



---

---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Uso de un anticuerpo monoclonal en el  
diagnóstico de la Leptospirosis**

TESIS

Para obtener el título de:

Licenciada en bioquímica diagnóstica

Presenta

**Gabriela Marien De la Rosa Ríos**

Asesor externo

M. en C Yolanda Flores Medina

Co-asesor externo

Q.F.B. Olga Mata Ruíz

Co-asesor interno

M. en C. Paola Edith Briseño Lugo

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Uso de un anticuerpo monoclonal en el diagnóstico de la Leptospirosis.

Que presenta la pasante: **Gabriela Marien De la Rosa Ríos**  
Con número de cuenta: **310302427** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Paola Edith Briseño Lugo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Erik González Ballesteros	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Dra. María Lucero Paniagua García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

Agradezco en primera instancia a mi alma mater la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, gracias a los docentes que forman parte de ella y que me guiaron y apoyaron durante mi formación. Al instituto de diagnóstico y referencia epidemiológicos (InDRE) "Dr. Manuel Martínez Baéz", por permitirme dar el paso final en este proceso, dentro de el a mis asesoras de servicio social: Q. Yadhira Guerra y Q. Teresa Hernández, así como todas las personas del área de GECA, que me apoyaron y me dieron su cariño.

Al Laboratorio de Leptospirosis y Rickettsiosis (LERI), por el apoyo, la orientación y las muestras biológicas aportadas, con su participación fue posible el desarrollo de ese trabajo.

A mis tutoras: la Maestra Yolanda Medina y la Química Olga Mata, las cuales me compartieron de sus conocimientos y fueron una guía excepcional durante todo este trabajo, así como a Miguel, Yanina y Aurora. Al señor Mario (Q.E.P.D.) y a Lolita su cariño y apoyo diario durante esta fase me permitió llevarla a cabo de una forma muy amena y familiar.

Agradecimientos especiales al Dr. Horacio del Instituto de Nacional de Pediatría; y a la Dra. Bibiana Chávez y a la Dra. Verónica Hernández, del departamento de infectómica del CINVESTAV.

A mis compañeros, Rubén, Alfredo, Giovanni, Iván, Alejandra, Ulises y Alejandro que fueron las personas con las que compartí, risas, enojos y demás emociones, en ustedes encontré un gran cariño y amigos que sé que serán por siempre parte de mi vida. Aunque la distancia a veces nos separe, los buenos momentos se quedarán siempre en mi corazón.

Finalmente, gracias a M.I.B.B. Claudia Gómez, Dr. Ernesto Ramírez y Marcos Aparicio, a veces un pequeño empujón en esta vida es lo que se requiere para culminar proyectos y darle paso a los siguientes.

A mi madre Olivia, no hay palabras que describan todo el amor incondicional, gracias madre por enseñarme que lo más importante en esta vida es ser feliz, sin ti este gran paso no hubiera sido posible, te prometo siempre continuar hacia mi felicidad, eres la persona que siempre me ha apoyado, con tu cariño y amor, hasta el fin del mundo.

A mi padre Hector, gracias por hacerme una persona más sabia, por darme coraje, por hacerme una persona responsable y de carácter, y sobre todo por tu cariño incondicional.

A mi hermano Alberto por ser mi protector, mi confidente y por darme todo el cariño que es posible darle a un hermano.

Finalmente, a Dios agradezco porque con sus bendiciones y su infinito amor, pude terminar de subir este escalón en mi vida.

# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS	V
ABREVIATURAS	VIII
1. Resumen	1
2. Marco teórico	2
2.1. Leptospirosis	2
2.1.1. Generalidades	2
2.1.2. Características de <i>Leptospira</i> spp	2
2.1.3. Cuadro clínico y ciclo de vida de la Leptospirosis	4
2.1.4. Diagnóstico	6
2.1.5. Tratamiento	8
2.1.6. Epidemiología	8
2.2. Anticuerpos monoclonales	9
2.2.1. Generalidades	9
2.2.2. Antecedentes históricos	10
2.2.3. Producción de un anticuerpo monoclonales	10
2.3. Técnicas en el diagnóstico con anticuerpos monoclonales	11
2.3.1. ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)	11
2.3.2. Cromatografía de afinidad	13

2.3.3. Electroforesis	13
2.3.4. Inmunoelectrotransferencia	13
2.3.5. Epifluorescencia	14
3. Justificación	15
4. Hipótesis	15
5. Objetivos	15
5.1 General	15
5.2 Particulares	15
6. Metodología	16
6.1. Evaluar viabilidad celular y producción de anticuerpo monoclonal	17
6.1.1. Cultivo celular	17
6.1.2. Evaluación de la producción de anticuerpo monoclonal (LTGD7)	17
6.1.3. Determinar clase y subclase del AcMo (LTGD7)	18
6.2. Purificación y cuantificación del AcMo (LTGD7)	18
6.2.1. Purificación por cromatografía de afinidad.	18
6.2.2. Cuantificación del AcMo (LTGD7)	19
6.2.3. Evaluación de la calidad de la purificación del AcMo (LTGD7) por electroforesis e inmunoblot.	19
6.3. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a las serovariedades de <i>Leptospira</i> .	21

6.3.1. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) contra la vacuna LEPTOCAN por un ELISA indirecto.	21
6.3.2. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) ante las 27 serovariedades de <i>Leptospira</i> por medio de un ELISA indirecta.	22
6.3.3. Evaluación de la especificidad del reconocimiento del AcMo (LTGD7)	23
6.4. Selección de la técnica para la obtención del antígeno	23
6.4.1. Choque térmico	23
6.4.2. Sonicación	24
6.4.3. Tratamiento con formalina	25
6.4.4. Cuantificación de proteínas por método de Bradford	25
6.5. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)	25
6.5.1. Evaluación de un sistema de diagnóstico con un AcMo (LTGD7) por ELISA competitiva.	26
6.5.2. Evaluación de un sistema de diagnóstico con un AcMo (LTGD7) por ELISA de captura.	26
6.6. Epifluorescencia.	27
7. Resultados	28
7.1. Evaluación de la producción de un anticuerpo monoclonal (LTGD7).	28
7.1.1. Reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a serovariedades de <i>Leptospira</i> sp. Por ELISA indirecto.	28
7.1.2. Determinación de clase y subclase del AcMo (LTGD7).	28
7.2. Purificación cromatografía de afinidad y cuantificación del AcMo (LTGD7) contra <i>Leptospira spp.</i>	29
7.2.1. Evaluación del nivel de pureza del anticuerpo (LTGD7) por electroforesis SDS-PAGE e IET.	29
7.3. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a las serovariedades de <i>Leptospira spp.</i>	31

7.3.1. Reconocimiento de un AcMo (LTGD7) frente a la vacuna LEPTOCAN® por ELISA indirecto.	31
7.3.2. Evaluación del reconocimiento del anticuerpo purificado (LTGD7) contra las 27 serovariedades de <i>Leptospira spp.</i> , por ELISA indirecta	32
7.3.3. Evaluación de reacciones cruzadas del AcMo LTGD7 contra enterobacterias, por ELISA indirecta	35
7.4. Evaluación de un sistema de ELISA competitiva con el AcMo (LTGD7) para el diagnóstico de la Leptospirosis humana.	35
7.4.1. Evaluación de las posibles reacciones cruzadas entre los anti-anticuerpos conjugados de: humano, conejo, cerdo y ratón por ELISA indirecta	36
7.4.2. Evaluación de la respuesta de anticuerpos policlonales (AcPo) contra 27 serovariedades de <i>Leptospira spp.</i> , por ELISA indirecta	36
7.4.3. Evaluación de la competencia del anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra sueros de conejo y sueros de cerdo, ante una serovariedad de <i>Leptospira spp.</i> , por ELISA competitiva	38
7.4.4. Evaluación de la competencia del anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra sueros de humanos, ante las 27 serovariedades de <i>Leptospira spp.</i> , por ELISA competitiva.	40
7.5. Evaluación de un sistema de diagnóstico por ELISA de captura con un AcMo (LTGD7), con sueros humanos.	43
7.5.1. Evaluación de los antígenos obtenidos por diferentes tratamientos.	47
7.5.2. Comparación de los tratamientos de obtención del antígeno para el diagnóstico de ELISA de captura.	50
7.6. Evaluación microscópica del reconocimiento del anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra <i>Leptospira spp.</i> por epifluorescencia y microscopía electrónica.	51
7.6.1. Observación de <i>Leptospira spp</i> con el anticuerpo monoclonal (LTGD7) por epifluorescencia en un inmunoensayo en líquido.	51
7.6.2. Observación de <i>Leptospira spp</i> con el anticuerpo monoclonal (LTGD7) por microscopía electrónica.	52
8. Análisis de resultados y discusión	54
9. Conclusiones	56
10. Perspectivas	57
11. Bibliografía	58
12. Anexos	62

## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

- Figura 1. Microscopia de *Leptospira* sp.  
Figura 2. Pared celular de *Leptospira* spp.  
Figura 3. Ciclo de transmisión de *Leptospira* spp.  
Figura 4. Estadios de la Leptospirosis  
Figura 5. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT)  
Figura 6. Estructura general de los anticuerpos  
Figura 7. Tipos de Inmunoglobulinas  
Figura 8. Producción de un anticuerpo monoclonal  
Figura 9. Esquema general de ELISA indirecta  
Figura 10. Esquema de general ELISA sándwich  
Figura 11. Esquema de ELISA competitiva  
Figura 12. Esquema Inmunolectrotransferencia  
Figura 13. Diagrama de epifluorescencia  
Figura 14. Diagrama de flujo general de la metodología.  
Figura 15. Células en cultivo.  
Figura 16. Hibridomas en Botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> de poliestireno  
Figura 17. ELISA indirecto con sobrenadantes de cultivo celular.  
Figura 18. Columna de purificación  
Figura 19. Diálisis de anticuerpos  
Figura 20. Espectrofotómetro Epoch™ BioTek®.  
Figura 21. Montaje de sistema de electrotransferencia  
Figura 22. Inmunoblot con el AcMo (LTGD7).  
Figura 23. Diagrama de flujo de choque térmico.  
Figura 24. Diagrama de grupos de acuerdo a seroprevalencia de *Leptospira* spp en México.  
Figura 25. Sonificador Branson.  
Figura 26. Reacción de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa  
Figura 27. ELISA de competencia con sueros positivos.  
Figura 28. ELISA de captura con sueros positivos.  
Figura 29. Diagrama metodológico del montaje para epifluorescencia.  
Figura 30. Cuantificación de anticuerpos en Lector de microplacas Epoch BioTek®.  
Figura 31. Gel de Electroforesis SDS-PAGE al 12%.  
Figura 32. Evaluación de la pureza por IET.  
Figura 33. Diseño de ensayo de ELISA Indirecta.  
Figura 34. Diagrama de ensayo de ELISA indirecta.  
Figura 35. Esquema de ELISA indirecta para evaluar reacciones cruzadas.  
Figura 36. Esquema de ELISA indirecta para evaluar conjugados  
Figura 37. Diagrama de ensayo de ELISA competitiva.  
Figura 38. Diagrama de ensayo ELISA de captura.  
Figura 39. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12%. Tinción nitrato de plata.  
Figura 40. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 10%. Tinción con Coomassie coloidal.  
Figura 41. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 10%. Tinción nitrato de plata.  
Figura 42. Control blanco de *Leptospira* spp. 63x.  
Figura 43. Control positivo (AcPo) con *Leptospira* spp. 10x. TRITC.  
Figura 44. LTGD7 con *Leptospira* spp. 10x. FITC.  
Figura 45. Control positivo con *Leptospira* spp.  
Figura 46. LTGD7 con *Leptospira* spp.

Cuadro 1. Antibioticoterapia.

Cuadro 2. Inserto de la vacuna LEPTOCAN®.

### Cuadro 3. Tratamientos a alícuotas de la vacuna LEPTOCAN®.

- Gráfica 1. Frecuencia del aislamiento de *Leptospira* spp.
- Gráfica 2. Curva estándar de cuantificación de proteínas por método de Bradford
- Gráfica 3. ELISA indirecta de serovariedades a 10 µg/mL contra sobrenadante de cultivo (AcMo).
- Gráfica 4. ELISA indirecta con clases y subclases de IgG e IgM contra LTGD7 puro
- Gráfica 5. Perfil de purificación de LTGD7
- Gráfica 6. ELISA indirecta de fracciones de vacuna contra AcMo
- Gráfica 7.1 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con AcMo a 5 µg/µL
- Gráfica 7.2 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con LTGD7 a 2.5 µg/µL
- Gráfica 7.3 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con LTGD7 a 1.25 µg/µL
- Gráfica 7.4 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con LTGD7 a 0.65 µg/µL
- Gráfica 8. ELISA indirecta. AcMo Purificado [5 µg/mL] contra serovariedades de *Leptospira* spp. [10 µg/mL]
- Gráfica 9. ELISA indirecta. Reacciones cruzadas de enterobacterias [10 µg/mL] con AcMo.
- Gráfica 10. ELISA indirecta. Respuesta de los Anti-Ac-Conjugados IgG de conejo, porcino, ratón y humano contra muestras de cada especie.
- Gráfica 11.1 ELISA indirecta de sueros en diluciones [1:250-1:4000] contra el serovar correspondiente (1-10)
- Gráfica 11.2 ELISA indirecta de sueros en diluciones [1:250-1:4000] contra el serovar correspondiente (11-20)
- Gráfica 11.3 ELISA indirecta de sueros en diluciones [1:250-1:4000] contra el serovar correspondiente (20-27)
- Gráfica 12.1 ELISA competitiva e indirecta PORCINO Ag [0.625 µg/mL]
- Gráfica 12.2 ELISA competitiva e indirecta PORCINO Ag [0.312 µg/mL]
- Gráfica 13.1 ELISA competitiva e indirecta CONEJO Ag [0.625 µg/mL]
- Gráfica 13.2 ELISA competitiva e indirecta CONEJO Ag [0.312 µg/mL]
- Gráfica 14.1 ELISA competitiva Grupo A Ag [10 µg/mL] con 5 [µg/mL] AcMo
- Gráfica 14.2 ELISA competitiva Grupo B Ag [10 µg/mL] con 5 [µg/mL] AcMo
- Gráfica 14.3 ELISA competitiva Grupo C Ag [10 µg/mL] con 5 [µg/mL] AcMo
- Gráfica 15.1 ELISA competitiva con sueros humanos positivos
- Gráfica 15.2 ELISA competitiva con sueros negativos
- Gráfica 16.1 ELISA de captura Grupo A [10 µg/mL]
- Gráfica 16.2 ELISA de captura Grupo B [10 µg/mL]
- Gráfica 16.3 ELISA de captura Grupo C [10 µg/mL]
- Gráfica 16.4 ELISA de captura Vacuna [10 µg/mL]
- Gráfica 17.1 ELISA de captura e indirecto GRUPO A [10 µg/mL] con muestras negativas
- Gráfica 17.2 ELISA de captura e indirecto GRUPO B [10 µg/mL] con muestras negativas
- Gráfica 17.3 ELISA de captura e indirecto GRUPO C [10 µg/mL] con muestras negativas
- Gráfica 18. ELISA indirecta antígeno sonicado [10 µg/mL]
- Gráfica 19.1 ELISA de captura con antígeno con formalina (diluciones) y choque térmico. Con sueros humanos
- Gráfica 19.2 ELISA de captura con antígeno con formalina (diluciones) y choque térmico. Con sueros de conejo.
- Gráfica 20.1 ELISA indirecta Comparación de diferentes tratamientos del antígeno contra suero humano
- Gráfica 20.2 ELISA indirecta Comparación de diferentes tratamientos del antígeno contra el AcMo.

- Tabla 1. Características de la columna de sefarosa con proteína A.
- Tabla 2. Soluciones para la purificación.
- Tabla 3. Listado Taxonómico de las 27 serovariedades de *Leptospira* spp. en el InDRE.
- Tabla 4. Concentración de acuerdo a D.O. de las 8 serovariedades
- Tabla 5. Concentración de proteínas obtenidas por método de Bradford.
- Tabla 6. Resultados cuantificación de las 27 serovariedades.

## ABREVIATURAS

AcMo= Anticuerpo Monoclonal

AcPo= Anticuerpo Policlonal

Ag= Antígeno

ASB= Albúmina Sérica Bovina

BCIP=5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate

CDC= Centro de control y prevención de enfermedades (por sus siglas en inglés: Centers for Disease Control and Prevention)

CPK= Creatinfosfocinasa

D.O.= Densidad Óptica

DGE= Dirección General de Epidemiología

DMEM= Medio Eagle Modificado de Dulbecco (por sus siglas en inglés: Dulbecco's Modified Eagles Medium)

DMSO= Dimetilsulfóxido

ELISA= Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

FICT= Isocianato de Fluoresceína (por sus siglas en inglés: Fluorescein isothiocyanate)  
g= Gramos

HGPRT= Hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa

IET= Inmunolectrotransferencia

IgG= Inmunoglobulina tipo G

IgM= Inmunoglobulina tipo M

InDRE= Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos

IV= Intravenosa

kDa= Kilodalton

L.= Leptospira

LCR= Líquido cefalorraquídeo

Lig= Parecido a inmunoglobulina (por sus siglas en inglés: Like Inmunoglobulin)

Lip= Lipoproteína

M= Molar

MAT= Prueba de aglutinación microscópica (por sus siglas en inglés: Microscopic Agglutination Test)

mg= miligramo

mg= Miligramos

mL= Mililitro

mM= milimolar

nm= nanómetro

OMP= Proteínas de membrana externa (por sus siglas en inglés: Outer Membrane Protein)

OMS= Organización Mundial de la Salud

OPD= Diclorhidrato de O-fenilendiamina (por sus siglas en inglés: O-Phenylenediamine dihydrochloride)

PBS= Amortiguador de Fosfato Salino (por sus siglas en inglés: phosphate buffered saline)

PM= Peso Molecular

pNPP= fosfato de p-nitrofenilo (por sus siglas en inglés: p-nitrophenyl phosphate)

PVDF= POLIDIVILINO DE FLUORURO

rpm= revoluciones por minuto

SDS-PAGE= Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

SFB= Suero Fetal Bovino

SINAVE= Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

SSA= Secretaría de Salud

TRITC= Isocianato de Tetrametilrodamina (por sus siglas en inglés:  
Tetramethylrhodamine)

µg= microgramos

UI= Unidades Internacionales

## 1. Resumen

El uso de anticuerpos para la detección de enfermedades, ya sean producidas por agentes extraños o por causas propias, tiene muchas ventajas como la muy alta especificidad y una gran selectividad, que le confiere la reacción antígeno-anticuerpo. Estas características mejoran cuando el anticuerpo que se emplea en las técnicas es de tipo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales han representado un gran avance en la ciencia y tecnología y han dotado a las técnicas diagnósticas de una mayor versatilidad, mayor confiabilidad y mayor eficiencia. Una de las técnicas que se han modificado con la aparición de los anticuerpos monoclonales es la ya muy conocida y ampliamente utilizada, prueba de inmunoadsorción ligada a enzimas o ELISA (por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), que goza de amplia aceptación por su bajo costo, fácil procedimiento, económica producción y porque permite que se lleve a cabo el análisis de una gran cantidad de muestras de forma simultánea y a gran velocidad, acortando de forma sustancial los tiempos para generar un diagnóstico, sobre todo en el caso de agentes microbiológicos.

La leptospirosis es una enfermedad causada por bacterias tipo espiroqueta del género *Leptospira*, en la que el paciente desarrolla síntomas poco específicos, por lo que se trata de una infección subdiagnosticada y que a pesar de ser endémica de las zonas tropicales y de que se tiene reporte de aproximadamente 200 casos anuales en nuestro país (SINAVE/DGE/Salud, 2008-2018), el diagnóstico de esta enfermedad aún se realiza por la prueba de aglutinación microscópica o MAT (por sus siglas en inglés: Microscopic Agglutination Test), considerada como el estándar de oro. Se trata de una prueba serológica de referencia para la detección de anticuerpos aglutinantes contra antígenos vivos de *Leptospira spp*, con el fin de identificar la serovariedad causante de la infección y es leída mediante microscopía de campo oscuro por lo que es una prueba poco sensible, que requiere títulos de anticuerpos elevados para observar una reacción positiva adecuada así como personal capacitado y familiarizado con la visualización, alargando con ello el tiempo para lograr un diagnóstico certero.

El desarrollo de una prueba ELISA con anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de la leptospirosis representa entonces, una posibilidad real de obtener un diagnóstico específico, mucho más rápido y con mayor certeza para mejorar significativamente el tratamiento y pronóstico del paciente.

En el presente trabajo se propone un método de diagnóstico usando un anticuerpo monoclonal (AcMo), a través de un ELISA (de competencia y/o captura), en el cual se detectarán anticuerpos IgG que reconozcan serovariedades de *Leptospira* de importancia epidemiológica en México (InDRE). Se utilizó un anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra *Leptospira spp*; antígenos obtenidos por métodos diferentes (choque térmico, sonicación y tratado con formalina); y sueros de conejo, cerdo y humanos que fueran positivos a leptospirosis con la prueba MAT (prueba de oro). A pesar de que existió un nivel de reconocimiento alto del AcMo con las serovariedades probadas, no se logró establecer un sistema de diagnóstico con los sueros humanos y el anticuerpo monoclonal.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Leptospirosis

#### 2.1.1. Generalidades

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica de distribución mundial, causada por una bacteria del género *Leptospira*, la mayoría de los casos reportados se originan países con clima tropical y subtropical (Bourhy et al., 2013). Es considerada una enfermedad ocupacional dado que su transmisión está asociada con actividades en las que el hombre está en contacto con secreciones de animales infectados (Céspedes et al., 2009). Confluye con otras enfermedades como el dengue, a menudo subdiagnosticada por presentar un cuadro clínico inespecífico con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que oscilan desde una infección inaparente hasta una enfermedad que puede ser fulminante y mortal conocida como síndrome de Weil.

#### 2.1.2. Características de *Leptospira* spp

Esta bacteria fue aislada en 1915 por Inada e Ido en Japón quienes la identificaron en hígado de cobayos como el agente causal del síndrome de Weil (García et al., 2013).

La leptospirosis es producida por bacterias incluidas en el complejo patogénico denominado *Leptospira interrogans sensu lato*, taxonómicamente ubicado en el Phylum *Spirochaetes*, Clase *Spirochaetes*, Orden *Spirochaetales*, Familia *Leptospiiraceae* y Género *Leptospira*: constituido por dos especies: *Leptospira biflexa* no patógena, de vida libre, saprófita de ambientes húmedos y aguas superficiales; y *L. interrogans* a la que pertenecen las leptospiras patógenas causantes de la leptospirosis (Pérez et al., 2015). La unidad taxonómica en *Leptospira* es el serovar, ambos complejos (*L. interrogans* y *L. biflexa*) han sido dividido en numerosos serovares por la prueba de aglutinación cruzada CAAT (por sus siglas en inglés) (Céspedes et al., 2005). Adicionalmente, las especies se subdividen en más de doscientos serovares para *Leptospira interrogans* y más de sesenta serovares para *Leptospira biflexa*, según las proteínas que expresan como se observa en la figura 2 (Bharti et al., 2003). Sin embargo, existen especies que se consideran agentes causales de la leptospirosis entre estos destacan *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. santarosai*, *L. noguchii*, *L. weilii*, *L. kirschneri* y *L. alexanderi* (Cerqueira et al., 2009).

La *Leptospira* es de forma helicoidal, aerobio estricto, presenta en uno o ambos extremos una curvatura en forma de gancho, tiene una gran movilidad que le viene dada por un axostilo, el cual está formado por dos filamentos axiales insertados en un disco o protuberancia al final del cuerpo citoplasmático y cuyo extremo libre está unido a la región media de la bacteria estas características se observan con apoyo de microscopia de campo oscuro con técnicas de inmunodetección e impregnación argéntica como se observa en la figura 1 (García et al., 2013). Crecen entre 28-30°C en medios ricos en sales como el EMJH, Fletcher, Kortoff y Schuffner complementado con albúmina, en un pH de 7.2 a 7.4. Tiene un diámetro aproximado de ~0,25µm y una longitud variable entre 6-25µm y puede pasar por membranas de filtración de poro 0,22µm, esta característica hace que la *Leptospira* sea observable únicamente en un microscopio de campo oscuro o de contraste de fase, y además que no se puede colorear con anilinas (Céspedes et al., 2005).

