

DESARROLLO DE UN ENSAYO SEROLOGICO PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA TRIPANOSOMIASIS BOVINA

Verónica Castro¹

1. Laboratorio de Tecnología Inmunológica- FBCB, UNL- Santa Fe, Argentina.

Director: Dr. Iván Bontempi

Área: Ciencias de la Salud

Palabras clave: *T. vivax*, ELISA, diagnóstico

INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Bovina (TB) es una enfermedad de distribución mundial ocasionada principalmente por el parásito *Trypanosoma vivax* (*T. vivax*). Fue descrita por primera vez en África en el año 1905 (Osório y col., 2008) y a pesar de su origen en el continente africano, se ha evidenciado la presencia de esta enfermedad en Sudamérica (Cortez y col., 2006; García y col., 2014). En Argentina, la detección de *T. vivax* se produjo por primera vez en la provincia de Formosa a finales del año 2006 (Monzón y col., 2013). En 2017 y 2018, diferentes informes han declarado la presencia de dicho agente infeccioso en numerosos establecimientos lecheros de las provincias de Formosa, Corrientes, Chaco, Córdoba y Santa Fe (SENASA, 2017; INTA, 2018).

La TB produce signos clínicos como fiebre intermitente, anemia, aborto, apatía, anorexia, disminución de la producción de leche, pérdida progresiva de peso y ocasionalmente la muerte en el 50% de los animales no tratados (Osório et al., 2008). Estudios realizados en el año 2017 en bovinos de un establecimiento lechero ubicado en el Departamento Castellanos (Santa Fe, Argentina) evidenciaron las pérdidas económicas y productivas relacionadas a esta enfermedad, provocando gastos de hasta 58.802,4 USD considerando abortos, muertes, venta de animales improductivos y tratamiento específico (Abdala y col., 2020).

Un gran inconveniente de la enfermedad recae en su diagnóstico, que por defecto se realiza por microscopía directa, siendo una técnica poco sensible. Actualmente existe el servicio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), el cual suele presentar elevados costos, debido a la necesidad de personal capacitado y equipamiento específico. Es por esto que el desarrollo de técnicas serológicas como el ensayo de ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) que detecten anticuerpos específicos contra el parásito, serían una alternativa ideal para el diagnóstico de la TB. Esta técnica ofrece una gran sensibilidad y especificidad, permitiendo discriminar correctamente entre presencia y ausencia de la enfermedad en cualquier estadio, además, reduce los costos comparados con las técnicas previamente mencionadas. Actualmente en Argentina no existe un diagnóstico serológico comercial y accesible para detectar la enfermedad.

Por esta razón presentamos el desarrollo de un ELISA indirecto para la detección de *T. vivax*. Además, analizamos la prevalencia en establecimientos lecheros provenientes de la cuenca lechera de Argentina utilizando el ensayo serológico obtenido.

Título del proyecto: Desarrollo de un kit para detectar anticuerpos anti *Trypanosoma vivax* destinado a lograr el control de dicha infección en bovinos de producción lechera.

Instrumento: ASETEI IO-2018-00120

Año convocatoria: período 2020-2022

Organismo financiador: Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación de Santa Fe

Director del proyecto: Bontempi Iván

OBJETIVOS

Evaluar la capacidad diagnóstica de antígenos de *T. vivax* en un ensayo de ELISA Indirecto y determinar el porcentaje de positividad de muestras de bovinos en regiones con sospecha de Tripanosomiasis Bovina.

METODOLOGÍA

Clonado de proteínas de *T. vivax* seleccionadas como candidatos antigénicos.

El clonado estuvo a cargo del Dr. Diego Arias (IAL, CONICET, UNL) el cual se encargó de proporcionar dos proteínas obtenidas de forma recombinante (proteína A y proteína B) para su posterior evaluación mediante ELISA. Las proteínas se mencionan con nombres genéricos debido a que se encuentran bajo propiedad intelectual.

Evaluación de antígenos recombinantes de *T. vivax* a través de la determinación de IgG bovina.

Las proteínas recombinantes obtenidas (proteína A y proteína B) se evaluaron mediante ensayos de ELISA indirectos. Con el objetivo de optimizar un ELISA indirecto para la detección de IgG en bovinos, se sensibilizó una placa de ELISA teniendo en cuenta tres condiciones: 1) proteína A; 2) proteína B; 3) mezcla de proteínas (proteína A + proteína B). Como primera evaluación se analizaron 40 sueros positivos y 10 sueros negativos diagnosticados previamente mediante PCR. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno, diluciones de sueros y de anticuerpo conjugado para el análisis mediante ELISA.

Evaluación de la capacidad diagnóstica de los antígenos seleccionados.

