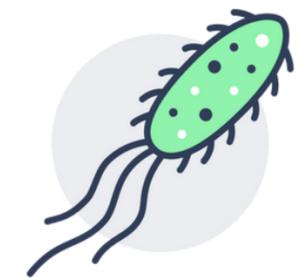
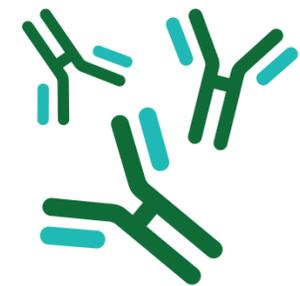


S: 0.00%

S: 0.00%

S: 21.42%

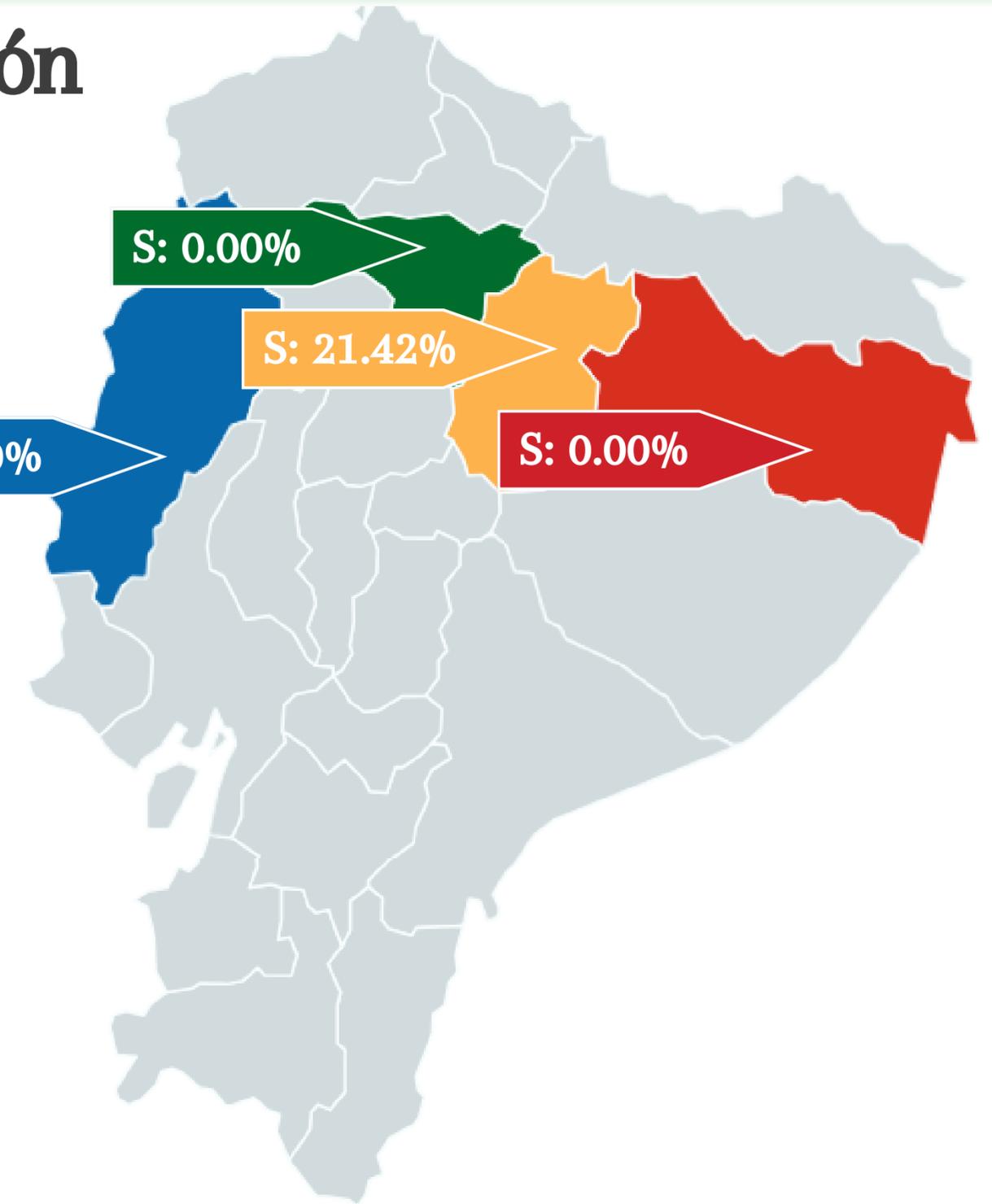
S: 0.00%



- 10 - 20 días Post Infección
- 2 - 3 meses Post Tratamiento
- Ausencia del Parásito
- GImS - 67 KDa
 - Glucosamina 6 fosfato sintasa
- Copurificación o captura única
- IgG anti *E. coli*

PCR
Negativo

ELISA
Positivo



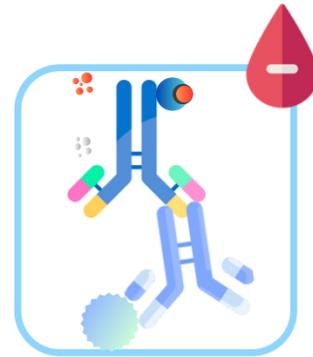
Resultados y Discusión

Especificidad Global: 75.65% \neq 97% Desquesnes et al. (2022).