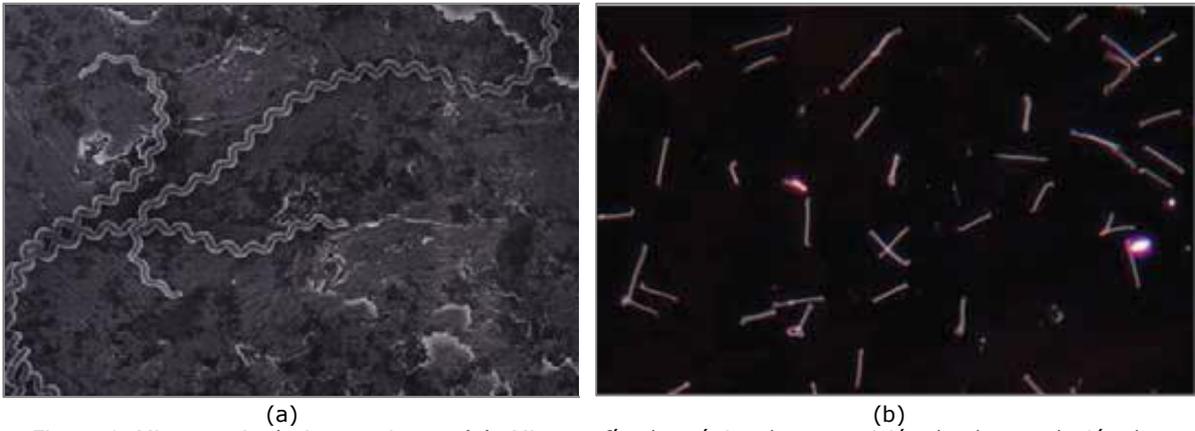


Figura 1. Microscopía de *Leptospira* sp. (a): Micrografía electrónica de transmisión de alta resolución de *Leptospira interrogans* serovar copenhageni (Ko et al, 2009). (b): Observación de *Leptospira* por microscopía de campo oscuro (García, et al, 2013).

Su motilidad característica se da gracias al axostilo que se encuentra anclado en la membrana citoplasmática, el cual le confiere un movimiento activo de rotación. Presenta una membrana rica en lípidos (20%), además presenta peptidoglicano (García et al., 2013). De acuerdo a la figura 2, hay diferentes componentes en la membrana sin embargo existen 3 tipos de proteínas en la membrana externa "OMP" (por sus siglas en inglés), que son de importancia debido al papel que juegan en la enfermedad: transmembranales, lipoproteínas y proteínas periféricas. Estas proteínas actúan como adhesinas, puntos de fijación de anticuerpos, porinas, receptores a proteínas y proteínas del complemento, además se cree que participan en la evasión de la respuesta inmunitaria (Baquero et al., 2010).

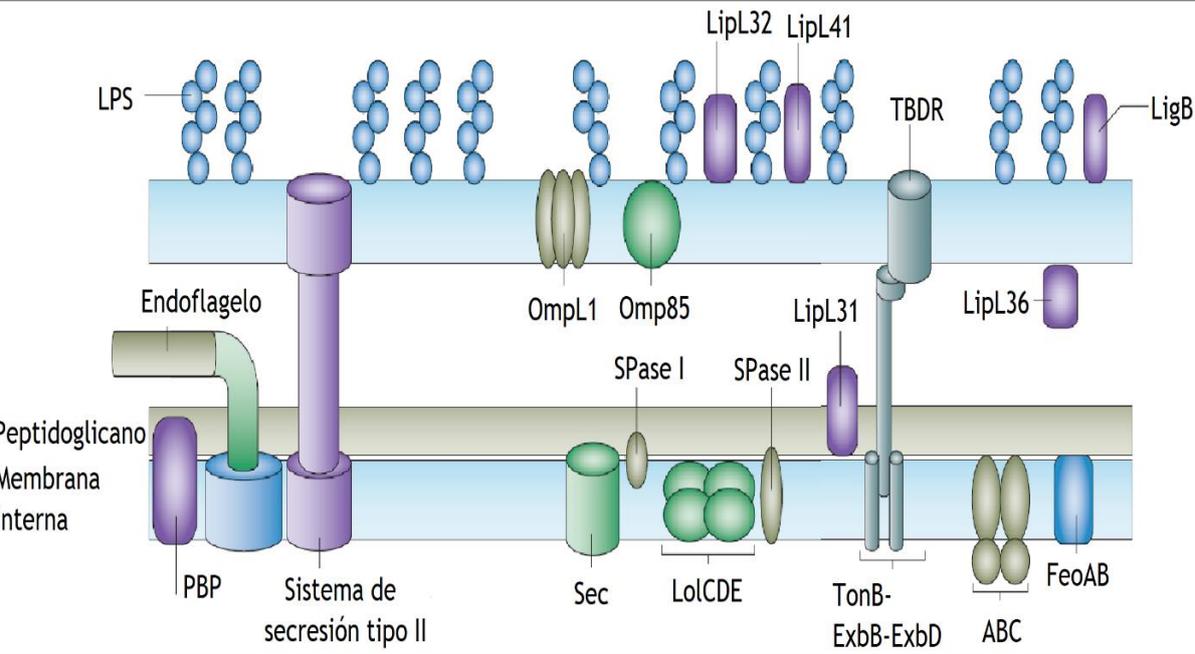


Figura 2. Pared celular de *Leptospira* spp. (Ko et al., 2009). Se observan componentes proteicos (Lip) anclados en la membrana externa los cuales le confieren variabilidad entre serovares.

La OMPL1 fue la primera proteína descrita en esta bacteria se compone de 320 aminoácidos, es una porina, se encuentra sólo en cepas patógenas, por lo cual es el antígeno de elección para el desarrollo de vacunas y métodos de diagnóstico (Ko et al., 2009).

La LipL32 tiene un peso de 26.7 kDa y una movilidad electroforética de 32 kDa (Haake et al., 2000). Se encuentra presente abundantemente en la superficie, siendo altamente inmunogénica e inmunodominante, sobre todo durante la respuesta humoral, permitiendo con ello una mayor sensibilidad y especificidad en fase aguda o convaleciente (Baquero et al., 2010). Se considera que promueve la hemólisis, investigaciones con IET (inmunolectrotransferencia) indican que los dominios C-terminal generan IgM en fase aguda y convaleciente. Al igual que OMPL1 está presente únicamente en especies patógenas con un alto grado de conservación (Baquero et al., 2010).

LipL36 es una lipoproteína de 36 kDa, se considera que su expresión es regulada de acuerdo con las condiciones ambientales, lo cual se puede relacionar con su gran capacidad adaptativa (Nally et al., 2001). Además, LipL36 está presente durante su crecimiento logarítmico en *Leptospira kirschneri*.

LipL41 es una lipoproteína de 41 kDa actúa sinérgicamente con OmpL1 y no de forma independiente, es inhibida por la globomicina, sin embargo, está presente tanto en leptospiras saprofitas como patógenas (Baquero et al., 2010).

LipL21 es una excelente opción para el desarrollo de vacunas debido a que permite insertarse en vectores de expresión eucarióticos, además de su localización en cepas patógenas (Baquero et al., 2010).

Esta espiroqueta posee otras proteínas leptospirales similares a las inmunoglobulinas "Lig" (por sus siglas en inglés), en estas tenemos a LigA (130 kDa), LigB, LigC de 12,13 y 14 dominios, son similares a las proteínas de adhesión, sus genes presentan un alto grado de conservación (70-99%). Son factores de virulencia en especies patógenas (Baquero et al., 2010). LigA puede actuar como molécula de adhesión y solo se expresa *in vivo*. El gen LigB se encuentra en todas las cepas patógenas mientras que LigA solo en *L. interrogans* y *L. kirschneri* (Cerqueira et al., 2009).

### 2.1.3. Cuadro clínico y ciclo de vida de la Leptospirosis

Las espiroquetas son excretadas a través de la orina de especies portadoras en donde pueden servir como reservorios para su transmisión. La leptospirosis en las poblaciones humanas se debe a su exposición continua en roedores, así como a las ocupaciones de riesgo de los humanos, o la transmisión dentro de los rebaños de animales. Figura 3 (Ko et al., 2009).

Las leptospiras penetran en los hospederos a través de abrasiones de la piel, mucosas, esófago o por los ojos, generando una infección sistémica (García et al., 2013). Esto se explica debido a un movimiento de tirabuzón, además de la producción de hialuronidasa permitiendo la penetración en estos sitios (Céspedes et al., 2005). En los seres humanos la infección ocurre en forma esporádica o en brotes epidemiológicos, causando cuadros asintomáticos hasta un síndrome febril agudo con manifestaciones clínicas variadas. (Agudelo et al., 2006)

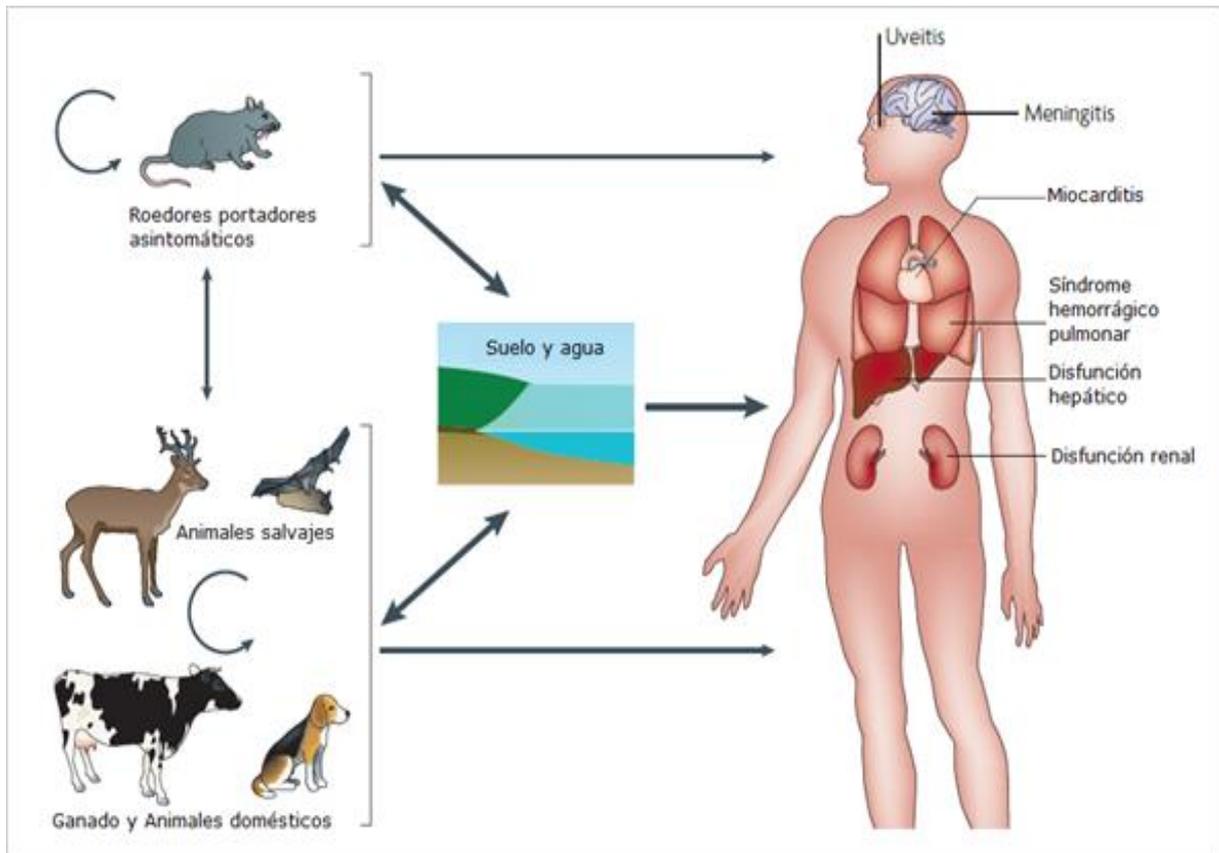


Figura 3. Ciclo de transmisión de *Leptospira* spp. (Ko et al., 2009).

El periodo de incubación es 7-26 días con un promedio de 12 días. Durante la primera semana de infección puede encontrarse en sangre y LCR (sin ocasionar daño neurológico) y en orina con una duración de 8-30 días (ver figura 3). Afecta principalmente hígado, riñón, cerebro y músculos. La insuficiencia renal aguda por necrosis tubular aguda es causada directamente por la leptospira. En músculos puede causar inclusiones vacuolares en las miofibrillas e infiltrado discreto de polimorfonucleares, junto con elevación de la creatinfosfocinasa (CPK). De las formas sintomáticas el 80-90% evoluciona a una forma anictérica benigna y el 10-20% como leptospirosis grave con insuficiencia renal e ictericia (Céspedes et al., 2005).

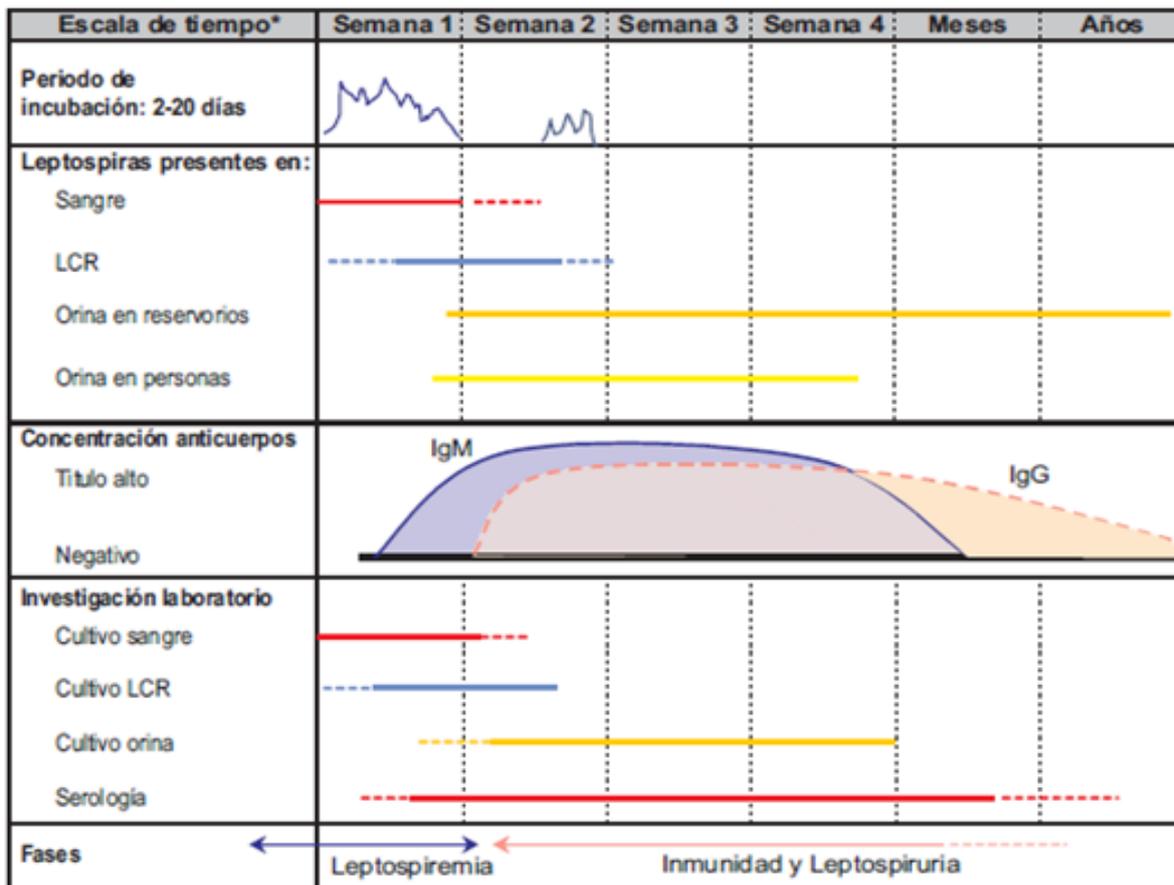


Figura 4. Estadios de la Leptospirosis (Céspedes et al.,2005).

La forma anictérica presenta cefalea intensa y persistente, mialgias, escalofríos, dolor abdominal y fiebre, puede confundirse con abdomen agudo quirúrgico, con cierta frecuencia se observa un exantema macular en el tronco, la evolución de estos casos es usualmente satisfactoria en un periodo de 4-10 días (Céspedes et al.,2005). La forma ictérica (Síndrome de Weil) es la forma más grave de la enfermedad presenta alteraciones de la función hepática y renal, desarrollo de hemorragias, colapso vascular y una mortalidad de 5-40%. Una vez que se ha manifestado el síndrome de insuficiencia renal puede desarrollarse delirio y convulsiones, junto con manifestaciones hemorrágicas y aumento de la ictericia, además de esplenomegalia, hepatomegalia y en casos graves insuficiencia cardíaca y shock cardiogénico (Céspedes et al.,2005).

La forma crónica está asociada con la persistencia de las espiroquetas en los ojos dónde están protegidas de la respuesta inmunitaria del hospedero, manifestando fatiga crónica, cefalea, paresis, síndrome obsesivo-compulsivo, depresión, encefalitis para infecciosas, afecciones hepatobiliares, así como uveítis e iridociclitis, esta etapa se define como un síndrome multiorgánico y polimórfico (García et al., 2013).

#### 2.1.4. Diagnóstico

Presenta un cuadro clínico inespecífico ya que puede confundirse con dengue, fiebre amarilla, hepatitis, etc., incluso ébola, por lo que resulta complicado elaborar un diagnóstico rápido. Durante la fase aguda se pueden aislar a las leptospiras en medios de cultivo, directamente de la sangre u orina e incluso visualizarse en microscopia de campo oscuro e inmunofluorescencia directa, pero debido a la baja sensibilidad sólo puede detectarse cuando estas se encuentran en una concentración entre 100-200 bacterias/mL (Céspedes et al.,2005).

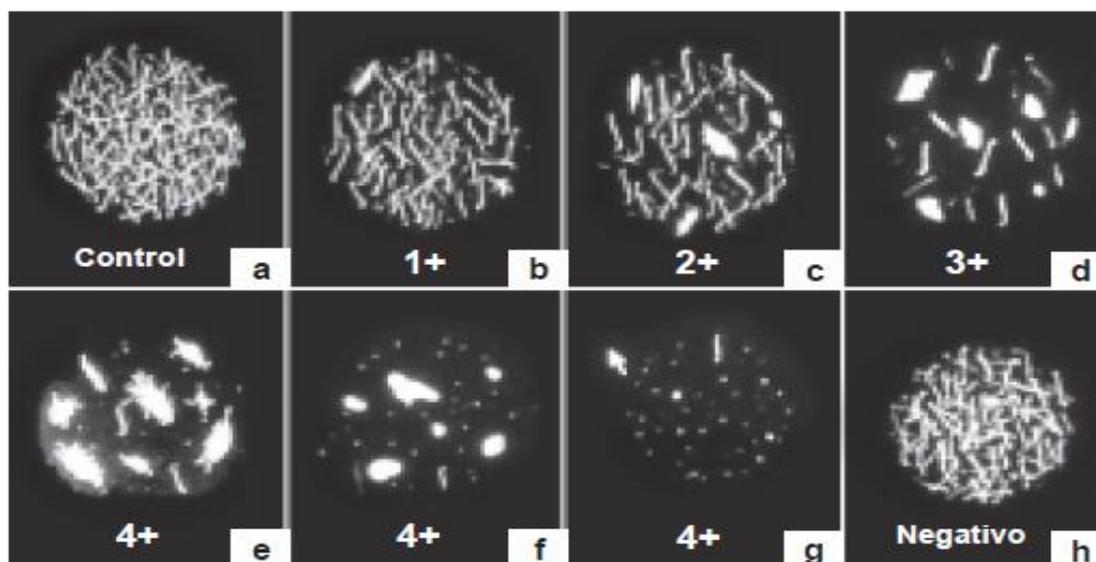


Figura 5. Reacciones de la prueba de aglutinación microscópica (MAT) a: Control, b: 25% aglutinación (copos de algodón), c: 50% de aglutinación, d: 75% de aglutinación, e: 100% de aglutinación, f: 100% aglutinación y lisis, g: 100% de lisis, h: negativo (Céspedes et al.,2005).

La prueba de oro utilizada para el diagnóstico de la leptospirosis es la prueba de microaglutinación "MAT" (por sus siglas en inglés), es la prueba referencia de la OMS y la CDC, sin embargo, presenta una baja sensibilidad porque requiere títulos altos de anticuerpos, además de que no existe un valor de corte específico para determinar si una muestra es positiva o negativa (ver figura 5). La MAT consiste en la detección de niveles de anticuerpos anti-leptospira contra una serovariedad aglutinando solo contra la serovariedad antigénicamente relacionada. Aún no existe un título específico para considerar una muestra como positiva o negativa, adicionalmente de que se ha demostrado en muestras con pocos días un resultado negativo (Cumberland et al., 1999). En muchas de las regiones el problema es que se cuenta con una sola muestra, entonces la determinación de la infección aguda es a veces sugerida por un solo título elevado, pero la magnitud de tal título es dependiente de la exposición de la población y la prevalencia de la enfermedad (Céspedes et al.,2005). Por lo cual presenta una sensibilidad baja, requiere sueros pareados para la detección de la seroconversión, muestra reacciones cruzadas entre serogrupos y consume mucho reactivo, ya que es necesario mantener cultivos en replique constante y probar la mayor cantidad de serovariedades posibles, sin olvidar, además, que la utilización de leptospiras vivas presenta riesgo ocupacional de infección para el personal de laboratorio (Agudelo et al., 2006).

Sin embargo, debido a las manifestaciones clínicas, existen pruebas que sin ser específicas pueden orientar hacia el diagnóstico clínico de la enfermedad, como una velocidad de sedimentación globular elevada, leucocitosis (a diferencia del dengue que tienden a presentar leucopenia), elevación de transaminasas, fosfatasas y bilirubina en ausencia de ictericia (fase anictérica) (Céspedes et al.,2005).

Actualmente se han desarrollado pruebas de PCR basados en el gen *rrs* género-específico o PCR que detectan leptospiras patógenas, y amplifican el gen *secY* y *flaB*, el gen *lipL32* o *gyrB*, la utilidad de esta prueba es que permite una detección temprana, y si se trata de una PCR en tiempo real aumenta la sensibilidad, detectando leptospiras en sangre y orina, sin embargo, es la más costosa, debido a requerir equipo especializado (Romero et al., 2016).

### 2.1.5. Tratamiento

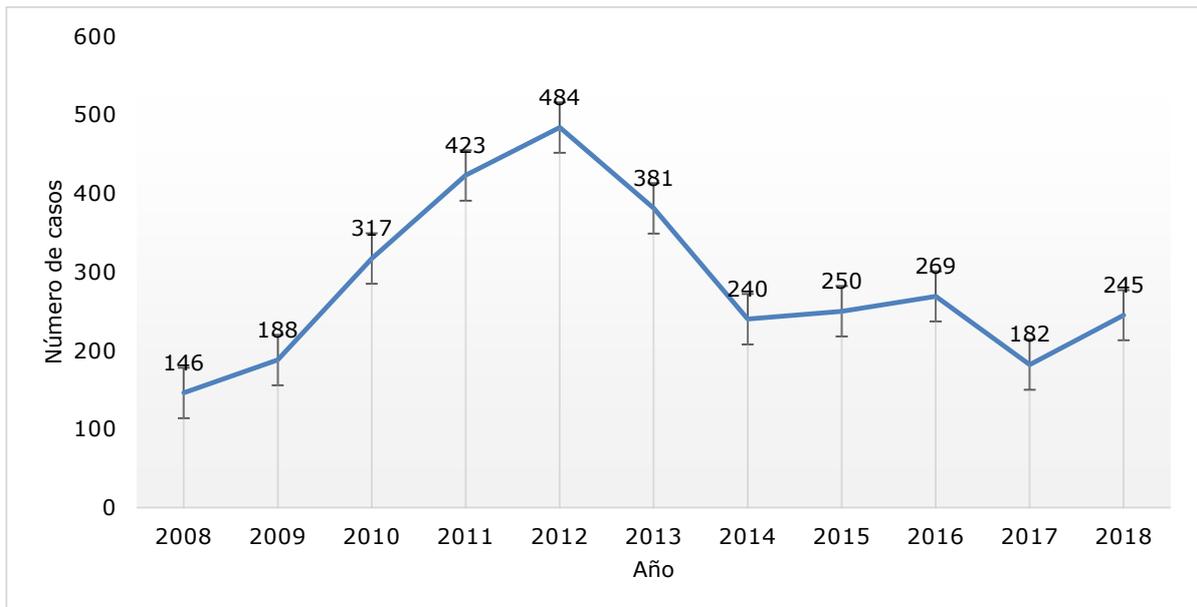
Es necesario restablecer el desequilibrio electrolítico ácido-base, además de una terapia con antibióticos de acuerdo al estado del paciente (ver cuadro 1). En las formas graves de la enfermedad la hidratación endovenosa es de suma importancia debido a los cuadros severos de diarrea, fiebre y vómitos, así como anorexia y lesiones vasculares.