Se evaluó la capacidad diagnóstica de los antígenos seleccionados. El panel de evaluación utilizado fue de 150 muestras de suero de bovinos infectados naturalmente con *T. vivax*, y 30 muestras de sueros negativos. El valor de corte (*cut off*) se calculó como el promedio de los valores de densidad óptica (DO) de los sueros de control negativo más 3 desviaciones estándar. Para equilibrar la heterogeneidad de la técnica ELISA, todos los valores de DO se normalizaron calculando el índice de densidad óptica del control negativo (IDON), definido como $IDON = DO \text{ muestra} / \text{corte}$. Así mismo, las áreas bajo las curvas ROC (AUC) se emplearon para analizar los resultados inter ensayos y elegir el mejor candidato para el diagnóstico. Una vez finalizada la etapa anterior, se seleccionaron los antígenos de *T. vivax* con la mayor capacidad de ser empleados en el diagnóstico de la TB.

Diagnóstico de Tripanosomiasis Bovina.

Con los resultados obtenidos, se llevó a cabo el diagnóstico de la TB mediante ELISA Indirecto en las condiciones óptimas seleccionadas anteriormente, utilizando 216 sueros provenientes de 10 establecimientos lecheros de las provincias de Santa Fe y Córdoba entre los años 2019 y 2021.

RESULTADOS

Evaluación de antígenos recombinantes de *T. vivax* a través de la determinación de IgG bovina.

En la *Figura 1* se observan los resultados obtenidos empleando las tres condiciones mencionadas anteriormente en la etapa de Sensibilización. 1) proteína A; 2) proteína B; 3) mezcla de proteínas (proteína A + proteína B). A partir de la mezcla de proteínas es posible identificar y discriminar correctamente entre muestras positivas y negativas a la infección por *T. vivax*, teniendo como referencia los resultados obtenidos mediante PCR.

Evaluación de la capacidad diagnóstica de los antígenos seleccionados.

Para evaluar la capacidad diagnóstica de los antígenos seleccionados, se analizaron los siguientes parámetros para cada caso: Sensibilidad (S), Especificidad (E) y Área bajo la curva (AUC).

Tabla 1. Evaluación de la capacidad diagnóstica de las proteínas

Prot.	Sensibilidad (S)	95%CI	Especificidad (E)	95%CI
A	77.48%	70.0-83.9	93.75%	79.2-99.2
B	42.71%	32.7-53.2	93.75%	79.2-99.2
A + B	92.05%	86.5-95.8	100%	89.1-100.0

Los resultados obtenidos para el ensayo de ELISA descrito anteriormente muestran que, utilizando la mezcla de proteínas (proteína A + proteína B) se obtuvo una S y E notablemente alta: 92.05% y 100% respectivamente, y un AUC de 0.9824 (Figura 2). Mientras que, utilizando la proteína A, se obtuvo una S y E del 77.48% y 93.75% respectivamente (Tabla 1), y un Área bajo la curva (AUC) de 0.9112 (Figura 3). Por otra parte, con la proteína B se obtuvieron valores de S y E de 42.71% y 93.75%, y un AUC de 0.7992 (Figura 4).