VPN: 93.66%

 **Negativo**

 **Sano**

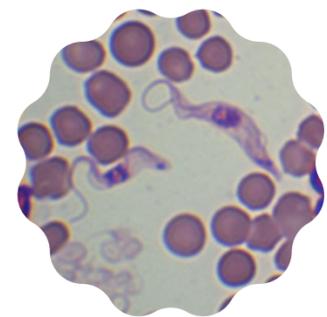


E: 91.11%

E: 79.43%

E: 21.42%

E: 64.89%

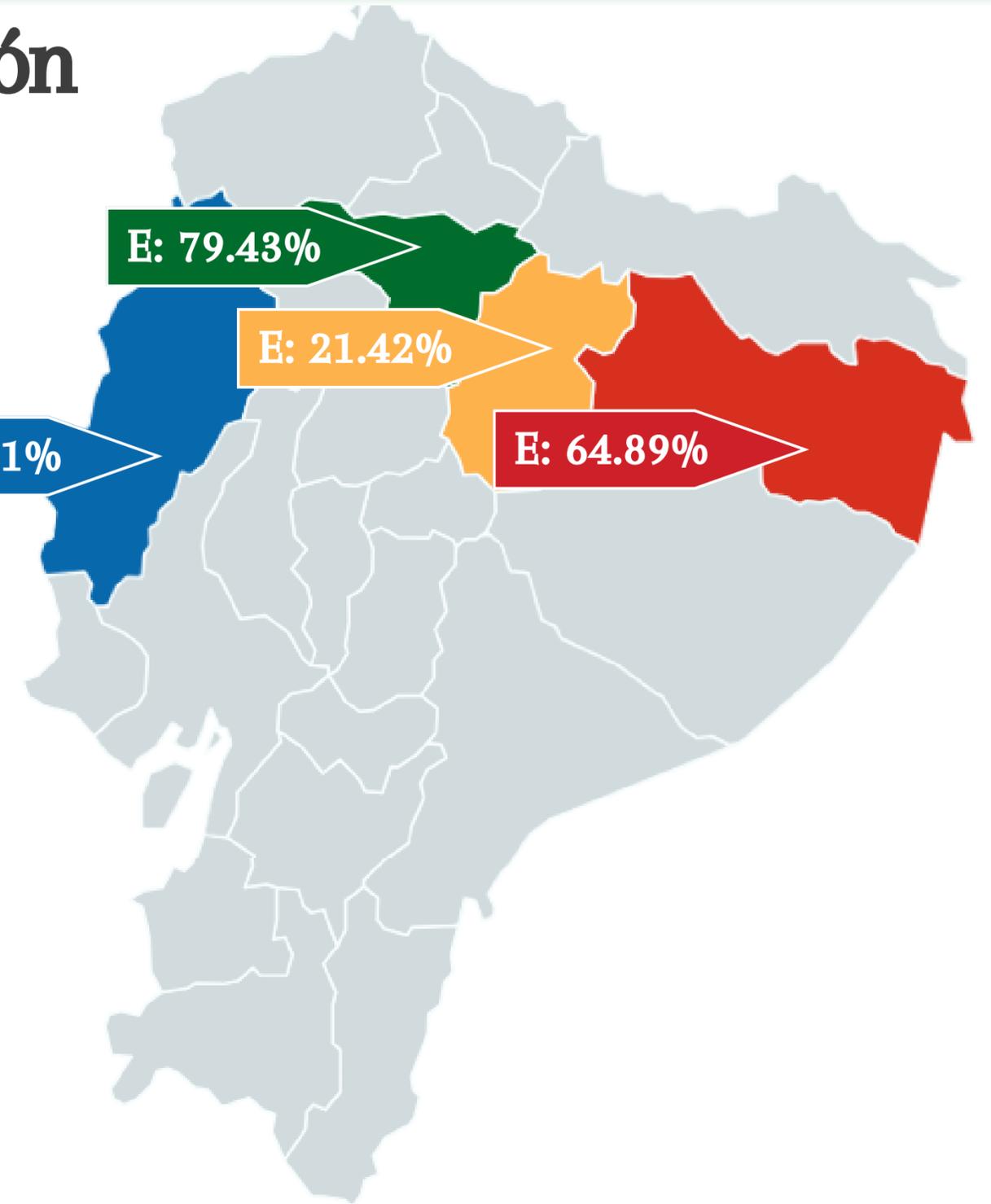


- Infección activa
- Etapas tempranas
- Presencia del Parásito

PCR y Woo
Positivo
ELISA
Negativo



- Identificación de animales libres de infección
 - 266/366 Verdaderos Negativos
 - Ausencia de Anticuerpos
 - Ausencia del Parásito