Cuadro 1. Antibioticoterapia.

Grado de enfermedad	Tratamiento	Alternativamente
Leptospirosis aguda	Penicilina G 1.5x10 <sup>6</sup> UI cada 6 horas Durante 5-7 días	Ampicilina 1g cada 6 horas IV Durante 5-7 días
Casos leves con tolerancia oral	Doxiciclina 100mg cada 12 horas Durante 5-7 días	Ampicilina 500mg cada 6 horas Amoxicilina 500mg cada 6 horas Durante 5-7 días

### 2.1.6. Epidemiología

Anualmente se reportan más de 500 000 casos severos con una mortalidad superior al 10%. La OMS la clasifica como enfermedad desatendida, estimando una incidencia de 5.1 casos/100 000 personas en áreas endémicas. El primer reporte en México fue en el año 1920 sin embargo, uno de los primeros estudios que evidenció la seroprevalencia en México fue el realizado por Varela y Zavala en 1961, que mostró un porcentaje de 18% en 10,362 sueros estudiados procedentes de 21 estados de la República Mexicana. De acuerdo a la gráfica 1 en el 2012, la Secretaria de Salud (SSA) por medio de la Dirección General de Epidemiología (DGE), confirmó 484 casos positivos de leptospirosis humana, siendo Tabasco el Estado más afectado con 256 pacientes.



Gráfica 1. Frecuencia del aislamiento de *Leptospira* spp. 2008-2018 Boletín epidemiológico. FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2008-2018

## 2.2. Anticuerpos monoclonales

### 2.2.1. Generalidades

Los anticuerpos, también denominados inmunoglobulinas (Ig) (Figura 6), son glucoproteínas especializadas que forman parte de la inmunidad humoral; son producidas por las células del sistema inmunitario llamadas linfocitos B, que tienen la capacidad de reconocer otras moléculas específicas llamadas antígenos (Manchado et al., 2006). Un antígeno corresponde químicamente a una proteína, glúcido o glucoproteína, dentro de esta estructura las partes que son reconocidas de forma específica se denominan epítomos o determinantes antigénicos (Gamundi et al., 2002).

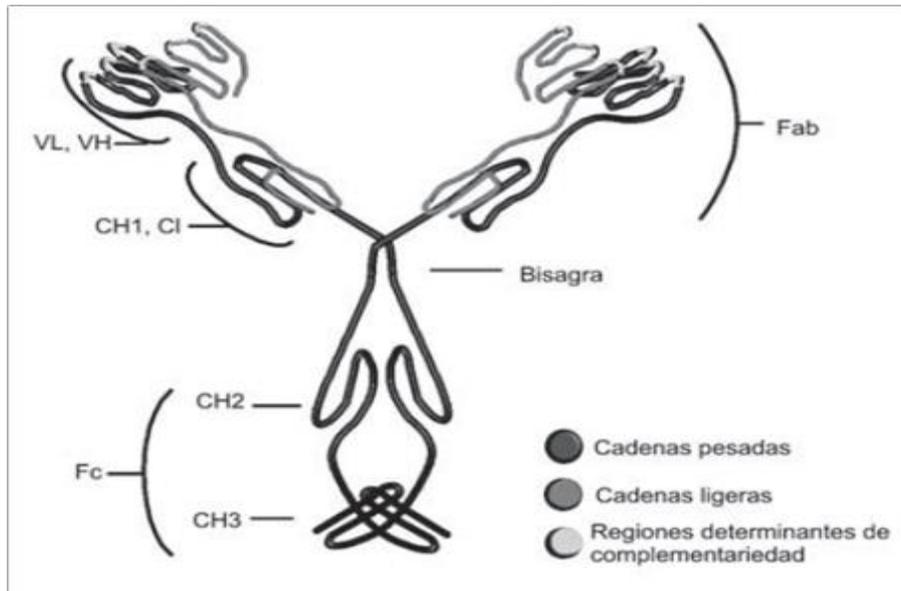


Figura 6. Estructura general de los anticuerpos (Manchado et al., 2006). Su estructura se compone de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Presenta una región variable (Fab) en uno de sus extremos, la cual le confiere la especificidad de reconocimiento al antígeno, así como una región constante en el otro extremo.

Los anticuerpos están formados por cuatro cadenas de aminoácidos, dos cadenas pesadas H (del inglés heavy) y dos ligeras L (del inglés light), que se unen por puentes de disulfuro entre sí. Hay dos tipos de cadenas L denominadas: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ) y 5 clases o isotipos de cadena H: gamma ( $\gamma$ ) IgG, mu ( $\mu$ ) IgM, alfa ( $\alpha$ ) IgA, epsilon ( $\epsilon$ ) IgE y delta ( $\delta$ ) IgD (Gamundi et al., 2002).

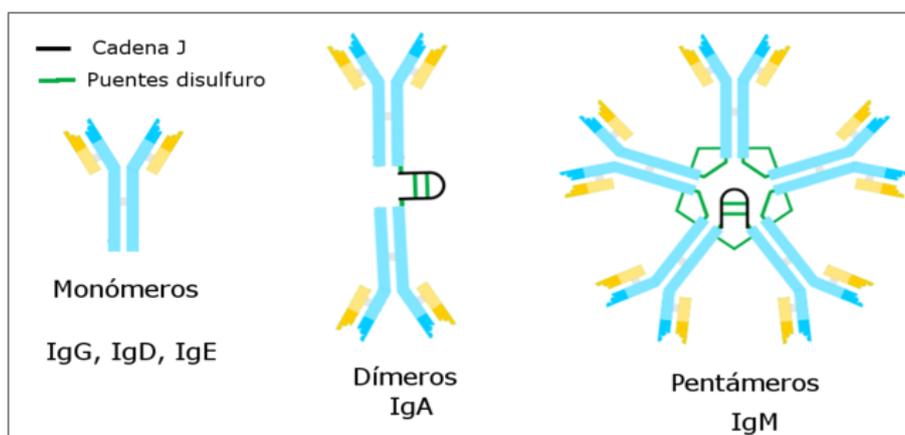


Figura 7. Tipos de Inmunoglobulinas (lifeder, 2019).

-IgG: son las más abundantes, existen 4 subclases. Activan el sistema de complemento facilitando así la fagocitosis, atraviesan la placenta, por lo cual le confieren inmunidad al neonato.

-IgM: se producen en la respuesta inmunitaria primaria. Activan fácilmente el sistema del complemento y actúan como opsoninas (recubren al antígeno y facilitan la fagocitosis).

-IgA: Predomina en secreciones seromucosas y constituye la defensa ante las infecciones bacterianas. No atraviesa placenta, pero si se encuentra en el calostro.

-IgD: Minoritaria en el plasma, se encuentran en mucosas y en las membranas de los linfocitos B. Su función no es clara y representa el 0.2% de las inmunoglobulinas.

-IgE: Aparece en membrana de basófilos y mastocitos, está asociado a las reacciones de hipersensibilidad inmediata, anafilaxia y reacciones parasitarias (Gamundi et al., 2002).

Los hibridomas son híbridos de células somáticas, obtenidos de la fusión de linfocitos B (células productoras de anticuerpos) con células de mieloma (célula plasmática cancerosa). Estos hibridomas adquieren de los linfocitos la habilidad de producir anticuerpos específicos y de las células de mieloma la habilidad de ser cultivados indefinidamente *in vitro*. Los anticuerpos producidos por un clon (un hibridoma y su descendencia) son idénticos y específicos contra un solo determinante antígeno y epítipo (IICA, 2017).

### 2.2.2. Antecedentes históricos

César Milstein y George Köhler (Cambridge Inglaterra, 1975) desarrollaron una técnica para fusionar células de mieloma de ratón con linfocitos B activados de ratones previamente inmunizados con antígenos específicos (Curtis, 2006).

La técnica de la producción de anticuerpos monoclonales constituye uno de los avances más significativos de la historia de la inmunología. Por su hallazgo Milstein y Köhler recibieron el premio Nobel en 1984 (Curtis, 2006).

### 2.2.3. Producción de un anticuerpo monoclonal

Como se observa en la figura 8 de forma tradicional para generar el anticuerpo se inmuniza con un antígeno un animal y se espera que sus linfocitos B produzcan anticuerpos que reconozcan diferentes epítopos de un mismo antígeno, es decir que sean de tipo policlonal. Sin embargo, para obtener un anticuerpo monoclonal, se pone en contacto a los linfocitos B con células de mieloma (que no secreten anticuerpos) deficientes de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil transferasa (HGPRT), obteniendo así una mezcla de células híbridas para separarse posteriormente en diferentes clonas de células plasmáticas y con lo cual son parcialmente purificados (Manchado et al., 2006). Se opta por utilizar células de mieloma ya que sobreviven de manera indefinida en cultivo y producen grandes cantidades de anticuerpos específicos, además del uso de técnicas de fusión química por medio del polietilenglicol (PEG) el cual es un desestabilizante de membranas. Para asegurar su especificidad se mantienen en medio selectivo con Hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) permitiendo la supervivencia de híbridos que contengan la enzima HGPRT, mientras que los linfocitos B no fusionados mueren (Goding, 1987). La especificidad se analiza en los sobrenadantes en placas de cultivo, seleccionando solo los deseados y clonándose por dilución límite. Pueden conservarse indefinidamente en dimetil sulfóxido y purificarse a partir de los sobrenadantes (García, 2010).

La primera célula involucrada es un linfocito B de un animal previamente inmunizado con el antígeno de interés, que aporta la memoria inmunitaria y la capacidad de producir anticuerpos contra el antígeno específico. La segunda es una célula tumoral de mieloma no secretora de anticuerpos, útil en el proceso de selección posterior de los hibridomas,

que aporta su capacidad de división ilimitada (inmortalidad). De esta unión surge un tipo de célula inmortal con la capacidad virtualmente ilimitada de producción de anticuerpos monoclonales, llamada hibridoma (Manchado et al., 2006).

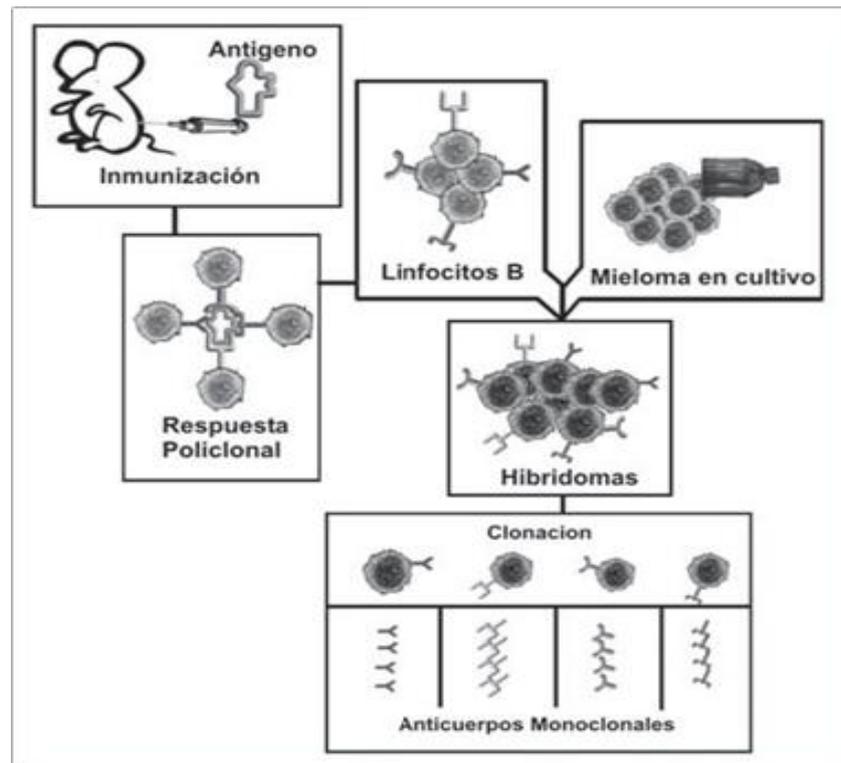


Figura 8. Producción de un anticuerpo monoclonal (Manchado et al., 2006).

Estos hibridomas o clonas para su producción, se conservan en botellas de cultivo (poliestireno), en presencia artificial de CO<sub>2</sub> lo cual permite mantener un pH idóneo y a una temperatura de 37°C. Contiene un sistema de tamponado de carbonatos disminuyendo el rango de 7.2-7.4 de pH gracias a la presencia de HEPES, además de la presencia de rojo de fenol como indicador lo que permite monitorear la actividad celular. Los aminoácidos permiten la proliferación celular, siendo fuente de energía para el metabolismo. Finalmente se requiere antibióticos para controlar y evitar el crecimiento de bacterias y/o hongos contaminantes (Goding, 1987).

### 2.3. Técnicas en el diagnóstico con anticuerpos monoclonales

#### 2.3.1. ELISA (Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas)

Los ensayos de ELISA se basan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, en donde generalmente el anticuerpo está acoplado a una enzima (peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina o D-galactosidasa) para permitir la visualización, por medio de la unión de un cromógeno (OPD, BCIP o pNPP), de una respuesta colorimétrica. Esta respuesta colorimétrica se lee con un espectrofotómetro, lo que permite medir la absorbancia, montando el ensayo en una superficie sólida (placas de 96 pozos de poliestireno).

Existen diferentes tipos de ELISA algunos de ellos son: indirecta, competitiva y sándwich.

##### a) ELISA indirecta

En este tipo de ensayo se fija o tamiza al antígeno a una superficie sólida a la cual se unirá el anticuerpo de interés (anticuerpo primario), posterior a ello se une un anticuerpo

secundario el cual está previamente marcado con una enzima lo cual va a permitir la detección de la señal, al proporcionar un cromógeno que generará una reacción enzimática colorimétrica. La reacción enzimática es detectable a cierta longitud de onda (450-495 nm) por medio de un espectrofotómetro.

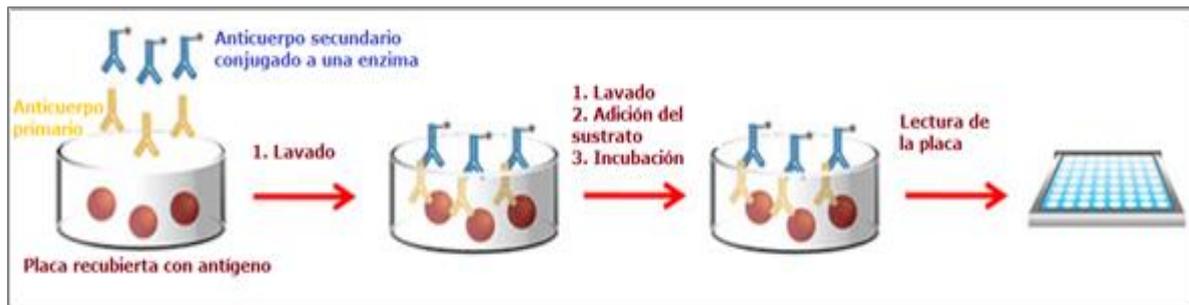


Figura 9. Esquema general de ELISA indirecta (www.e-allscience.com, 2019).

### b) ELISA en sándwich (de captura)

En esta variante se fija a una superficie un anticuerpo que reconozca el antígeno de interés, para poder ser capturado, posterior a ello se añade un segundo anticuerpo previamente marcado (en caso de que no se añade un anticuerpo secundario conjugado a una enzima) también asociado al antígeno (pero a un epítipo diferente) para que, al unirse al antígeno, sea visible la reacción de color.

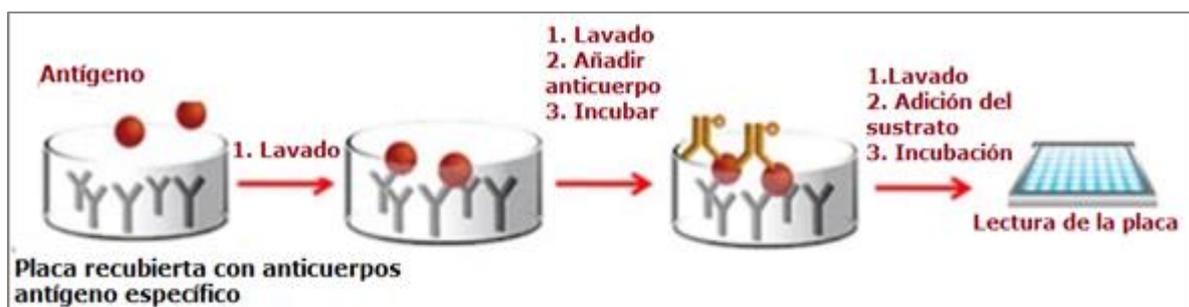


Figura 10. Esquema de general ELISA sándwich (www.e-allscience.com, 2019).

### c) ELISA competitiva

Es una técnica que se adaptan para detectar anticuerpos o antígenos. Para cuantificar anticuerpos se añade incuban el antígeno con el suero problema (con anticuerpos), posterior se añade la mezcla en una placa para ELISA tapizada con anticuerpos, si había anticuerpos en la muestra, habrá pocos sitios antigénicos libres para unirse a los anticuerpos de la placa, el último paso consiste en añadir un conjugado anti-antígeno específico y el sustrato de la enzima. En el caso de una muestra positiva con un alto título, habrá poca señal. Para detectar anticuerpos, se tamiza con antígeno, posteriormente se añade la muestra donde se tienen a los anticuerpo y anticuerpos anti-antígeno específicos marcados con una enzima, ambos tipos de anticuerpos compiten por unirse al antígeno, por lo que, si el título del suero problema es alto, no hay espacio para el conjugado y no se desarrollará color, o esté será muy tenue.

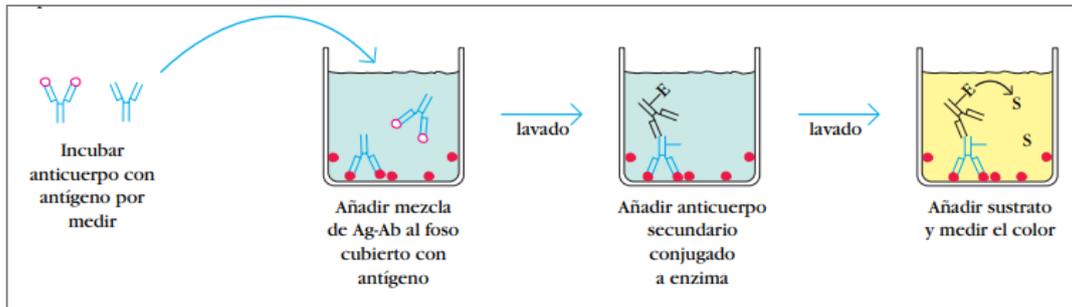


Figura 11. Esquema de ELISA competitiva (Kindt, 2007).

### 2.3.2. Cromatografía de afinidad

Los anticuerpos para su purificación requieren de algunos pasos básicos previos, uno de ellos es una preparación, la cual se realizará a través de ultrafiltración y/o diálisis que tienen como objetivo separar a los AcMo de sus componentes mayoritarios, posteriormente se realizará la purificación a través de métodos cromatográficos (Escobar, 2019). La purificación por afinidad se realiza con proteína A, la cual se unen selectivamente a las inmunoglobulinas de clase G (IgG), la proteína A se inmoviliza de forma covalente sobre las resinas porosas a través de donde se hará pasar la muestra, posteriormente se eluye la fracción que contendrá las inmunoglobulinas de interés.

### 2.3.3. Electroforesis

Esta técnica permite separa moléculas cargadas al someterse a la acción de un campo eléctrico. Para poder evaluar la pureza del anticuerpo después de su purificación, además de un ELISA para evaluar el reconocimiento de un anticuerpo, se utiliza un gel poliacrilamida mediante una electroforesis permitiendo observar e identificar el tipo de inmunoglobulina de acuerdo sus pesos moleculares. Se utilizan agentes desnaturizantes de proteínas (detergentes y agentes reductores) y diferentes métodos de tinción para su visualización.

### 2.3.4. Inmunoelectrotransferencia

La inmunoelectrotransferencia (IET), también llamada Western-Blot o inmunoblot es un proceso que nos permite identificar una proteína determinada (en este caso antígeno), al separarla de una mezcla de proteínas por medios electroforéticos en un gel SDS-PAGE (duodecil sulfato- poliacrilamida), las bandas de proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis, y al ser expuesta al anticuerpo policlonal o monoclonal, los complejos antígeno-anticuerpo pueden visualizarse de diversos modos. El método más utilizado es adicionar anticuerpos conjugados a una enzima, la cual producirá un color al estar en presencia de una enzima (Kindt, 2007).

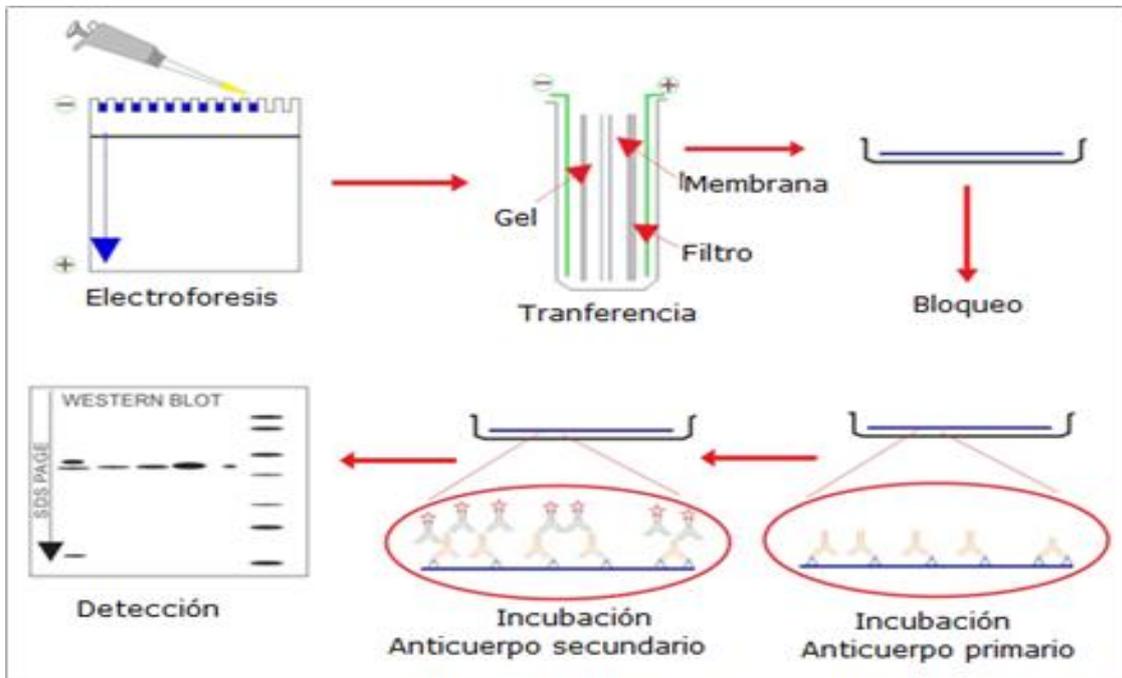


Figura 12. Esquema Inmunoelectrotransferencia (www.cusabio.com, 2019).

### 2.3.5. Epifluorescencia

La fluorescencia acoplada a un microscopio óptico se denomina epifluorescencia, el regulador de fluorescencia admite tres bloques de filtros: un filtro de excitación, un espejo dicroico y un filtro de emisión. Su funcionamiento se basa en la propiedad de fluorescencia que tienen ciertas moléculas denominadas fluorocromos.

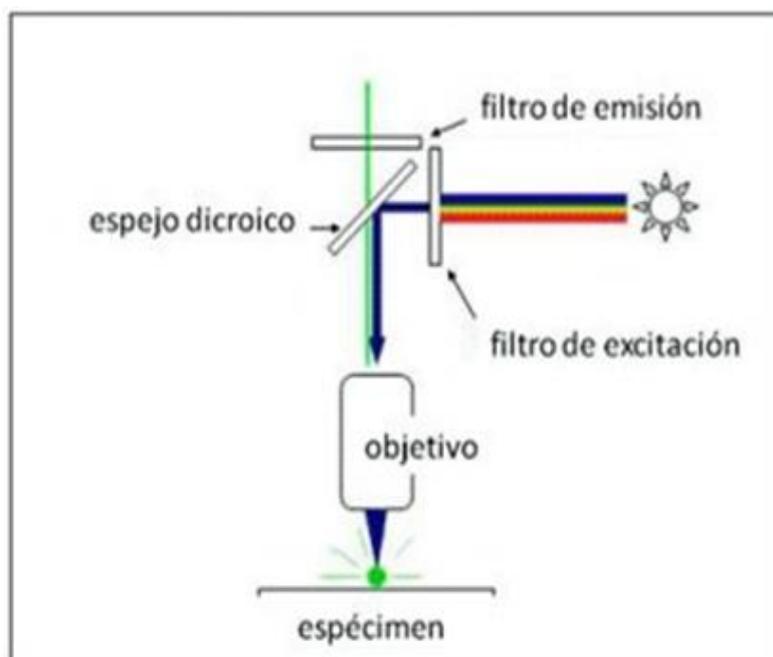


Figura 13. Diagrama de epifluorescencia (www.bioindicacion.com, 2019).