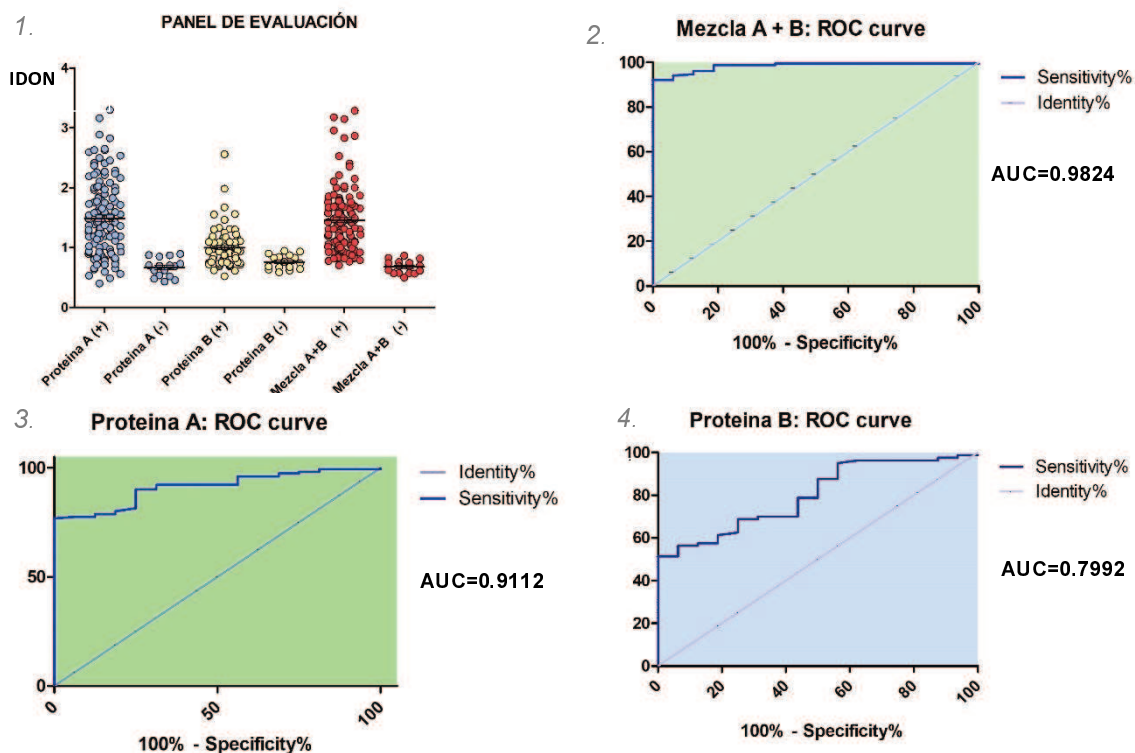


Figura 1. Panel de Evaluación de sueros positivos y negativos para cada condición;
 Figura 2. Curva ROC mezcla A+B; Figura 3. Curva ROC proteína A;
 Figura 4. Curva ROC proteína B.

Diagnóstico de la Tripanosomiasis Bovina

Se procedió a ampliar el panel de sueros para llevar a cabo el diagnóstico de la TB y evaluar la prevalencia de la enfermedad, empleando la mezcla de proteínas por su mayor capacidad diagnóstica.

En la Tabla 2 se indica la seroprevalencia de la enfermedad para cada establecimiento lechero evaluado. Además, se informa la prevalencia total, la cual alcanzó el 57,87%, lo que indica una amplia distribución del *Trypanosoma vivax* en establecimientos lecheros del centro de nuestro país.

Tabla 2. Análisis de prevalencia de la enfermedad para cada establecimiento lechero y prevalencia total.

Provincia	Establ. lechero	Muestras de suero	Muestras positivas	Seroprevalencia
Santa Fe	Col. Silva	20	16	80.00%
	Peirone	5	3	60.00%
	Est. Crucellas	44	28	61.63%
	Gandolfo	10	5	50.00%
	Lingua	21	12	57.41%
	Agropol	38	16	42.11%
	Soler	44	20	45.46%
	Serafin	10	8	80.00%
Córdoba	Boscarin	15	9	60.00%
	La paquita	9	8	88.89%
	TOTAL	216	125	57.87%

CONCLUSIONES

- ✓ En este trabajo desarrollamos un ensayo serológico con capacidad de diagnosticar bovinos infectados con *Trypanosoma vivax*, agente causal de la Tripanosomiasis bovina en nuestra región.
- ✓ Se determinó que la mezcla de las proteínas evaluadas en el ELISA indirecto presentó la mejor capacidad diagnóstica, con valores Sensibilidad y Especificidad notablemente altos.
- ✓ El análisis de infecciones con *T. vivax* en establecimientos lecheros de nuestra región, arrojó una prevalencia del 57,87%, indicando una elevada tasa porcentual de casos de TB en el centro de nuestro país.
- ✓ Finalmente, el ensayo desarrollado presenta un gran potencial para ser implementado en la industria veterinaria para el diagnóstico de rutina de la tripanosomiasis bovina y así lograr una rápida y correcta detección de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

- Abdala, A. A., Larriestra, A. J., & Signorini, M. (2020).** Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Revista Veterinaria*, 31(2), 115.
- Cortez AP, Ventura RM, Rodrigues AC, Batista JS, Paiva F, Añez N. (2006).** The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. *Parasitology*;133(02):159.
- García HA, Rodrigues AC, Rodrigues CM, Bengaly Z, Minervino AH, Riet-Correa F, et al. (2014)** Microsatellite analysis supports clonal propagation and reduced divergence of *Trypanosoma vivax* from asymptomatic to fatally infected livestock in South America compared to West Africa. *Parasit Vectors*;7:210.
- INTA. (2018).** Tripanosomiasis bovina en rodeos lecheros de Santa Fe. [Internet]. Disponible en: <https://inta.gob.ar/documentos/trypanosomiasis-bovina-en-rodeos-lecheros-de-santa-fe>.
- Jaimes-Dueñez J, Triana-Chávez O, Mejía-Jaramillo AM (2017).** Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis*; 8(2):290-9.
- Monzon, C.M; Mancebo, O.A; Giménez, J.N; Russo, A.M; (2013).** Evolución de la Tripanosomiasis bovina por *Trypanosoma vivax* en Formosa (Argentina). Años 2007 - 2012 y su potencial dispersión en el país.; *Sociedad Española de Parasitología; Revista Ibero Latinoamericana de Parasitología*; 72; 1;
- Osório A., Madrugá CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LRR, Costa SCG da. (2008).** *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 103(1):1-13.
- SENASA. (2017).** Casos de tripanosomiasis bovina en el departamento Castellanos, Santa Fe [Internet]. SENASA. 2017 [citado 31 de agosto de 2018]. Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/senasa-comunica/noticias/casos-de-tripanosomiasisbovina-en-el-departamento-castellanos-santa-fe>.