Conclusiones

Condiciones Óptimas

Antígeno



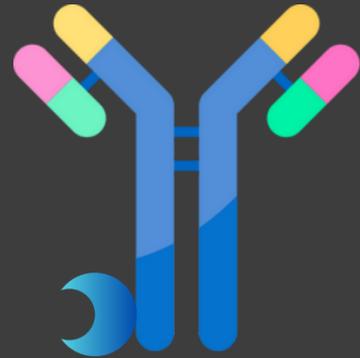
2 µg/mL

Suero



1/200

Conjugado



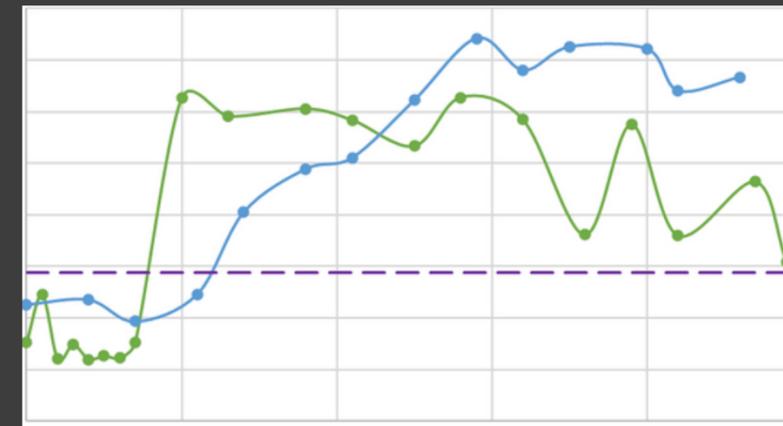
1/4000

Sustrato

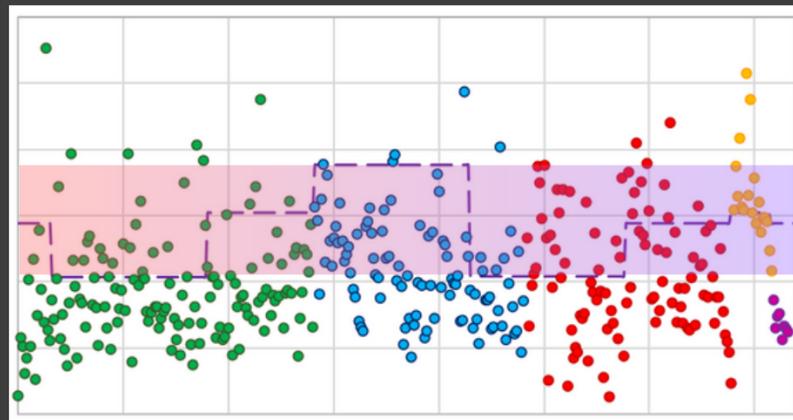


OPD - 30 min

Capacidad de detectar la presencia de anticuerpos anti *Trypanosoma vivax*



Capacidad de diferenciar entre animales sanos e infectados



Sensibilidad (5.26%) y Especificidad (75.65%)

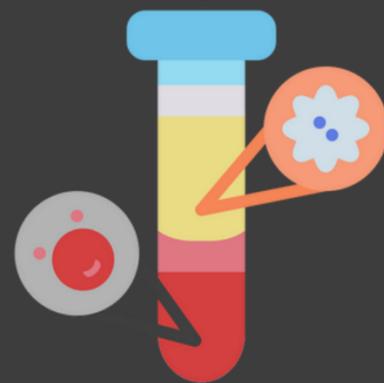
A pesar de ello queda demostrado el potencial de la prueba para el diagnóstico de la Tripanosomosis bovina causada por *Trypanosoma vivax*.

Recomendaciones

Uso "Paraflagelar65KDa"



Investigación



Diagnóstico

Futuros estudios

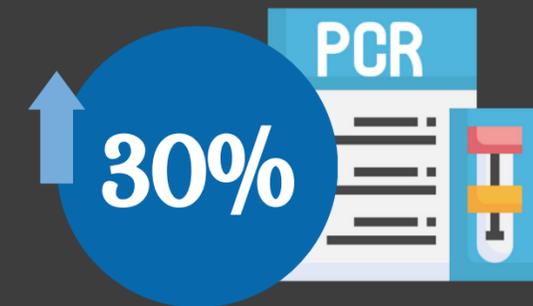
Estado de la Infección

Análisis complementarios.



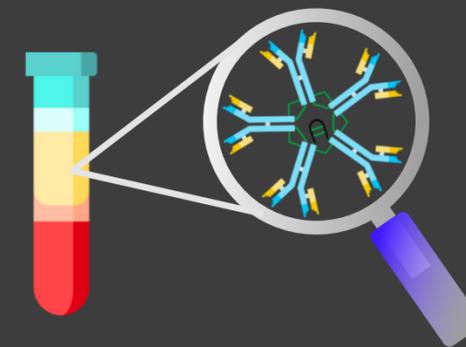
Validez de la Prueba

Poblaciones con prevalencia superior al 30% por PCR y sin tratamiento.



Infecciones Activas

Detección de IgM



Agradecimientos



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



ARES

ACADÉMIE
DE RECHERCHE ET
D'ENSEIGNEMENT
SUPÉRIEUR



GISAH

Grupo de Investigación en
Sanidad Animal y Humana

Dr. Armando Reyna Bello

Ing. Fausto Bedoya

Laboratorio de Biología Molecular

Laboratorio de Biotecnología Animal - Matriz

Familia y Amigos

El trabajo de titulación fue realizado dentro del marco de actividades del proyecto **"Establecimiento de una plataforma en apoyo a la formación y sensibilización, diagnóstico y desarrollo de una estrategia de control de la brucelosis y tripanosomosis en Ecuador (BruTryp)"**, financiado por la Academia de Investigación y Enseñanza Superior - **ARES de Bélgica**.