Allgunos fluorocromos como el Isocianato de fluoresceína (FICT) es excitada por una luz a una longitud de onda de 490-495 nm emitiendo una luz verde visible cuya longitud de onda es de alrededor de 517 nm; y el Isocianato de tetrametilrodamina (TRITC) que emite una luz roja con una absorción de 550 nm y una emisión máxima de 580 nm (Del Brio, 1995).

### 3. Justificación

Los anticuerpos continúan siendo el reactivo más crítico y decisivo en los inmunoensayos destinados a detectar agentes infecciosos y, por tanto, a complementar el diagnóstico de diversas enfermedades. La capacidad analítica de los anticuerpos, además de la inherente especificidad y robustez de la prueba en que se utilicen, depende de dos factores principales: la afinidad si se trata de un AcMo o la avidéz en caso de una preparación policlonal (Otero et al., 2010).

La leptospirosis es un problema de salud pública a nivel mundial, en particular en áreas tropicales y subtropicales y en países en vías de desarrollo. Al ser frecuente en zonas tropicales donde confluyen otras infecciones como el dengue, tienden a confundirse sus cuadros clínicos, siendo generalmente subdiagnosticada (Céspedes et al., 2005).

El diagnóstico actual se realiza por la técnica de MAT (por sus siglas en inglés), lo cual dificulta la estandarización debido a que se requiere de una capacitación y experiencia por medio del analista, lo cual provocar un diagnóstico más tardado y difícil de hacer por lo que sería importantes contar con un método de apoyo para determinar los casos de leptospirosis.

Un ELISA es simple, sencillo, seguro, fácil de automatizar y, por lo tanto, el más adecuado para poder evaluar un gran número de muestras (Champagne et al., 1991). El uso de un anticuerpo monoclonal en este tipo de ensayos permite aumentar la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, con el siguiente trabajo se pretende realizar un ELISA que funcione como una primera prueba para el diagnóstico en la leptospirosis humana, con lo cual se espera evitar las variaciones que se presentan con la MAT, así como disminuir los costos en los reactivos y equipos.

### 4. Hipótesis

Si el anticuerpo monoclonal (LTGD7) detecta las serovariedades de *Leptospira spp.*, permitirá establecer un sistema de detección de anticuerpos específicos en muestras clínicas humanas de pacientes con leptospirosis y podrá ser aplicado en ensayos tipo ELISA para facilitar el diagnóstico

### 5. Objetivos

#### 5.1. General

Utilizar un anticuerpo monoclonal en el diagnóstico de Leptospirosis humana, basado en el reconocimiento de anticuerpos contra antígenos de *Leptospira spp.* por un método de ELISA competitiva o de captura.

#### 5.2. Particulares

- Mantener en cultivo celular una línea celular (hibridomas) productora de anticuerpos monoclonales anti-*Leptospira*.
- Purificar anticuerpos monoclonales anti-*Leptospira* obtenidos de los sobrenadantes de un cultivo celular por cromatografía de afinidad.
- Evaluar la estandarización de un método de diagnóstico por ELISA competitiva o de captura con un AcMo (LTGD7) con sueros de humanos.

## 6. Metodología

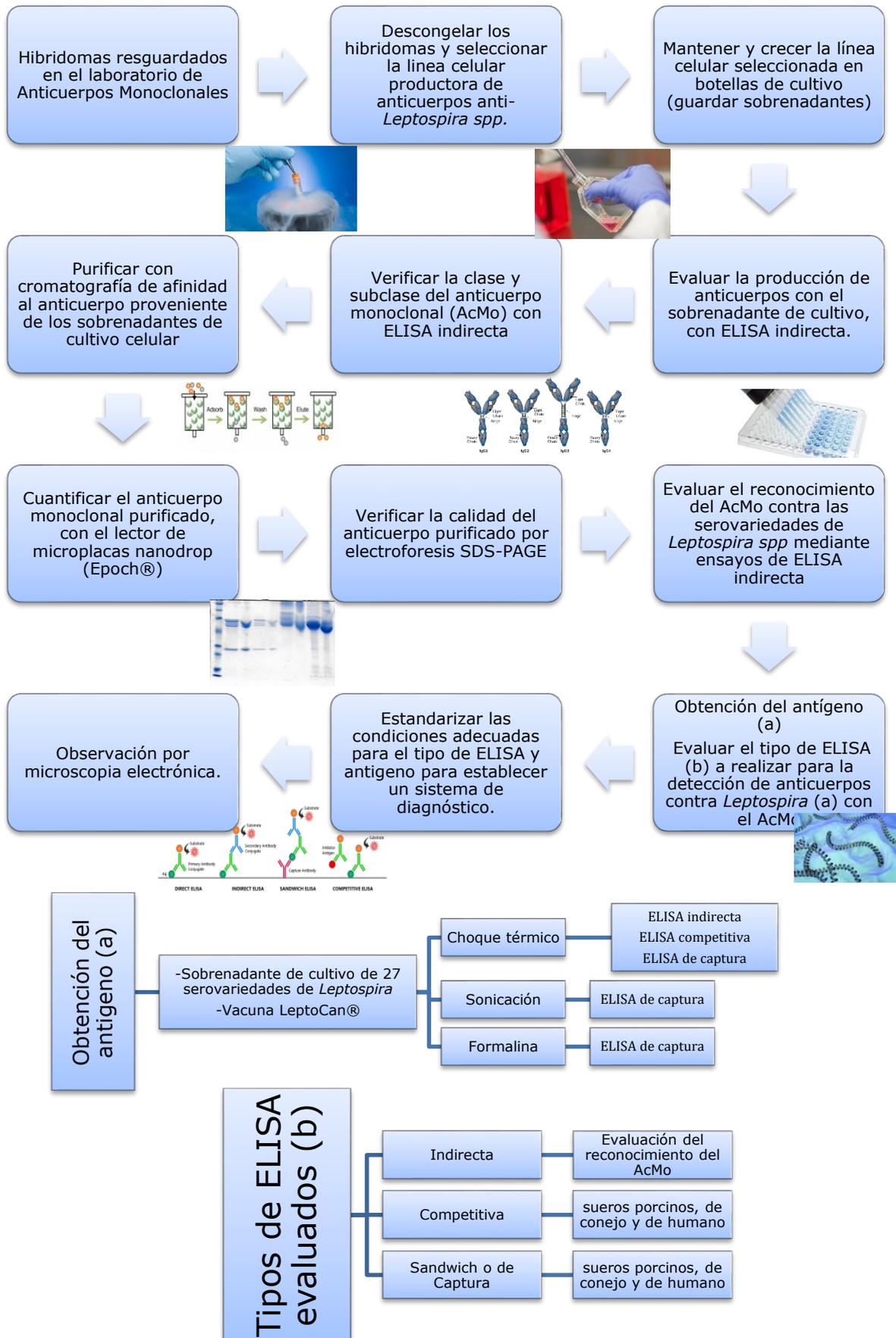


Figura 14. Diagrama de flujo general de la metodología.

## 6.1. Evaluar viabilidad celular y producción de anticuerpo monoclonal

### 6.1.1. Cultivo celular

Se descongelaron 3 (hibridomas) clonas productoras de anticuerpos contra *Leptospira* spp. manteniéndolas en botellas de poliestireno con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado al 10% de SFB (suero fetal bovino), en incubación con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C. Una sola clona (LTGD7) presentó viabilidad celular, de ella se obtuvieron células uniformes, refringentes y sin granulaciones (Figura 15) por lo que se continuó a evaluar la producción de anticuerpos anti-*Leptospira* spp en la clona por ELISA indirecto.

Se realizó un banco de 20 viales de la clona productora. Recuperando las células de las botellas de cultivo por medios físicos y manteniéndolas en suspensión celular a una concentración 5x10<sup>6</sup> células en solución criopreservadora (SFB con DMSO al 10%), colocándolas inmediatamente a -70°C por al menos 24 horas, para su posterior resguardo a largo plazo en nitrógeno líquido.



Figura 15. Células en cultivo. 40x.

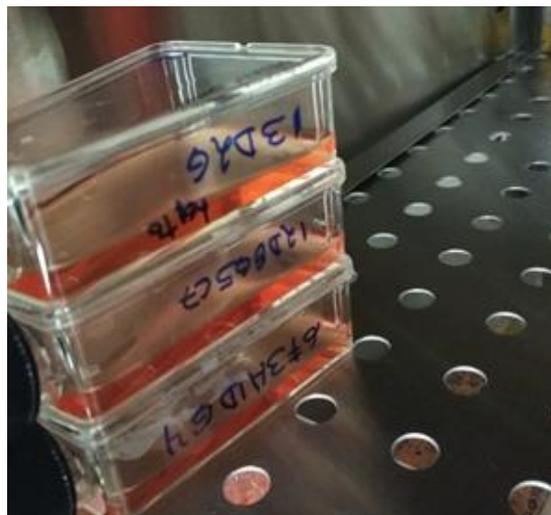


Figura 16. Hibridomas en Botellas de cultivo de 25cm<sup>2</sup> de poliestireno.

### 6.1.2. Evaluación de la producción de anticuerpo monoclonal (LTGD7).

Se evaluó la producción de anticuerpos monoclonales (AcMo) a través de un ELISA indirecto.

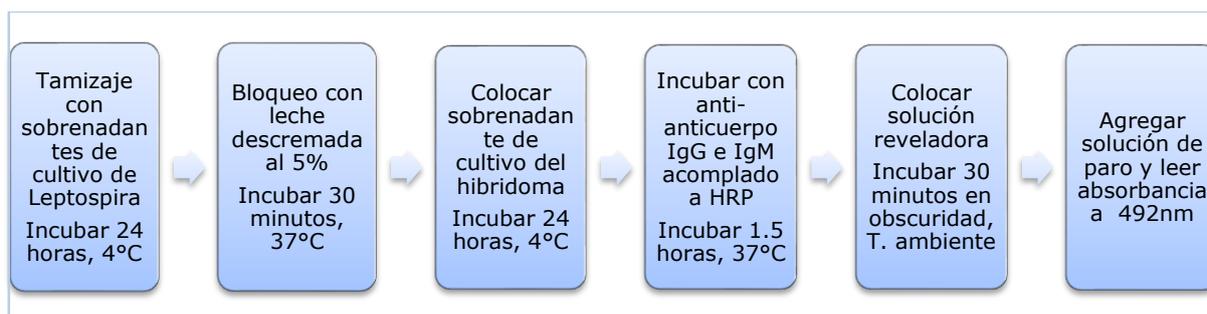


Figura 17. ELISA indirecto con sobrenadantes de cultivo celular.

Se tamizo una placa de 96 pozos con sobrenadantes de cultivo de *Leptospira*, provenientes del laboratorio de leptospirosis y rickettsiosis (LERI) del InDRE, posteriormente se incubo con el sobrenadante obtenido de las botellas de cultivo del hibridoma, al finalizar se incubo con un anticuerpo secundario (invitrogen) anti-ratón IgG conjugado a HRP (peroxidasa de rábano, por sus siglas en inglés) para poder evidenciar la respuesta colorimétrica, se incubo con dos conjugado uno anti-IgG y otro anti-IgM, para hacer una primera clasificación de la clase de anticuerpos producidos por la clona. Entre cada fase de la técnica se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05%.

### 6.1.3. Determinar clase y subclase del AcMo (LTGD7).

Se determinó la clase y subclase del AcMo (LTGD7), con un ELISA indirecto con la misma metodología con la cual se evaluó la producción de anticuerpos (Figura 17), solo que se utilizaron cinco diferentes anticuerpo-antiratón acoplados a HRP. Tres conjugados específicos a subclases de IgG: anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3; un anticuerpo anti-IgG y finalmente un anticuerpo-anti-IgM como control.

## 6.2. Purificación y cuantificación del AcMo

### 6.2.1. Purificación por cromatografía de afinidad.

Debido a la naturaleza del anticuerpo (IgG2b) se purificó por medio de una columna cromatográfica de afinidad media con proteína A con características de acuerdo a tabla 1 (Protein A Sepharose CL-4B) (GE), esta permite la unión de la fracción cristalizada.

Se empaco la columna con fibra de nylon, evitando la formación de burbujas, para mantener el medio en la columna, se equilibró y preparo con amortiguador de unión (2-3 volúmenes), posterior a ello se coloca el sobrenadante (proveniente de botellas de cultivo del hibridoma), el cual se pasó previamente a través de un filtro de 20  $\mu$ , al finalizar se coloca amortiguador de unión (2-3 volúmenes) para asegurar la ausencia de componentes proteicos inespecíficos, durante la elución se utiliza un amortiguador de glicina a un pH menor al amortiguador de unión lo cual permitirá romper el enlace entre la proteína A y la región variable del anticuerpo monoclonal, se recomienda recibirlo en una solución (tris-HCl) que establezca el pH del medio (Tabla 2).

Se purificaron sobrenadantes de cultivo, en una columna de sefarosa de mediana afinidad con proteína A. Se eluyó con glicina a pH 2.5, por lo cual se recuperó en fracciones el anticuerpo con Tris a pH 8.8 para neutralizar el pH, se dializó en membrana de celulosa y se mantuvo a 4°C

Tabla 1. Características de la columna de sefarosa con proteína A.

Densidad del ligando	~3 mg de proteína A/mL medio agotado
Capacidad de unión	~20 mg IgG/mL medio agotado
Estructura del medio	4% unión con agarosa
Estabilidad del pH (la proteína puede hidrolizarse a pH bajo)	
Periodo largo	3-9
Periodo corto	2-10
Limpieza	Hibitane al 2%/Etanol al 20% o con Etanol al 70%

Tabla 2. Soluciones para la purificación.

Amortiguador de unión	Fosfato de sodio 20 mM pH 7.0 Tris 50 mM pH 7.0
Amortiguador de elución	Glicina 0.1 M pH 3.0 Ácido cítrico 0.1 M pH 3.0
Solución neutralizante	Tris-HCl pH 9.0



Figura 18. Columna de purificación.



Figura 19. Diálisis de anticuerpos

#### 6.2.2. Cuantificación del AcMo (LTGD7).

Adicionalmente se realizó una cuantificación con un lector de microplacas Epoch™ BioTek® con ello se pudieron establecer las concentraciones de trabajo en  $\mu\text{g/mL}$ . El Epoch™ es un espectrofotómetro que tiene un sistema basado en monocromador UV-Vis para selección de longitudes de onda, a través del Software para Análisis de Datos Gen5.



Figura 20. Espectrofotómetro Epoch™ BioTek®.

#### 6.2.3. Evaluación de la calidad de la purificación del AcMo (LTGD7) por electroforesis e inmunoblot.

Se aseguró la pureza del anticuerpo a través de una electroforesis SDS-PAGE al 12% para evidenciar la presencia de las cadenas ligera y pesada, así como la molécula completa de IgG. Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% (5% para el gel concentrador), entre dos placas de vidrio y se montó en un estuche dentro de una cabina de electroforesis. Para montar en el gel el AcMo (LTGD7) se prepara con una solución amortiguadora 1:1, en

condiciones no reductoras y reductoras añadiendo  $\beta$ -mercaptoetanol al 10%, se hierven las muestras en baño térmico para posteriormente colocarse en un carril del gel concentrador y se conecta la fuente de poder a la cámara, ajustando la corriente a 120 volts por aproximadamente 40 minutos, al finalizar se coloca el gel en azul de coomasie para observar y determinar los pesos moleculares de las cadenas y/o del anticuerpo como molécula completa.

Finalmente se evaluó a través de un inmunoblot el reconocimiento del hibridoma frente a anticuerpos anti-IgG. Se montó el sistema en un cartucho de transferencia en el siguiente orden: primero se coloca una fibra, después filtros de papel Whatman, posterior una membrana de nitrocelulosa (NC) que este en contacto directo con el gel de electroforesis, ya que aquí se hará la transferencia, posterior se termina el sistema con filtros de papel Whatman y una fibra, es importante evitar la formación de burbujas y ajustar el sistema para que este quede compactado en el estuche de transferencia como se observa en la figura 21. Cuando se tiene el estuche con el sistema montado se coloca en una cámara de transferencia y se conecta la fuente de poder ajustando a 90 volts por una hora. Es importante cuidar la temperatura, así como colocar adecuadamente el ánodo del lado del gel y el cátodo del lado del papel de transferencia.

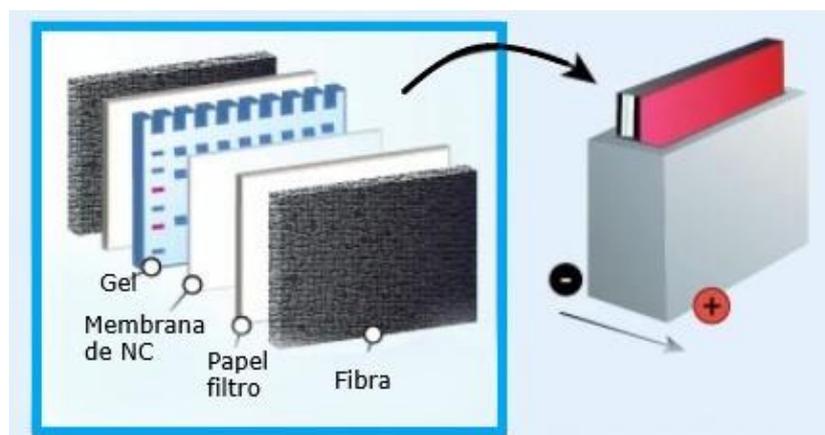


Figura 21. Montaje de sistema de electrotransferencia (obtenido de: [antibodies.com/es/western-blotting](http://antibodies.com/es/western-blotting))

Al terminar se evaluó la transferencia con rojo de Ponceau, posterior a ello se realizó un lavado con agua destilada hasta retirar el colorante.

Una vez la membrana de NC esté lista, se se incuban en solución de bloqueo (PBS con leche descremada al 5%) y se cortan las regiones del papel de interés, posteriormente se agregó el anticuerpo secundario IgG e IgM y por último se reveló con DAB y  $H_2O_2$ , la reacción se detiene por dilución con agua bidestilada. Entre cada incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% y dos lavados con PBS, en agitación por 5 minutos y las incubaciones con anticuerpo secundario y con solución reveladora se realizaron en agitación constante. Posterior a ello

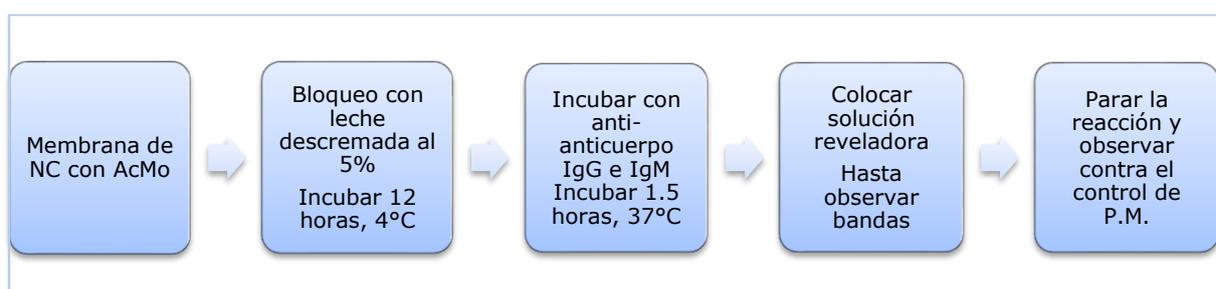


Figura 22. Inmunoblot con AcMo.

### 6.3. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a las serovariedades de *Leptospira*.

#### 6.3.1. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) contra la vacuna LEPTOCAN por un ELISA indirecto.

Se realizó un primer ensayo de reconocimiento del anticuerpo purificado frente a la vacuna LEPTOCAN® ya que a partir de ella se elaboró el AcMo (Hilario, 2010), está es una vacuna inactivada elaborada a partir de 6 serovariedades de la especie *interrogans*, en presentación de dosis única como se observa en el cuadro 2 (Laboratorios TORNEL®). Para poder montar una ELISA indirecta y evaluar el reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a la vacuna, se sometió a la vacuna a choque térmico de acuerdo a la figura 23 y tamizó a una placa para ELISA esta muestra, posterior a ello se colocó el AcMo (LTGD7) para evaluar el nivel de reconocimiento (D.O.) y finalmente un conjugado.

Cuadro 2. Inserto de la vacuna LEPTOCAN®.

	
Dosis	1 mL (dosis única)
Vía de administración	Subcutánea (en la región de la cruz)
Advertencias	Se debe aplicar únicamente en animales sanos. Como cualquier otro producto biológico se pueden desencadenar reacciones anafilácticas después de su aplicación. Antídoto: Aplicar epinefrina seguida de una terapia sintomática.
Fórmula	Suspensión de seis serovariedades de <i>Leptospira interrogans</i> : <i>L. canicola</i> 2.5x10 <sup>8</sup> bacterias /mL. <i>L. icterohaemorrhagiae</i> 2.5 x10 <sup>8</sup> bacterias/mL. <i>L. pomona</i> 2.5 x10 <sup>8</sup> bacterias/mL. <i>L. tarassovi</i> 2.5 x10 <sup>8</sup> bacterias/mL. <i>L. wolffi</i> 2.5 x10 <sup>8</sup> bacterias/mL. <i>L. grippityphosa</i> 2.5 x10 <sup>8</sup> bacterias/mL. Inactivadas, estabilizadas y absorbidas en adyuvante oleoso Inmunoset®.
Recomendaciones	Recomendada a partir de las 12-14 semanas de edad, seguida de una revacunación cada seis meses. Consérvese en un lugar fresco y seco, protegido de la luz solar. No se deje al alcance de los niños. Mantener a una temperatura entre 4 y 8°C. Agítese antes de usarse. Evite el calentamiento o la congelación. Usar jeringas y agujas nuevas y estériles.

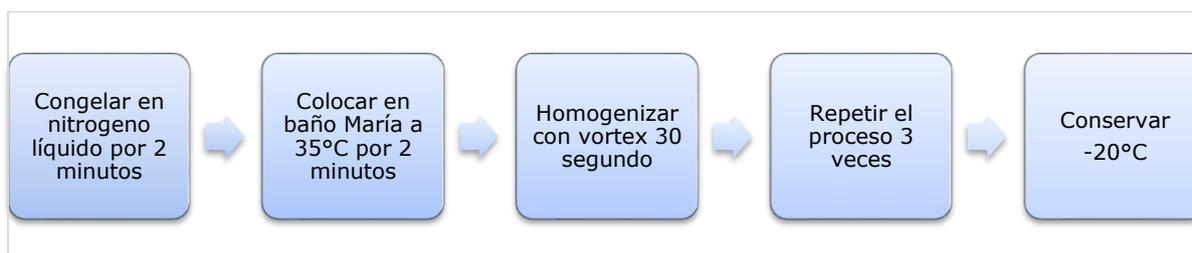


Figura 23. Diagrama de flujo de choque térmico.

Una vez establecido el nivel de reconocimiento del AcMo (LTGD7), ante los serovares presentes en la vacuna, se continuo con los demás serovares de interés.

### 6.3.2. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) ante las 27 serovariedades de *Leptospira* por medio de un ELISA indirecta.

Se evaluó el reconocimiento del AcMo (LTGD7) ante 8 serovares de la espiroqueta a través de un ELISA indirecto, con los sobrenadantes provenientes de cultivo, posterior a ello se evaluó a los 19 serovares restantes, evaluando con ello un total de 27 serovares, los cuales son considerados de importancia epidemiológica en el país y están reportados en la tabla 3.

Tabla 3. Listado Taxonómico de las 27 serovariedades de *Leptospira spp.* en el InDRE.

Género	Especie	Grupo	Serovariedad	Cepa	# InDRE	
<b>Leptospira</b> <b>Familia:</b> <b>Leptospiraceae</b> <b>Orden:</b> <b>Spirochaetales</b>	Interrogans	Australis	australis	Ballico	1	
			bratislava	Jez-Bratislava	20	
		Sejroe	hardjo	Hardjoprajitno	2	
			wolffi	3705	12	
		Icterohaemorrhagiae		copenhageni	M 20	3
				icterohaemorrhagiae	RGA	7
		Autumnalis	autumnalis	Akiyami A	4	
		Pyrogenes	pyrogenes	Salinem	5	
		Pomona	pomona	Pomona	9	
		Grippotyphosa	grippotyphosa	Moskva V	11	
		Batavie	batavie	Swart	13	
		Canicola	canicola	Hound Utrecht	14	
		Hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis	15	
		Djasiman	djasiman	Djasiman	25	
	Borgpetersenii	Sejroe	sejroe	M84	6	
		Tarassovi	tarassovi	Perepicilin	10	
		Javanica	javanica	Veldrat Batavia 46	17	
		Ballum	ballum	Mus 127	21	
			castellonis	Castellon 3	16	
		Kirschneri	Cynopteri	cynopteri	3522 C	8
		Noguchii	Panama	panama	CZ 214	18
		Biflexa	Semarang	patoc	Patoc 1	19
		Santarosai	Pyrogenes	alexi	HS 616	26
		Santarosai	Hebdomadis	borincana	HS 622	23
		Weilii	Celledoni	celledoni	Celledoni	24
				georgia	Georgia	22
				mankarso	Mankarso	27

### 6.3.3. Evaluación de la especificidad del reconocimiento del AcMo (LTGD7).

Con el anticuerpo ya purificado se realizó una ELISA indirecta para evaluar la especificidad del AcMo (LTGD7), al enfrentarlo ante algunas enterobacterias comunes: *Salmonella haittingfoss*, *Citrobacter O29*, *Shigella dysenteriae* y *Escherichia coli* 01575H7; a estas bacterias se les realizó un choque térmico (figura 23). Ya que estas son de interés para el diagnóstico diferencial

### 6.4. Selección de la técnica para la obtención del antígeno

Debido a que en el diagnóstico serológico se detectan a los anticuerpos y no a los antígenos se propuso evaluar dos sistemas de ELISA: uno de competencia y posteriormente uno de captura (o sándwich). Al asegurar el reconocimiento del AcMo (LTGD7), se procedió a determinar el método de obtención del antígeno para establecer un sistema de apoyo al diagnóstico de Leptospirosis. Para estandarizar un sistema de competencia o de captura se requirió estandarizar los parámetros del ensayo como son el AcMo y el antígeno, al tener cuantificado y purificado el anticuerpo monoclonal, se continuo con la estandarización de la obtención del antígeno para los ensayos.

En principio se eligieron dos orígenes de obtención de antígeno para los ensayos de ELISA indirecta iniciales: uno de ellos perteneciente a serovariedades de la espiroqueta provenientes de cultivo y otro a la vacuna (ver cuadro 2) elaborada a partir de algunas serovariedades, tanto a la vacuna como a las espiroquetas de cultivo se les realizó un choque térmico para aumentar su permeabilidad y favorecer el reconocimiento del AcMo (LTGD7).

#### 6.4.1. Choque térmico

Para liberar sus componentes antigénicos se realizó choque térmico a la vacuna de LEPTOCAN® así como a 8 serovariedades (posteriormente fueron 27 serovariedades totales).

Inicialmente se hicieron alícuotas de la vacuna para evaluar diferentes tratamientos de acuerdo al cuadro 3; a las alícuotas 2 y 3 se les realizó choque térmico (ver figura 20).

Cuadro 3. Tratamientos a alícuotas de la vacuna LEPTOCAN®.

Alícuota	Tratamiento
1	Se tomaron 200 µL de la vacuna la cual se centrifugó a 12 000 g durante 30 min, posterior a ello se separó el sobrenadante y la pastilla, la pastilla se resuspendió con PBS.
2	Se tomaron 200 µL de la vacuna, se le realizó choque térmico y se centrifugó a 12 000 g durante 30 min, posterior a ello se separó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con PBS.
3	Se tomaron 200µL de la vacuna y se le realizó choque térmico.

Se midieron concentraciones por el método de Bradford y se conservaron a -20°C.

Para los ensayos de ELISA de captura y de competencia se propuso agrupar las 27 serovariedades en 3 grupos de acuerdo a la seroprevalencia en el país, reportada por el laboratorio de leptospirosis del INBRE como se observa en la figura 24.

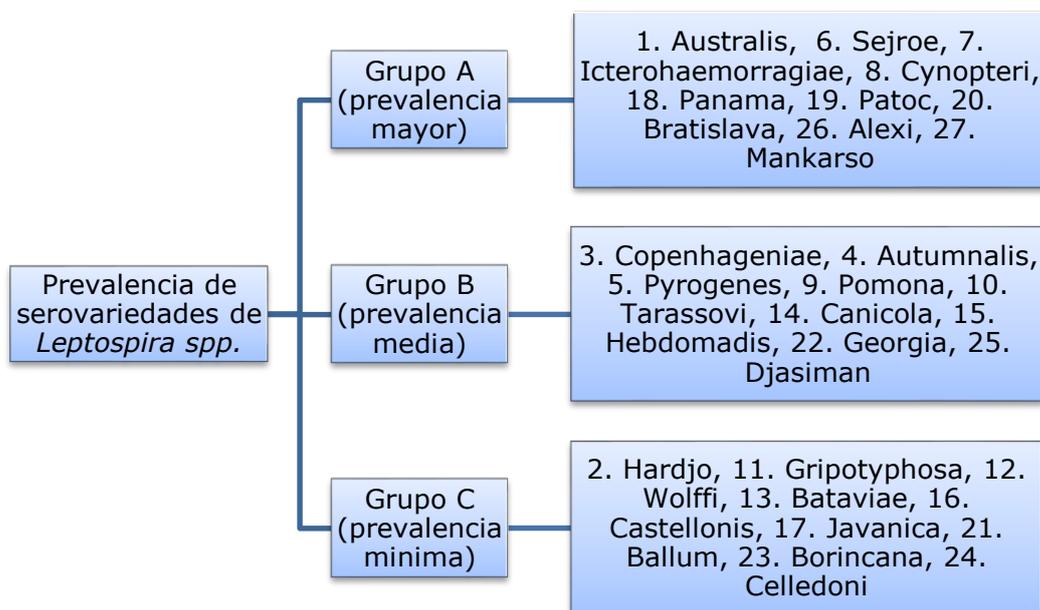


Figura 24. Diagrama de grupos de acuerdo a seroprevalencia de *Leptospira spp* en México.

Sin embargo, se requirió probar tratamientos alternativos para liberar los componentes antigénicos de la espiroqueta debido al reconocimiento que presentaron los anticuerpos provenientes de muestras humanas, al establecer un sistema de ELISA de captura por lo cual también se sonicó y se trató con formalina a las leptospiras.

#### 6.4.2. Sonicación

Se recolectaron 3.5-4 mL de cultivo de cada una de las 27 serovariedades (debido a la alta cantidad de volumen requerido para el ensayo) (Velineni et al., 2016) obteniendo un volumen de alrededor de 100 mL, se centrifugaron a 12000 g por 30 minutos, se lavó la pastilla obtenida 3 veces, posterior a ello se re-suspendió con 800  $\mu$ L de solución amortiguadora de sonicado. Se sonicó con un sonicador Branson (ver figura 25), en 6 tiempos de 5 segundos con 45 segundos de descanso, en baño de hielo (Sonifier® Cell Disrupters, Branson Ultrasonics). Se obtuvo una concentración de 1.929  $\mu$ g/mL, cuantificado en un lector de microplacas EPOCH® Biotex.



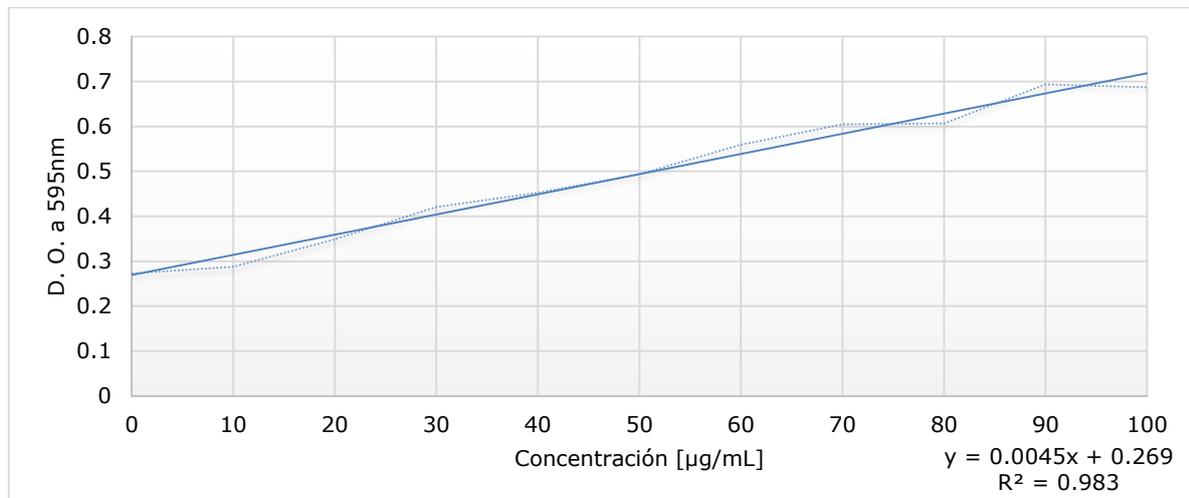
Figura 25. Sonicator Branson. Izquierda: cámara de sonicador y derecha: Fuente de poder.

#### 6.4.3. Tratamiento con formalina

Se recolectaron sobrenadantes de las 27 serovariedades y concentraron hasta obtener una suspensión bacteriana mayor a 0.5 D.O. (a 420 nm). Se obtuvo una densidad óptica de 1.213 en 100  $\mu\text{L}$ , posterior a ello se mantuvo en formalina por 4 horas y se colocó en baño térmico a ebullición por 45 minutos, se mantuvo a 4°C (Penna et al., 2017) (estabilidad 1 año) (Bourhy et al., 2013). No fue posible cuantificar debido a que se utiliza de forma directa, sin embargo, se evaluó la respuesta antígeno-anticuerpo para poder estandarizar las condiciones de trabajo. También se evaluó el reconocimiento por medio de una Inmununoelectrotransferencia.

#### 6.4.4. Cuantificación de proteínas por método de Bradford

Se cuantificaron las serovariedades y la vacuna por choque térmico; así como las serovariedades por sonicación, sin embargo, las obtenidas con formalina se trabajaron directo de acuerdo a la metodología de Bourhy (Bourhy et al., 2013). Se realizó la cuantificación de proteínas de la vacuna y 27 serovariedades por el método de Bradford utilizando una curva estándar (gráfica 2) de 0-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de albúmina sérica bovina ASB (Fracción V) (SIGMA).



Gráfica 2. Curva estándar de cuantificación de proteínas por método de Bradford

#### 6.5. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Se realizaron los ensayos de ELISA en placas de poliestireno corning® costar® de 96 pocillos de fondo plano. En los ensayos iniciales de ELISA indirecto para evaluar la respuesta del AcMo (LTGD7) y especificidad se tamizó la placa de poliestireno con el antígeno (choque térmico) en solución amortiguadora de carbonatos (pH 9.6, 0.1 M).

En todos los ensayos de ELISA se realizaron 3 lavados con PBS (NaCl 0.15M, fosfatos 0.01M, pH 7.2)-Tween 20 al 0.05% de 30 seg. en agitación, para el bloqueo se utilizó leche descremada al 5% en solución de lavado. El anticuerpo secundario acoplado a HRP se preparó en solución de lavado. Para evidenciar la reacción colorimétrica se utilizó una solución de citratos en la cual se colocó OPD (orto-fenilendiamina) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno), reaccionando con la peroxidasa de rábano (HRP) del conjugado (figura 26). Para la solución de paro se utiliza una solución de ácido sulfúrico (2N).

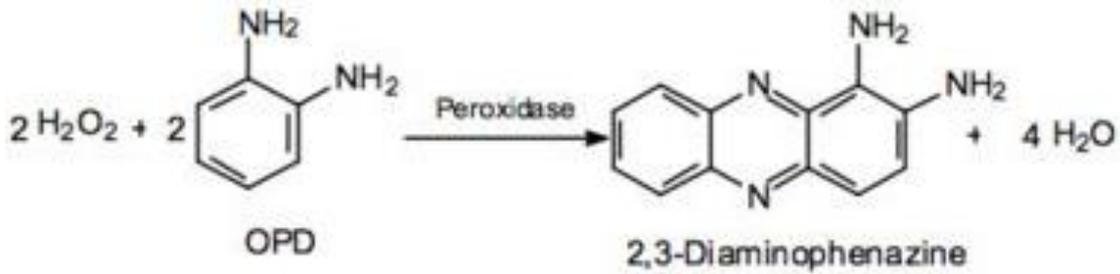


Figura 26. Reacción de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa

### 6.5.1. Evaluación de un sistema de diagnóstico con un AcMo (LTGD7) por ELISA competitiva.

Previo a las evaluaciones con muestras humanas, se evaluó un sistema de competencia con sueros de conejo (inmunización con leptospiras inactivadas) con anticuerpos policlonales obtenidos del laboratorio de LERI y con sueros positivos de cerdo, para establecer las condiciones del ensayo (concentraciones, tiempos de incubación, dilución del suero), posterior a ello se evaluó con sueros humanos.

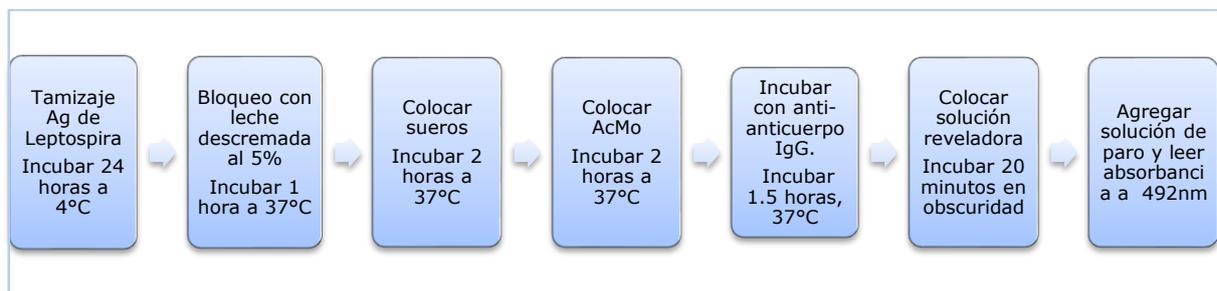


Figura 27. ELISA de competencia con sueros positivos.

Los ELISA se realizaron con el antígeno (en amortiguador de carbonatos) en mezclas de grupos (A, B y C), como se observa en la figura 24. Se realizó un bloqueo a la placa de 1 hora, se colocaron los sueros de conejo y porcinos, y finalmente se realizó una incubación con el anticuerpo conjugado. Tanto los sueros como el AcMo y el conjugado se diluyeron en solución de lavado y entre cada proceso se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% de 1 minuto en agitación.

Se colocó como control positivo, el AcMo (LTGD7) en un pocillo sin el suero; como control de la respuesta de los sueros, se colocó el suero sin el AcMo (LTGD7); como control del conjugado se tamizó un pozo únicamente con suero de ratón pre-inmune (1:1000) y se incubó con el conjugado; finalmente como un blanco solo se colocó solución de lavado posterior al bloqueo.

### 6.5.2. Evaluación de un sistema de diagnóstico con un AcMo (LTGD7) por ELISA de captura.

En los ensayos de captura se tamizó el AcMo (LTGD7) en solución de boratos (NaCl 0.7M, boratos 0.01M, pH 8.0), el antígeno (choque térmico) se utilizó en solución de lavado (PBS-Tween), al igual que el conjugado y los sueros humanos, de conejo y porcinos.



Figura 28. ELISA de captura con sueros positivos.

Entre cada proceso se realizaron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.05% de 1 minuto en agitación. Como control del conjugado se tamizo un pozo únicamente con suero de ratón pre-inmune (1:1000) y se incubo con el conjugado; finalmente como un blanco solo se colocó solución de lavado posterior al bloqueo. Se utilizaron diferentes sueros previamente determinados con MAT y se clasificación en 3 grupos: sueros de título alto, título medio y por último con sueros negativos.

A diferencia de los demás ELISA (indirecta y competitiva), se utilizó un conjugado anti-humano IgG (inivtrogen). También se enfrentó el sistema con el antígeno sonicado (6.4.2.) y tratado con formalina (6.4.3.)

#### 6.6. Epifluorescencia.

Se realizó un inmunoensayo con el anticuerpo monoclonal, en donde se realizó una fijación de 1 mL de bacterias (antígeno) en suspensión ( $3 \times 10^8$  bacterias/mL), posterior a ello se fijaron en formalina por 24 horas, se incubaron con lisozima para romper membranas, se incubaron con el anticuerpo monoclonal, así como un control con un anticuerpo policlonal y solo con PBS, posterior a ello un anticuerpo secundario acoplado a fluorocromos (FICT y TRITC) y finalmente se montaron en placas con fibronectina y se observó al microscopio (Figura 18). El FICT estaba acoplado a un anticuerpo secundario anti-Ratón, mientras que el TRITC estaba acoplado a un anticuerpo secundario anti-Conejo.

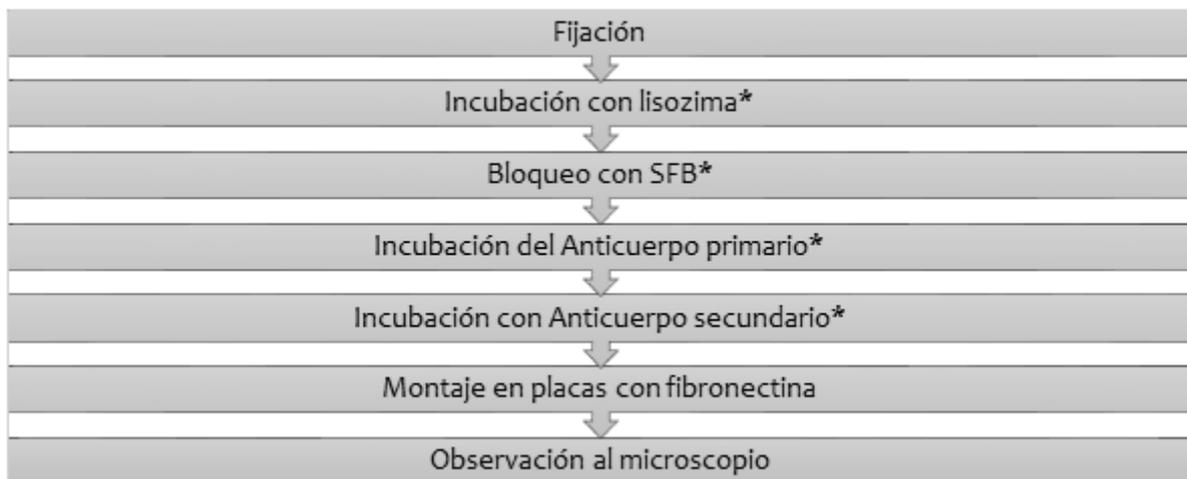


Figura 29. Diagrama metodológico del montaje para epifluorescencia.

## 7. Resultados.

### 7.1. Evaluación de la producción de un anticuerpo monoclonal.

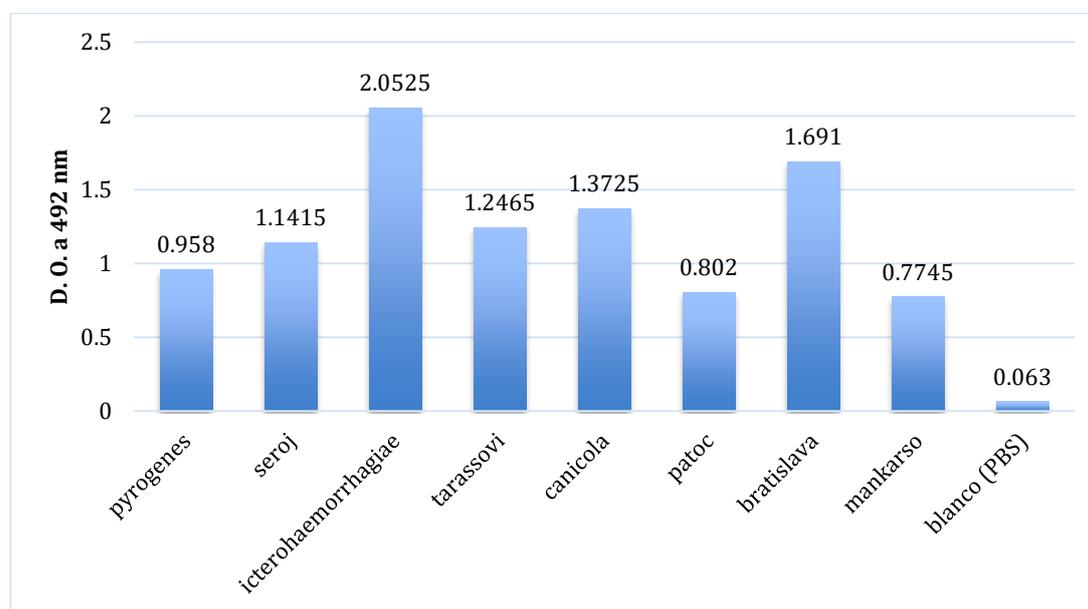
#### 7.1.1. Reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a serovariedades de *Leptospira* sp. Por ELISA indirecto.

Se obtuvieron células viables y con la morfología esperado de acuerdo a lo reportado (Hilario, 2010), por lo cual se continuó verificando la respuesta de reconocimiento a las espiroquetas, se evaluó inicialmente con 8 serovariedades. Previo al ELISA, se cuantificaron por método de Bradford, obteniendo los resultados reportados en la tabla 4

Tabla 4. Concentración de acuerdo a D.O. de las 8 serovariedades (5, 7, 6, 10, 14, 19, 20, y 27).

Serovar	# 5	# 7	# 6	# 10	# 14	# 19	# 20	# 27
	<i>pyrogenes</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	<i>sejroe</i>	<i>tarassovi</i>	<i>canicola</i>	<i>bratislava</i>	<i>patoc</i>	<i>mankarso</i>
D.O.	0.305	0.325	0.345	0.329	0.339	0.402	0.329	0.397
[µg/mL]	64.00	99.60	135.11	106.66	124.44	236.44	106.66	227.55

Se realizó un ELISA indirecto (6.1.2/ figura 17), se tamizó la placa con 200 µL de cada serovar a una concentración de 10 µg/mL, se bloqueó la placa y posterior se incubo con 200 µL de sobrenadante de cultivo del hibridoma.



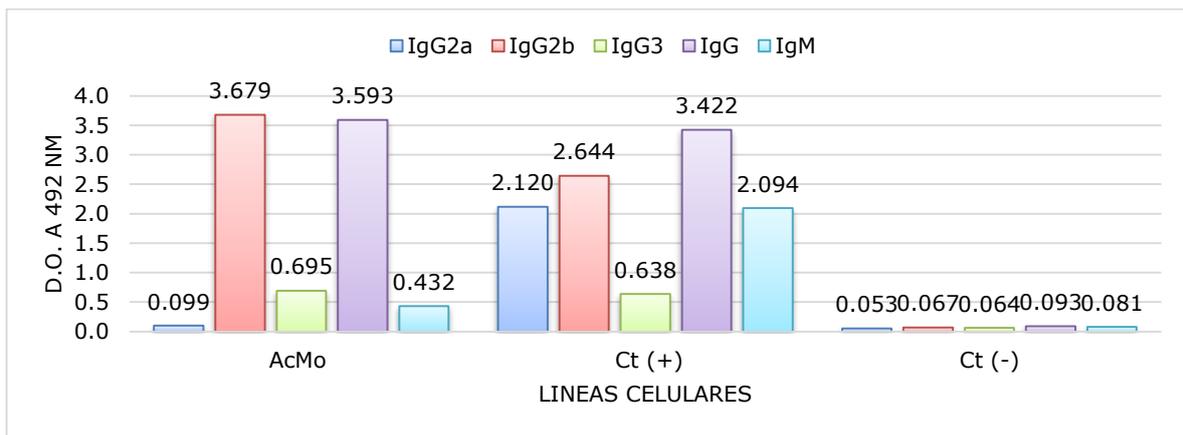
Gráfica 3. ELISA indirecta de serovariedades a 10 µg/mL contra sobrenadante de cultivo (AcMo).

De acuerdo a la gráfica 3, el sobrenadante evidencio un reconocimiento mayor a .7 D.O. por cada una de las serovariedades, por lo cual se continuo a verificar la clase y subclase del AcMo (LTGD7).

#### 7.1.2. Determinación de clase y subclase del AcMo (LTGD7).

Como se menciona en la parte 6.4.3 de la metodología se determinó la clase y subclase del AcMo (LTGD7) con un ELISA indirecto, estaba reportado como IgG2b. (Hilario, 2010). Se utilizaron como controles líneas celulares productoras de anticuerpos específicos a cada

uno de los conjugados probados, mientras que como control negativo se utilizó PBS (ver gráfica 4).



Gráfica 4. ELISA indirecta con clases y subclases de IgG e IgM contra LTGD7 puro

Se comprobó que LTGD7 era un anticuerpo de clase IgG y subclase 2b, además se descartó que fuera de tipo IgM.

## 7.2. Purificación cromatografía de afinidad y cuantificación del AcMo contra *Leptospira spp.*

Se pasaron por columna 200 mL de sobrenadante, recuperando fracciones de aproximadamente 1 mL para generar un perfil de purificación (ver gráfica 5). Se obtuvo un total de 8 mL de anticuerpo puro a una concentración proteica de 589 µg/mL, la cuantificación se realizó en un lector de microplacas EPOCH®. Obteniendo un lote homogéneo para los ensayos posteriores de aproximadamente 4 mg de anticuerpo puro contra leptospirosis en este lote de purificación.

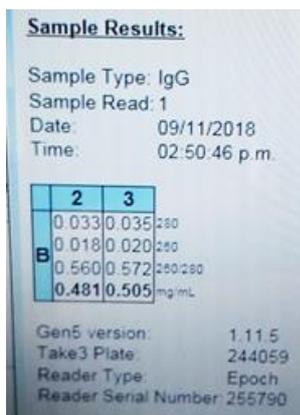
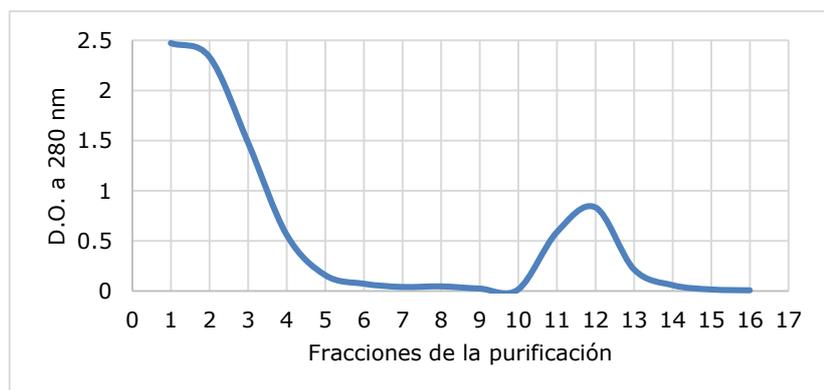


Figura 30. Cuantificación de anticuerpos en Lector de microplacas Epoch BioTek®.



Gráfica 5. Perfil de purificación de LTGD7

### 7.2.1. Evaluación del nivel de pureza del anticuerpo por electroforesis SDS-PAGE e IET.

Se evaluó la pureza del anticuerpo a través de una electroforesis SDS-PAGE al 12% como se observa en la figura 31.

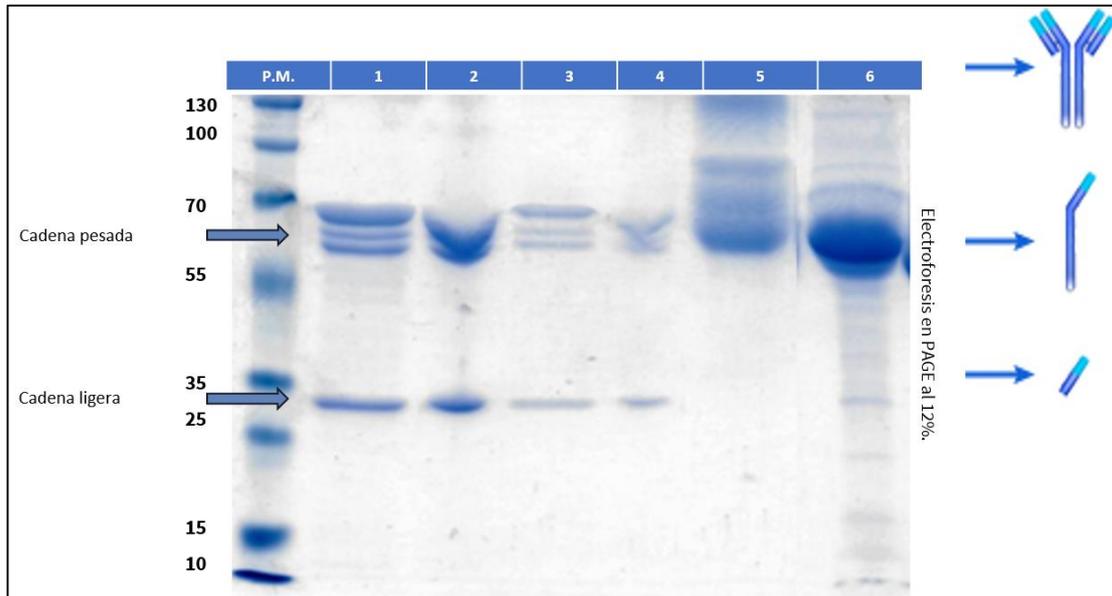


Figura 31. Gel de Electroforesis SDS-PAGE al 12%. Tinción azul de Coomassie. Los carriles 1-4 corresponden al anticuerpo purificado; Carril 1. AcMo en Condiciones reductoras ( $\beta$ -mercaptoetanol) [10  $\mu$ g], Carril 2. AcMo en Condiciones no reductoras [10  $\mu$ g], Carril 3. AcMo en Condiciones reductoras ( $\beta$ -mercaptoetanol) [5  $\mu$ g], Carril 4. Condiciones no reductoras [5  $\mu$ g], Carril 5. Vacuna LeptoCan® [10  $\mu$ g], Carril 6. Sobrenadante de cultivo.

También se colocaron muestras de la vacuna después de realizar choque térmico carril 5 y en el carril 6 sobrenadante de cultivo del hibridoma (el anticuerpo antes de la purificación) para observar la presencia de albúmina, la cual, en los carriles donde estaba la muestra del anticuerpo purificado no se observaba. Se llevó a cabo la electroforesis obteniendo la cadena pesada y ligera, sin embargo, la zona de la cadena pesada se observaba fraccionada en 3 partes.

Posterior a ello se realizó un IET para descartar el reconocimiento de anticuerpos clases IgM, además de verificar el reconocimiento con la cadena pesada.



Figura 32. Evaluación de la pureza por IET.

Se realizó una inmunoelectrotransferencia del anticuerpo monoclonal, un control de IgG y de IgM, posterior a ello se colocó un antígeno secundario (anti-IgM/anti-IgG y PBS). Se observó que existe una reacción tanto con la cadena ligera como pesada, al evaluar con anticuerpos secundarios IgG\* (gamma específico), se descartó además reacción cruzada con anticuerpos tipo IgM.

### 7.3. Evaluación del reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a las serovariedades de *Leptospira spp.*

#### 7.3.1. Reconocimiento de un AcMo (LTGD7) frente a la vacuna LEPTOCAN® por ELISA indirecto.

Para montar el sistema de ELISA indirecto con la vacuna se dividió en alícuotas (6.4.1/cuadro 3) para realizar un choque térmico (CT) en algunas y posteriormente se cuantifico por método de Bradford. Se realizó una curva de 0-100 µg/mL y a través de una interpolación se determinó la concentración de proteínas presentes en las muestras.

Tabla 5. Concentración de proteínas obtenidas por método de Bradford.

Fracción de las alícuotas	1	2	3	4	5
Tratamiento	Sobrenadante	Pastilla resuspendida	Sobrenadante CT	Pastilla resuspendida CT	Vacuna completa CT
[µg/mL]	37.34	19.56	740.45	108.45	1345.78

Cómo se observa en la tabla 5 en las fracciones 1 y 2, se obtuvo una baja concentración de proteínas en la parte de la pastilla, lo cual podría indicar que la mayor cantidad de proteínas se encuentra en el sobrenadante, debido al efecto mecánico del proceso de las proteínas de membrana quedaron expuestas y solo se compactaron en la pastilla los demás componentes estructurales. Se observó que en las fracciones 3 y 4 el efecto del choque térmico permitió que las células pudieran liberar sus componentes proteínicos de membrana, permitiendo obtener mayores concentraciones de estas, al igual que en la fracción de la vacuna completa.

Se evaluaron las diferentes fracciones de la vacuna, excepto de la fracción correspondiente al sobrenadante sin choque térmico, debido a la baja concentración.

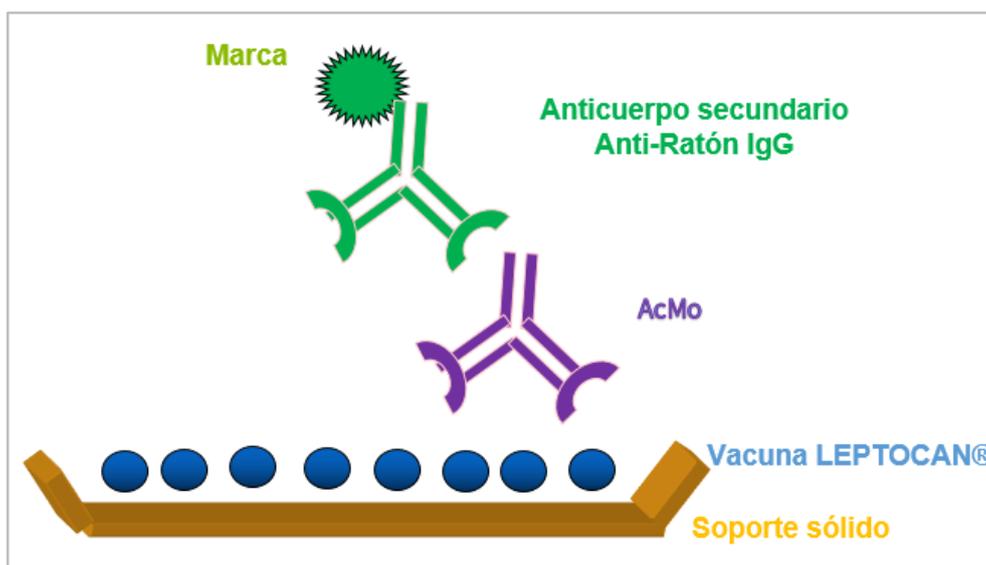
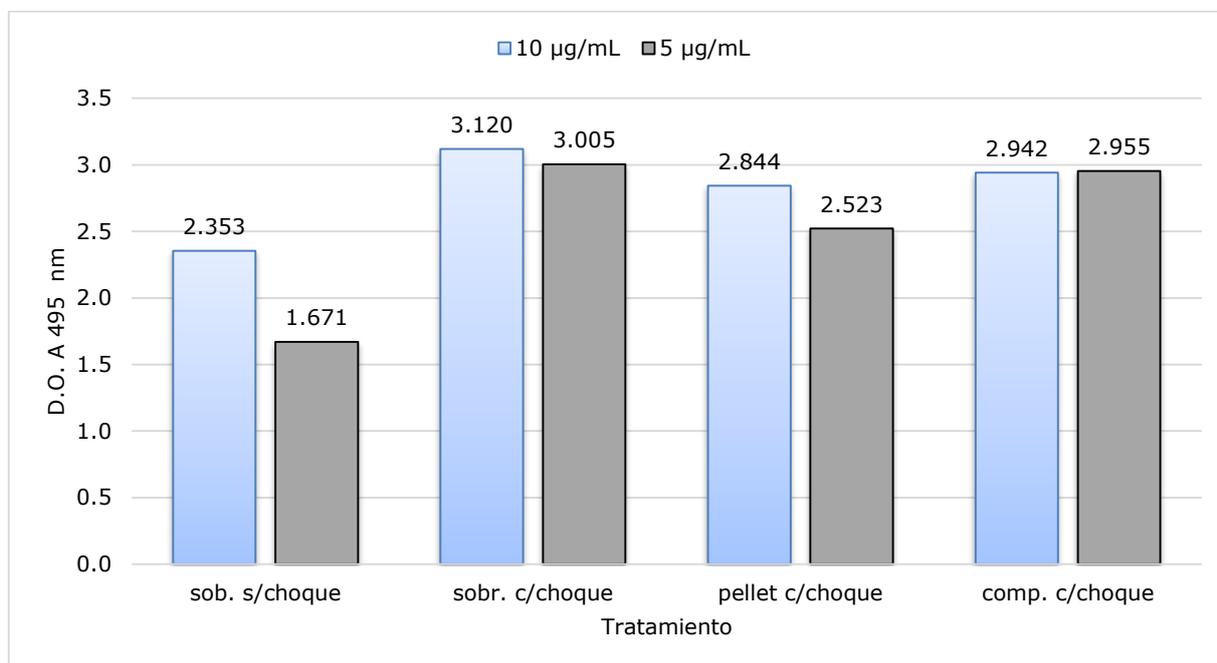


Figura 33. Diseño de ensayo de ELISA Indirecta.



Grafica 6. ELISA indirecta de fracciones de vacuna contra AcMo LTGD7

Se evaluaron las diferentes fracciones de la vacuna contra el AcMo (LTGD7) (Gráfica 6), se tamizó la placa con 200 µL de cada fracción en dos concentraciones 10 y 5 µg/mL, obteniendo una mayor respuesta con la vacuna al ser sometida a choque térmico y trabajando únicamente con el sobrenadante, por lo cual esa fue la fracción con la que se continuó evaluando la producción de anticuerpo de la línea celular.

### 7.3.2. Evaluación del reconocimiento del anticuerpo purificado (LTGD7) contra las 27 serovariedades de *Leptospira* spp., por ELISA indirecta

Al igual que con la vacuna se realizó choque térmico de las 27 serovariedades y cuantificaron con el método de Bradford.

Tabla 6. Resultados cuantificación de las 27 serovariedades.

Serovariedad	1	2	3	5	6	7	8	9	10
D.O.	0.371	0.527	0.664	0.565	0.517	0.719	0.781	0.482	0.450
[µg/mL]	1052	233	345	264	224	390	440	196	170

Serovariedad	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
D.O.	0.417	0.419	0.438	0.459	0.533	0.381	0.714	0.502	0.614	0.522
[µg/mL]	143	145	160	177	238	114	386	212	304	228

Serovariedad	21	22	23	24	25	26	27
D.O.	0.573	0.748	0.468	0.559	0.516	0.731	0.693
[µg/mL]	271	413	184	259	224	400	368

Se evaluó la respuesta del AcMo (LTGD7) en diferentes concentraciones: 0.65 µg/mL, 1.25 µg/mL, 2.5 µg/mL y 5 µg/mL; contra las serovariedades a una concentración ajustada de proteínas de 10 µg/mL, con un ELISA indirecta, para verificar el reconocimiento del anticuerpo monoclonal hacia las 27 cepas y por otro lado definir las condiciones óptimas de trabajo.

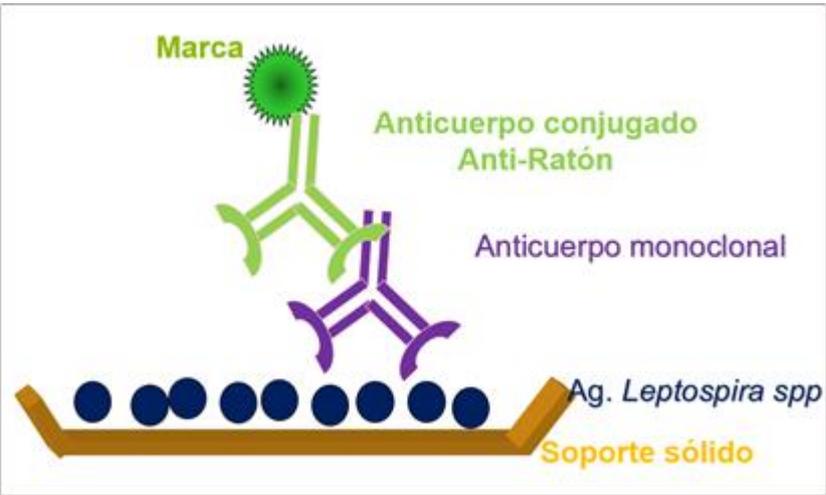
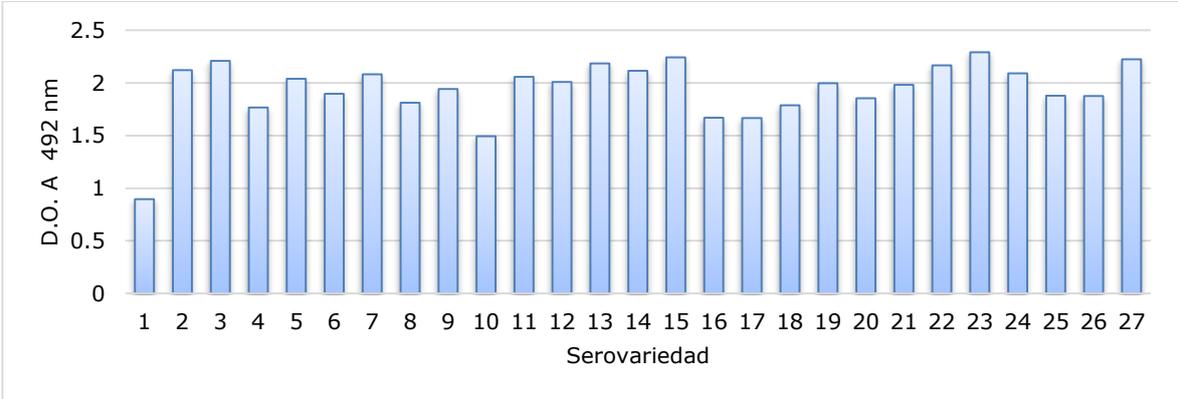
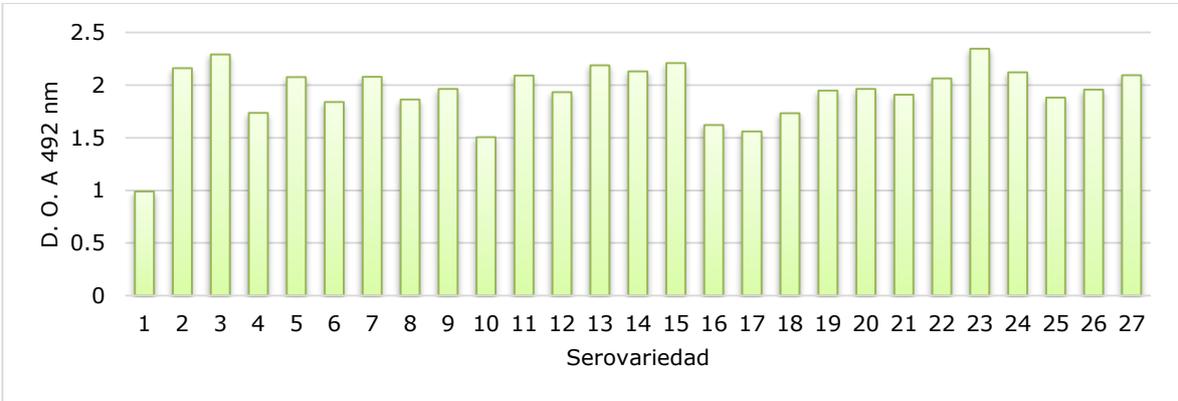


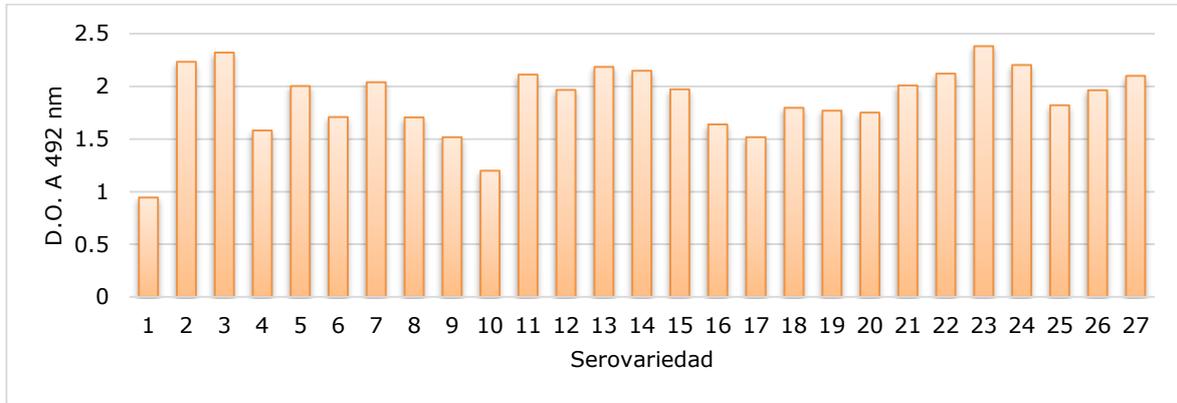
Figura 34. Diagrama de ensayo de ELISA indirecta.



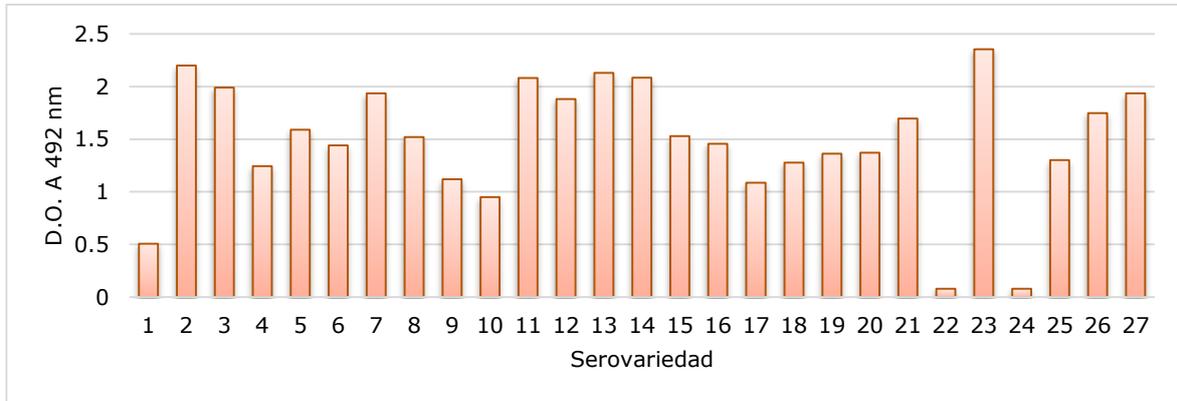
Gráfica 7.1 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con AcMo LTGD7 a 5 µg/µL



Gráfica 7.2 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con AcMo LTGD7 a 2.5 µg/µL

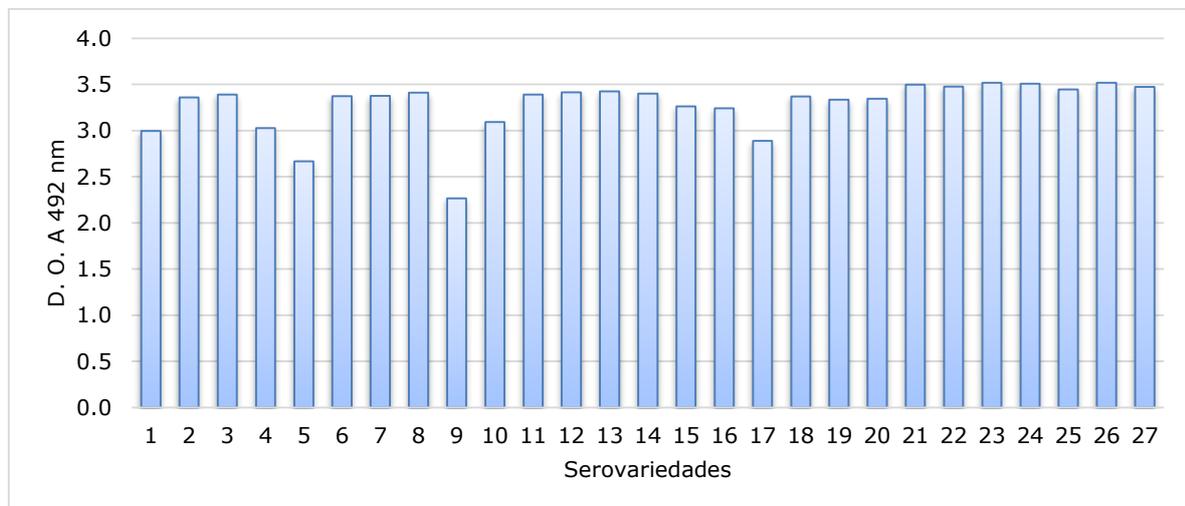


Gráfica 7.3 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con AcMo LTGD7 a 1.25 µg/µL



Gráfica 7.4 ELISA indirecta de las 27 serovariedades con AcMo LTGD7 a 0.65 µg/µL

De acuerdo a los resultados anteriores se determinó que la concentración de trabajo del AcMo (LTGD7) es de 5 µg/mL y para las 27 serovariedades de 10 µg/mL. Debido a que se terminó el anticuerpo monoclonal del primer lote durante las evaluaciones se obtuvo un nuevo lote de anticuerpo purificado. Este fue evaluado por ELISA indirecto verificando el reconocimiento hacia las 27 serovariedades.



Gráfica 8. ELISA indirecta. AcMo Purificado [5 µg/mL] contra serovariedades de *Leptospira spp.* [10 µg/mL]

Se obtuvieron D.O. mayores a 2, lo cual indica un reconocimiento del AcMo (LTGD7) hacia las serovariedades como se había observado anteriormente. Se obtuvo una mejor eficiencia en la producción de este nuevo lote, considerando algunas medidas en el control del crecimiento en el cultivo como son: el pH, la confluencia celular y la morfología celular.

### 7.3.3. Evaluación de reacciones cruzadas del AcMo LTGD7 contra enterobacterias, por ELISA indirecta

Se evaluó por ELISA indirecto las siguientes enterobacterias y una mezcla de *Leptospira spp* a 10 µg/mL, de prevalencia media (ver figura 24) con dos concentraciones diferentes de AcMo (5 y 10 µg/mL):

1. *Salmonella huittingfoss*
2. *Citrobacter O29*
3. *Shigella dysenteriae*
4. *Escherichia coli* 01575H7
5. *Leptospira* mezcla:
  - *L. copenhagenie*
  - *L. autumnalis*
  - *L. pyrogenes*
  - *L. pomona*
  - *L. tarassovi*
  - *L. canicola*
  - *L. hebdomadis*
  - *L. georgia*
  - *L. djasiman*

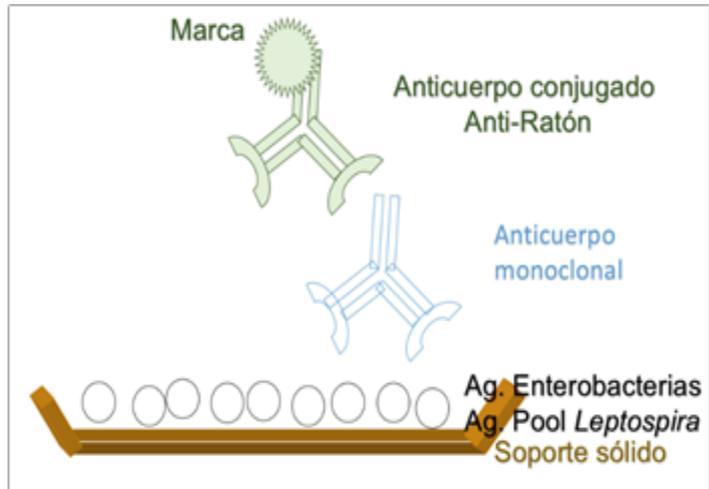
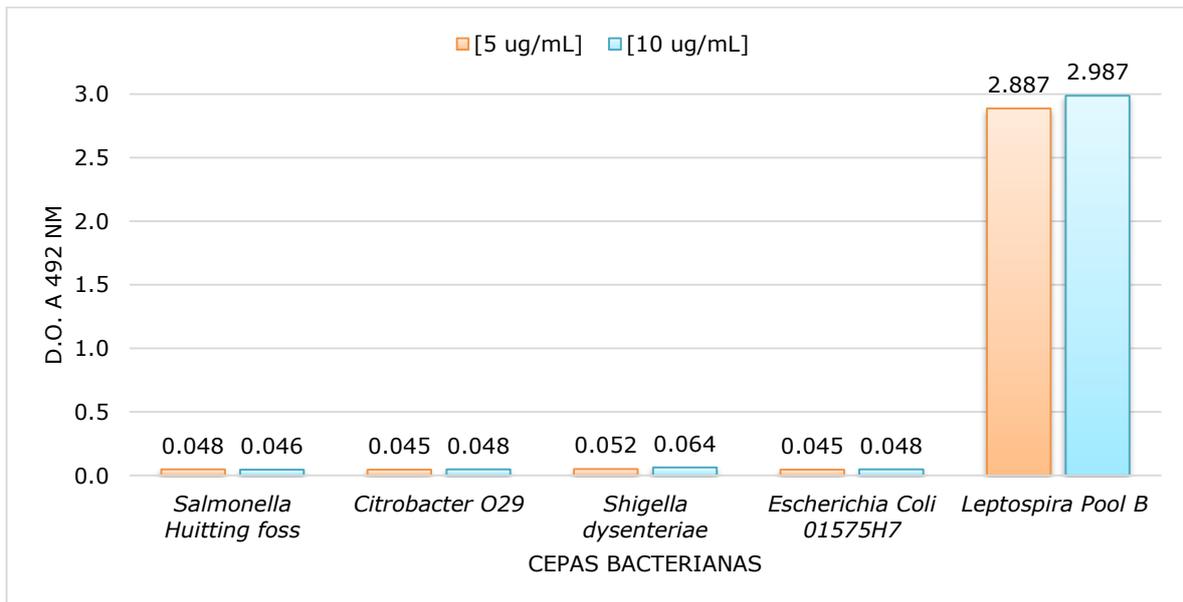


Figura 35. Esquema de ELISA indirecta para evaluar reacciones cruzadas.



Gráfica 9. ELISA indirecta. Reacciones cruzadas de enterobacterias [10 ug/mL] con AcMo (LTGD7).

No se detectó reactividad cruzada, además de una mínima diferencia entre el nivel de reconocimiento del anticuerpo monoclonal a dos concentraciones, con una misma concentración de antígeno.

### 7.4. Evaluación de un sistema de ELISA competitiva con el AcMo (LTGD7) para el diagnóstico de la Leptospirosis humana.

7.4.1. Evaluación de las posibles reacciones cruzadas entre los anti-anticuerpos conjugados de: humano, conejo, cerdo y ratón por ELISA indirecta

Previo a establecer un sistema de captura se evaluaron los diferentes anti-anticuerpos conjugados con una muestra de cada especie, para descartar reacciones cruzadas con 6 serovariedades.

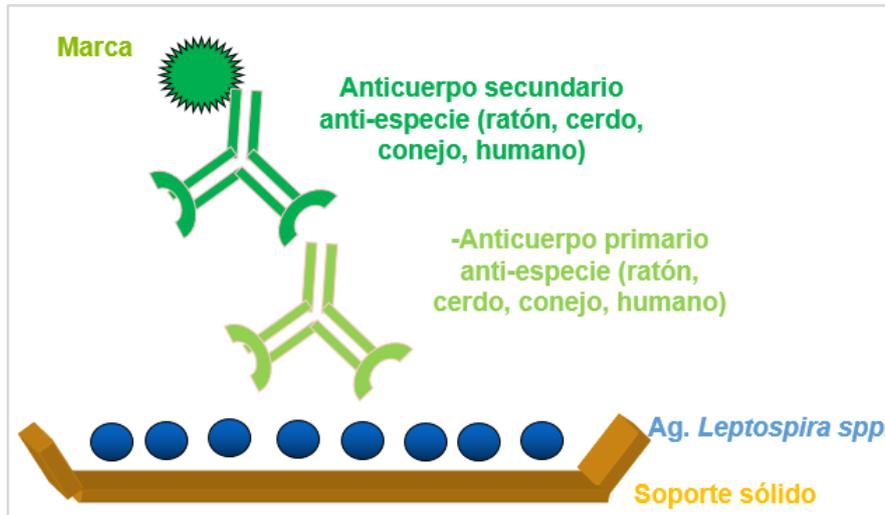
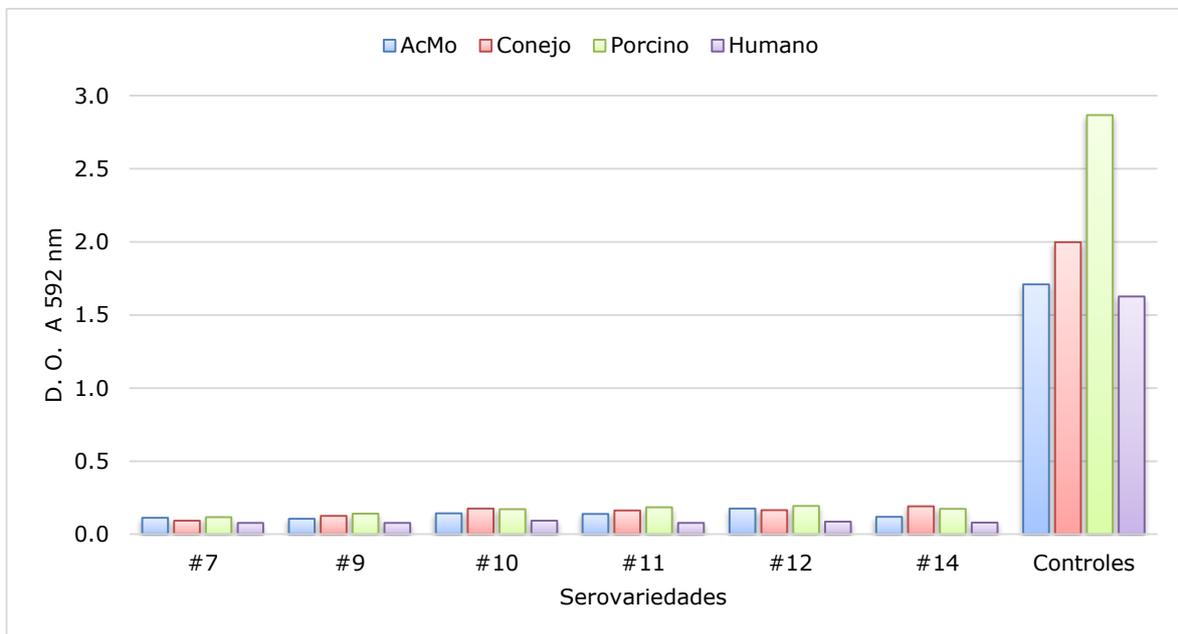


Figura 36. Esquema de ELISA indirecta para evaluar conjugados

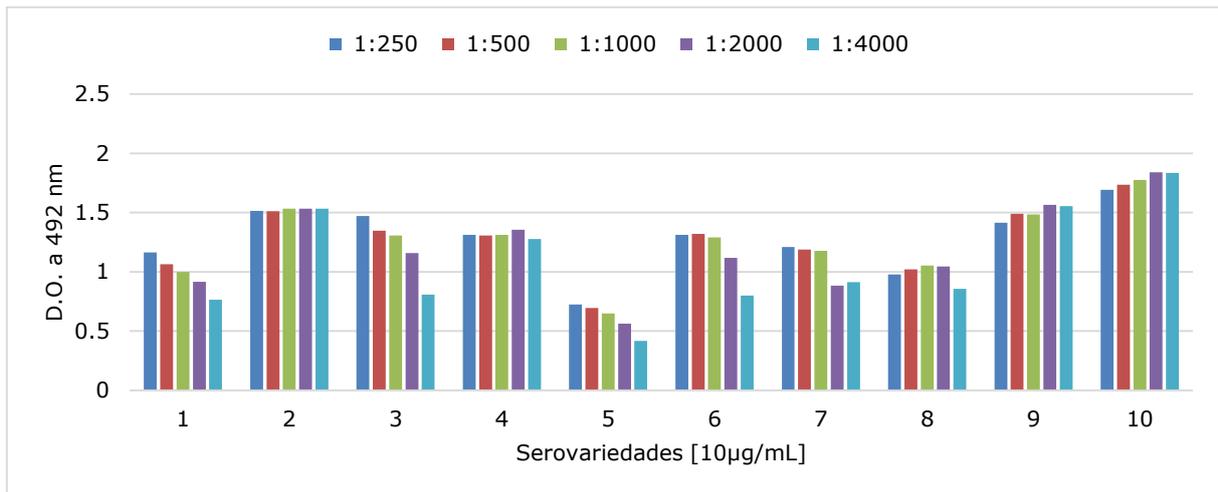


Gráfica 10. ELISA indirecta. Respuesta de los Anti-Ac-Conjugados IgG de conejo, porcino, ratón y humano contra muestras de cada especie.

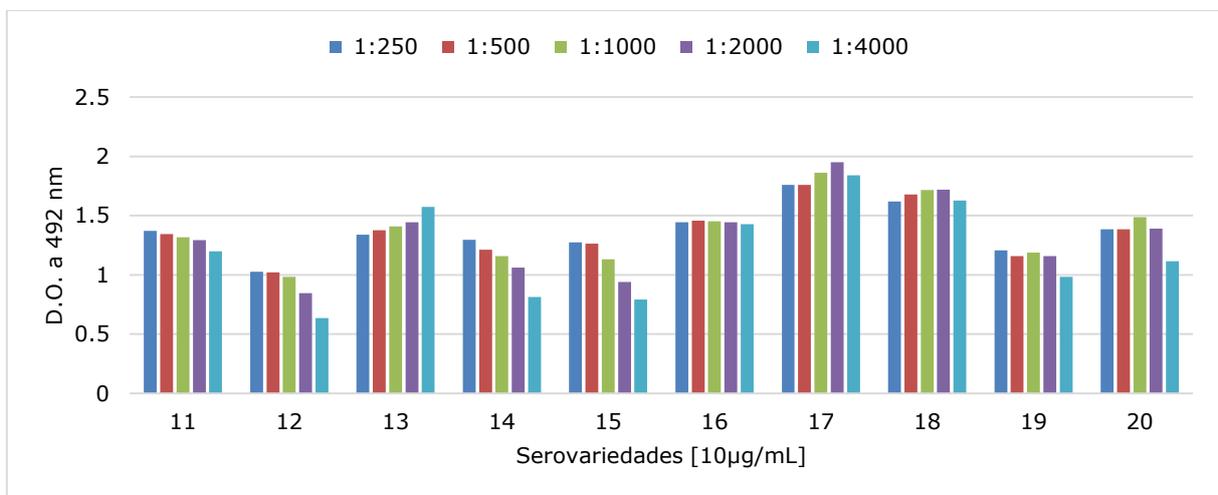
Se observó que ninguna de las muestras supera el 0.2 de D.O. con lo cual se descartó la posibilidad de reacciones cruzadas del anti-anticuerpo conjugado con las muestras, que puedan evitar o interferir con la evidencia de la posible competencia de los anticuerpos por los sitios de unión al antígeno.

7.4.2. Evaluación de la respuesta de anticuerpos policlonales (AcPo) contra 27 serovariedades de *Leptospira spp.*, por ELISA indirecta

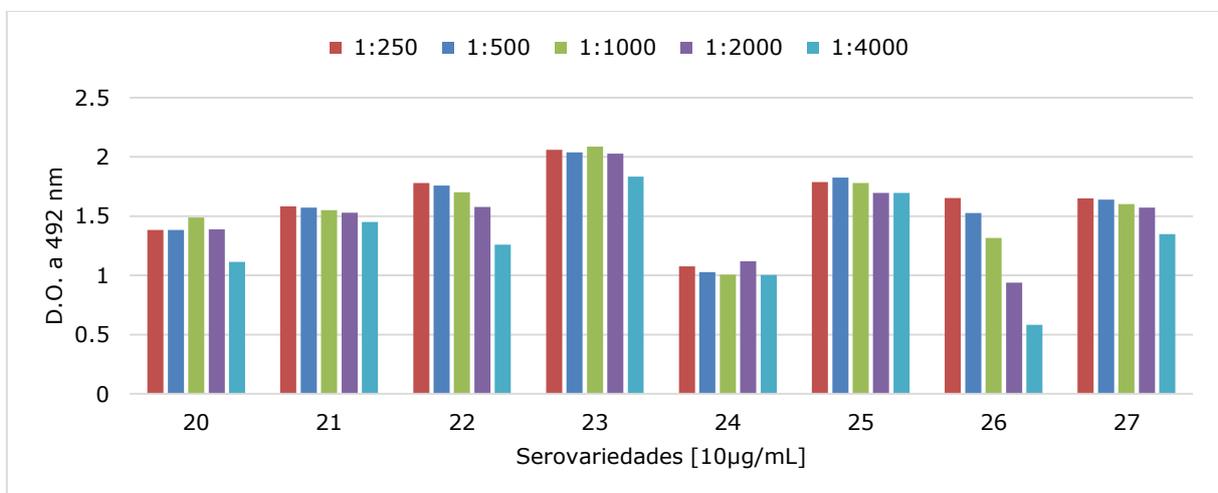
Se evaluó el reconocimiento de anticuerpos policlonales producidos en suero de conejo, los cuales, son específicos a cada serovariedad, para poder determinar un nivel de reconocimiento sin el sistema de captura.



Gráfica 11.1 ELISA indirecta de sueros en diluciones [1:250-1:4000] contra el serovar correspondiente (1-10)



Gráfica 11.2 ELISA indirecta de sueros en diluciones [1:250-1:4000] contra el serovar correspondiente (11-20)



Gráfica 11.3 ELISA indirecta de sueros en diluciones [1:250-1:4000] contra el serovar correspondiente (20-27)

Se tamizo la placa con 200 µL de cada uno de las serovariedades (choque térmico) a una concentración de 10 µg/mL, se bloqueó y posterior a ello, se incubo 24 horas con 200 µL

del suero de conejo correspondiente a cada serovar, se realizaron cinco diluciones con PBS de cada suero, para establecer una dilución de trabajo. Como se ve en las gráficas 11.1-11.3 se observa una respuesta similar de los sueros de conejo (policlonales) con las diferentes diluciones, observando una disminución de la respuesta a partir de la tercera dilución (1:1000).

#### 7.4.3. Evaluación de la competencia del anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra sueros de conejo y sueros de cerdo, ante una serovariedad de *Leptospira spp.*, por ELISA competitiva

Se evaluó un sistema de competencia del AcMo (LTGD7), contra un anticuerpo policlonal AcPo (los cuales fungirá como muestra), así como sueros de cerdo obtenidos de cerdos con leptospirosis. El AcMo (LTGD7) y el anticuerpo presente en el suero de humano y/o cerdo competirán por los sitios de unión de la *Leptospira*. Revelando la unión con un anticuerpo secundario acoplado a una enzima desarrollando color.

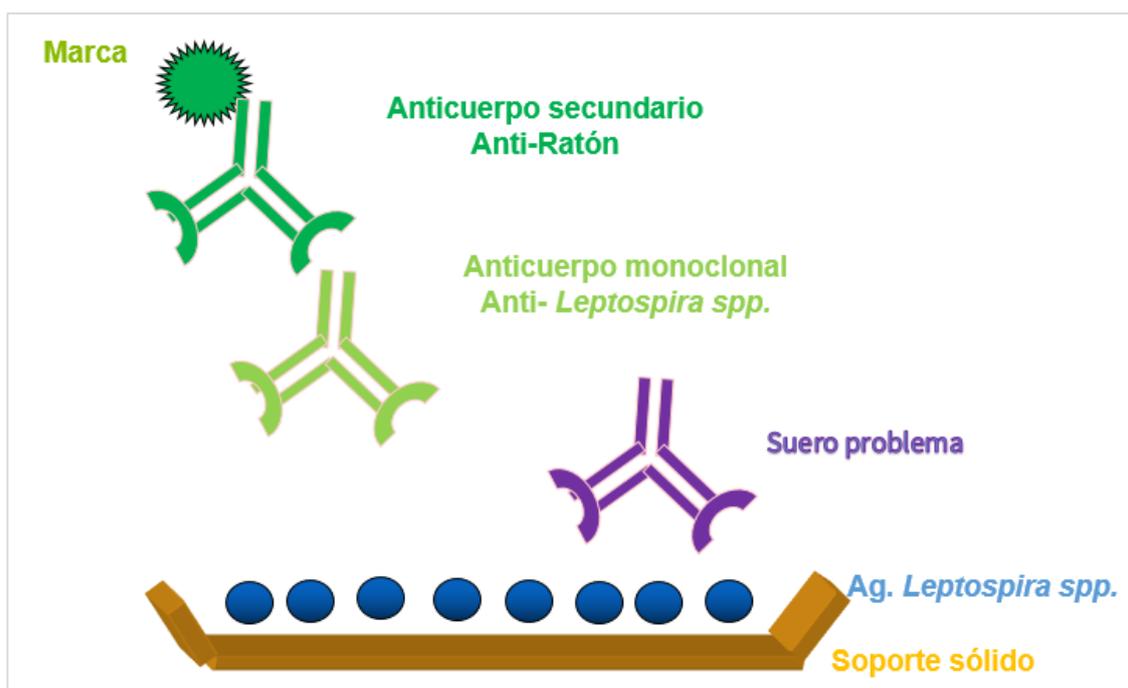
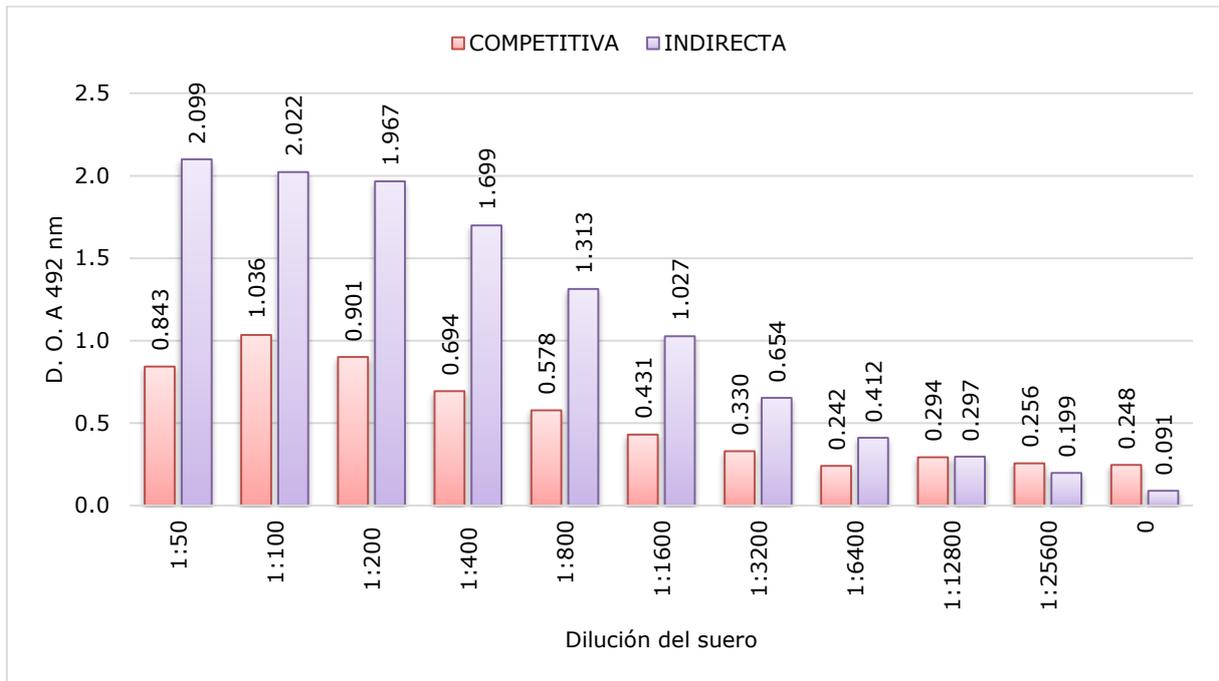


Figura 37. Diagrama de ensayo de ELISA competitiva.

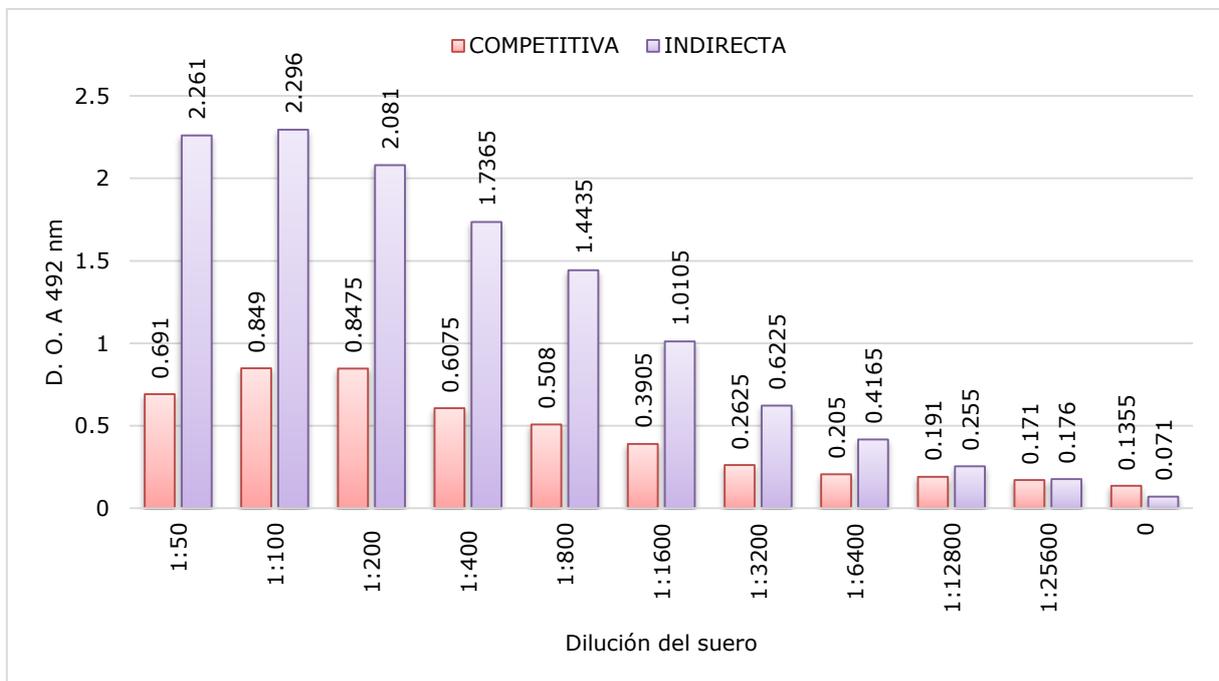
Se evaluó a diferentes concentraciones el antígeno para establecer las condiciones de trabajo, se trabajó con la serovariedad #14, ya que es la que se presenta con mayor frecuencia en animales (Cerqueira et al., 2009). Se propusieron concentraciones de trabajo de 0.625 y 0.325  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del antígeno (serovariedad #14), para reducir los sitios de unión de los anticuerpos, para que fuese más evidente la competencia.

Posterior a ello se realizó el ensayo de competencia con ambos sistemas y con muestras de cerdo y conejo, así como un ensayo de reconocimiento directo con una ELISA indirecta de cada uno de los sueros sin el AcMo (LTGD7), como control.

Se tamizaron las placas con 200  $\mu\text{L}$  del antígeno a las dos concentraciones propuestas, mientras que los sueros se colocaron en diluciones dobles seriadas con PBS-Tween, mientras que el AcMo (LTGD7) se colocó en una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

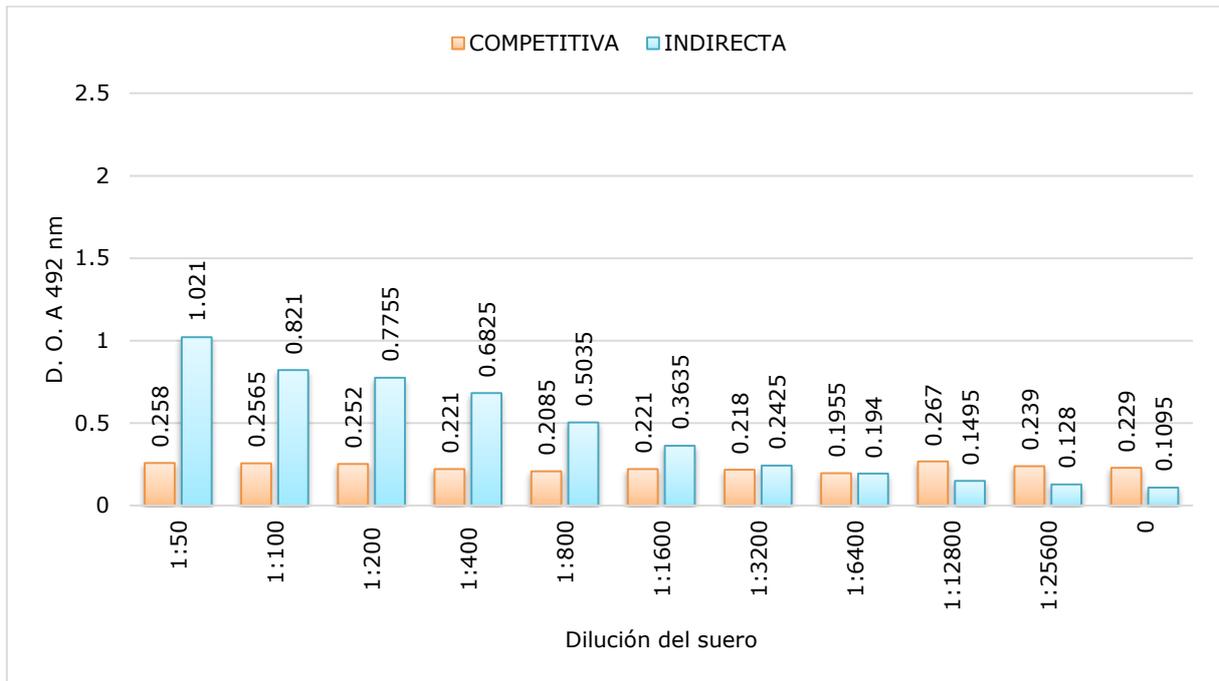


Gráfica 12.1 ELISA competitiva e indirecta PORCINO Ag [0.625 µg/mL]

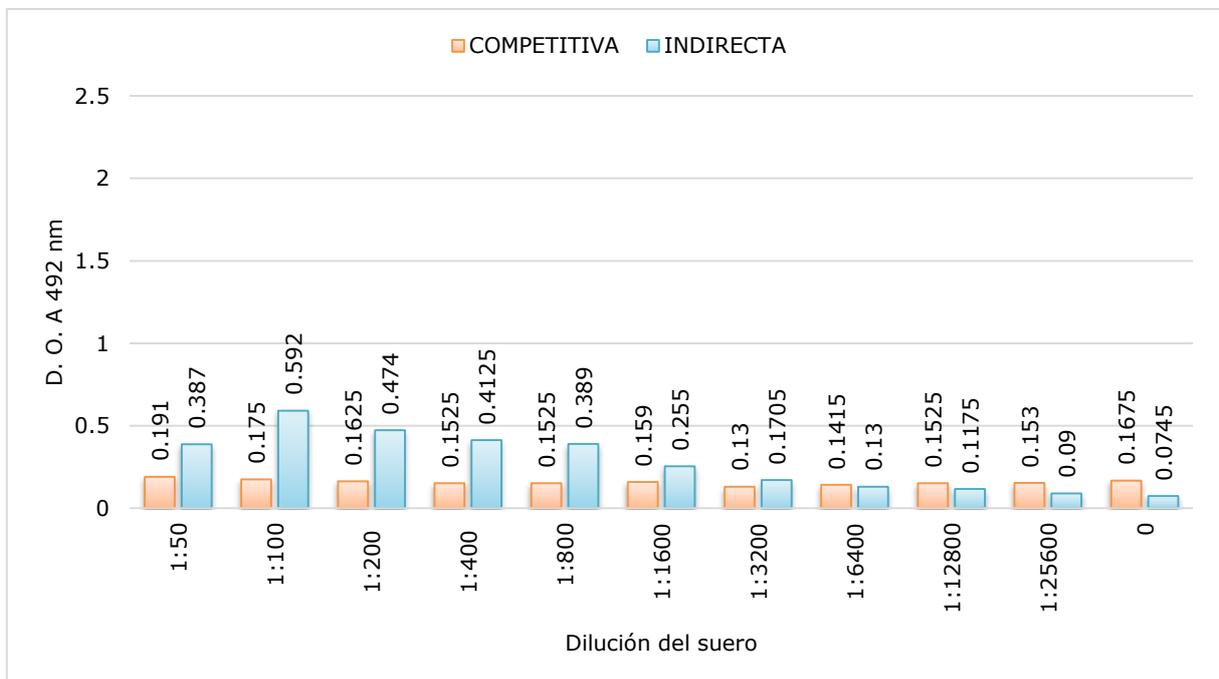


Gráfica 12.2 ELISA competitiva e indirecta PORCINO Ag [0.312 µg/mL]

De acuerdo a las gráficas 12.1. y 12.2., se observa una competencia por los sitios de unión, cuando se trabajó con los sueros en dilución 1:50 y 1:100, sin embargo, este comportamiento no se mantuvo con las demás diluciones, ya que se esperaba que la señal aumentase, en sin embargo esta empezó a disminuir.



Gráfica 13.1 ELISA competitiva e indirecta CONEJO Ag [0.625 µg/mL]



Gráfica 13.2 ELISA competitiva e indirecta CONEJO Ag [0.312 µg/mL]

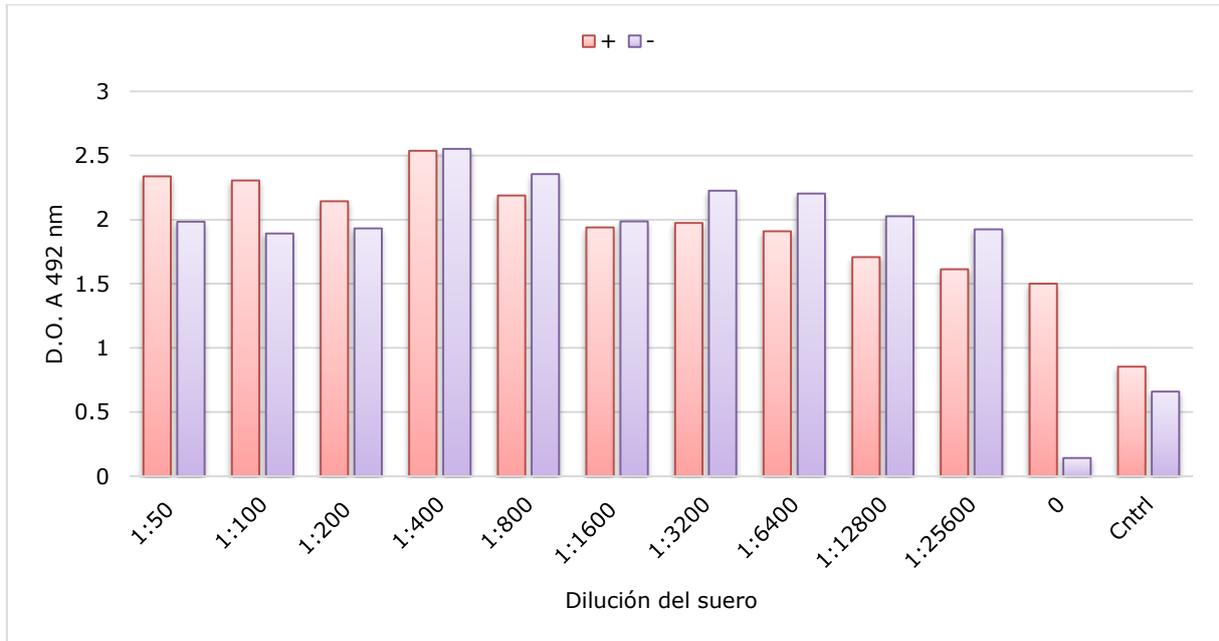
Por otro lado, este comportamiento no se presentó al trabajar con sueros de conejo, esto también puede deberse a que se disminuyó la concentración del antígeno. Adicional a que se trabajó con dos especies diferentes y un solo antígeno.

Por lo cual se agrupó en 3 mezclas al antígeno de acuerdo a la prevalencia, esto no solo para facilitar los siguientes ensayos, sino también para poder establecer un sistema que permitiera la eficiencia, en el diagnóstico. Para evitar los factores observados en los ensayos con sueros de conejo y cerdo, se aumentó la cantidad de antígeno.

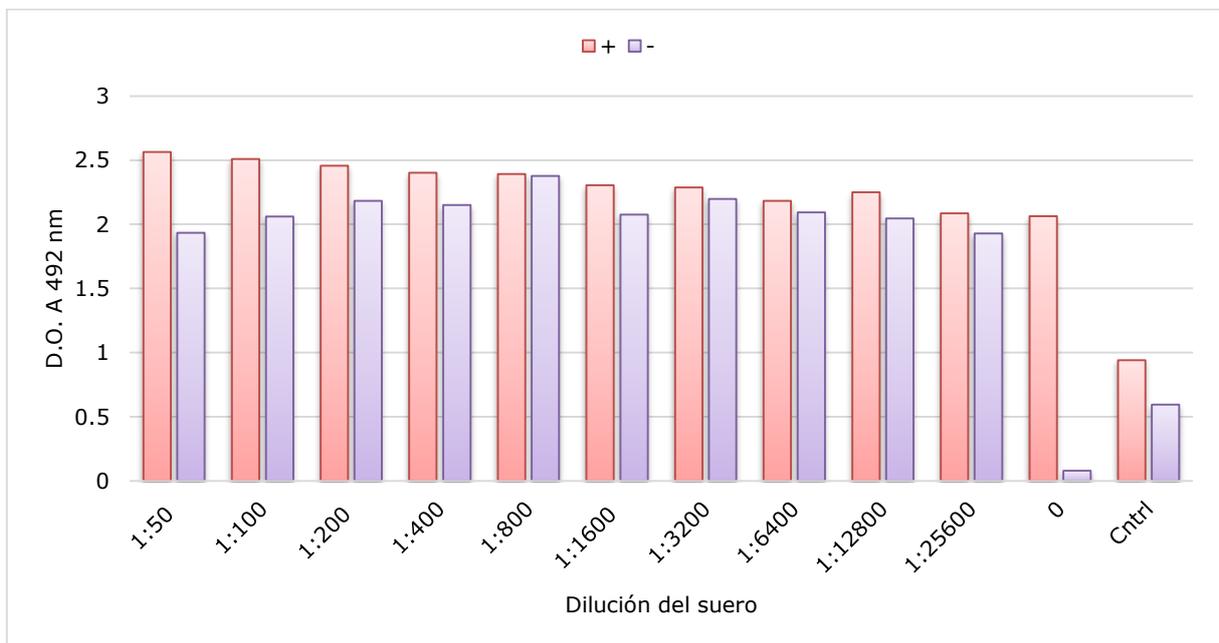
7.4.4. Evaluación de la competencia del anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra sueros de humanos, ante las 27 serovariedades de *Leptospira spp.*, por ELISA competitiva.

Se utilizaron 3 mezclas (A, B y C) de acuerdo a la prevalencia reportada en el InDRE, contra un suero humano positivo y uno negativo.

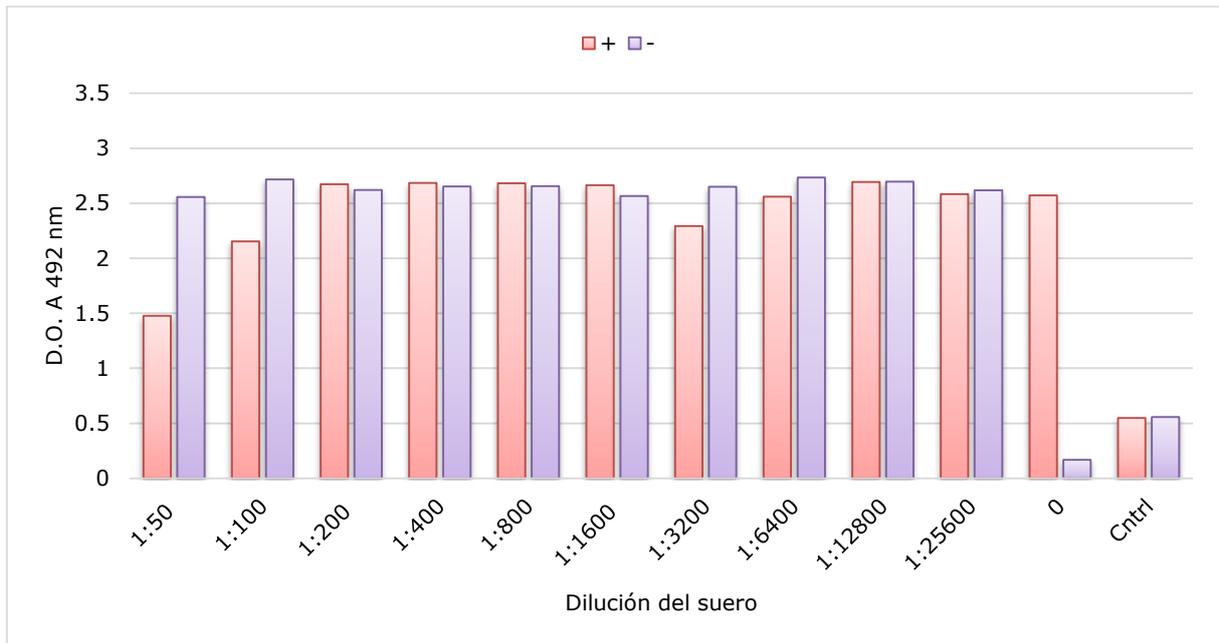
Se tamizaron los pocillos con 200 µL de cada una de las mezclas ajustando a 10µg/mL, los sueros se utilizaron en dilución y el anticuerpo monoclonal se utilizó a 5 µg/mL.



Gráfica 14.1 ELISA competitiva Grupo A Ag [10 µg/mL] con 5 [µg/mL] AcMo



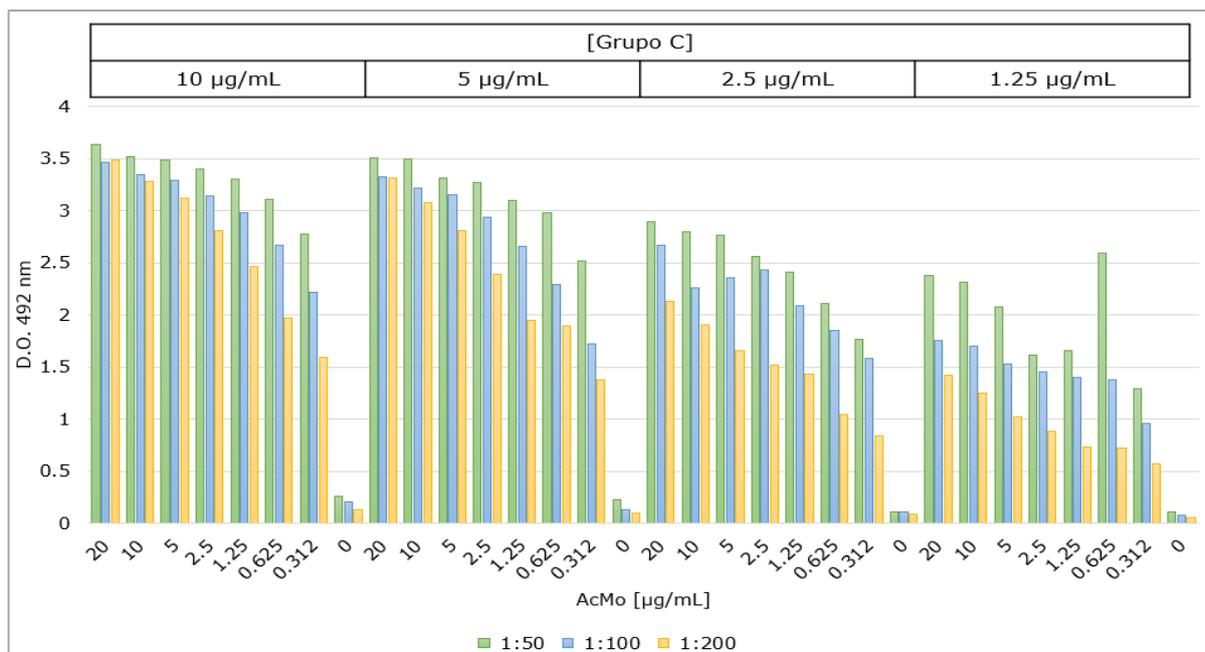
Gráfica 14.2 ELISA competitiva Grupo B Ag [10 µg/mL] con 5 [µg/mL] AcMo



Gráfica 14.3 ELISA competitiva Grupo C Ag [10 µg/mL] con 5 [µg/mL] AcMo

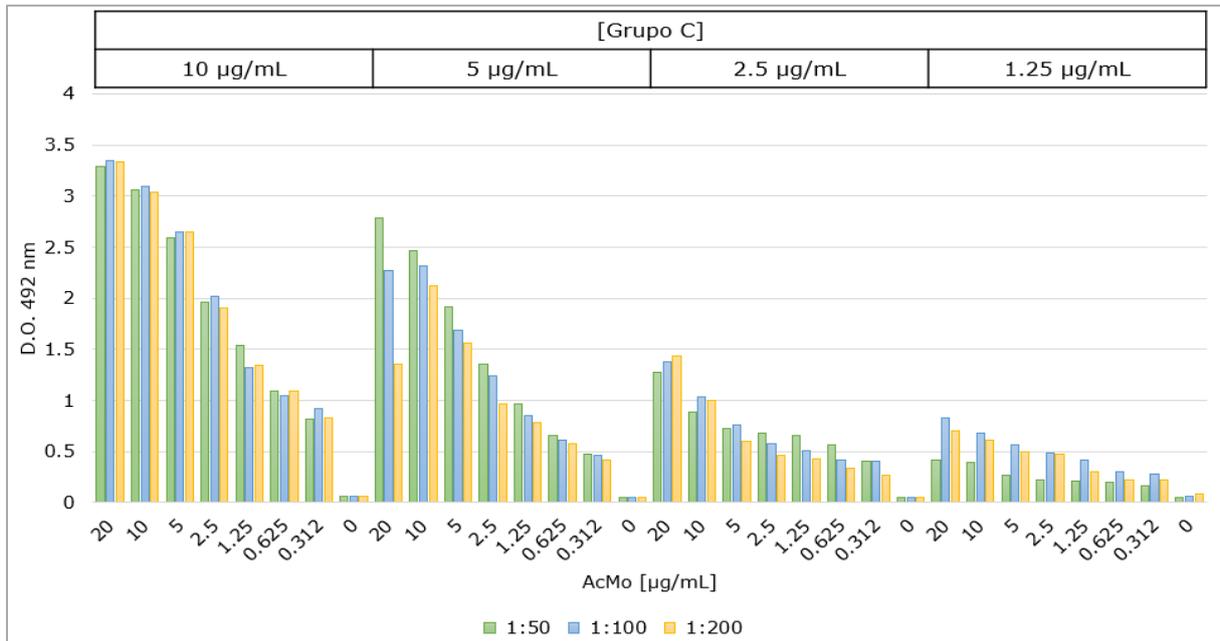
Se observó que solo en el grupo C existía un nivel de competencia, en las primeras diluciones de los sueros (1:50 y 1:100), por lo cual se trabajaron con diferentes concentraciones de trabajo para establecer una que fuese repetible.

Se tamizó con diferentes concentraciones del antígeno (10, 5, 2.5 y 1.25 µg/mL) posterior a ello se colocaron los sueros positivos en tres diluciones diferentes (1:50, 1:100 y 1:200), finalmente se colocó el anticuerpo monoclonal (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.65, 0.312 µg/mL)



Gráfica 15.1 ELISA competitiva con sueros humanos positivos

Se observó que cuando se tiene una concentración de antígeno de 1.25 µg/mL, el suero con una dilución de 1:50 y el anticuerpo a una concentración de 1.25 µg/mL, se observa una competencia.



Gráfica 15.2 ELISA competitiva con sueros negativos

Sin embargo, cuando se trata con sueros negativos, no se presenta este comportamiento. A pesar de que en algunas muestras se presenta este comportamiento la variedad de anticuerpos generados tras una infección en cada muestra humana no permite que se establezca un sistema de competencia para el diagnóstico, por lo tanto, se determinó usar un sistema de captura.

#### 7.5. Evaluación de un sistema de diagnóstico por ELISA de captura con el AcMo (LTGD7), con sueros humanos.

Se propuso evaluar un sistema de captura debido a la gran capacidad de reconocimiento del AcMo (LTGD7) frente a las espiroquetas.

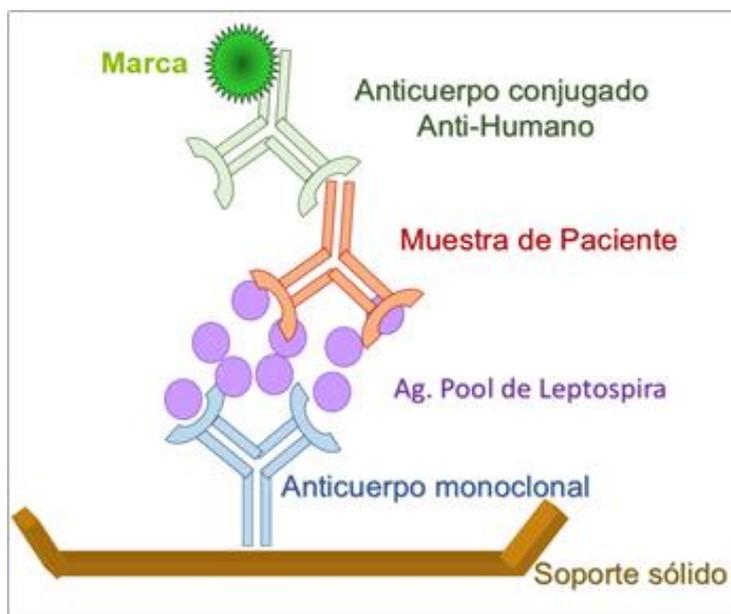
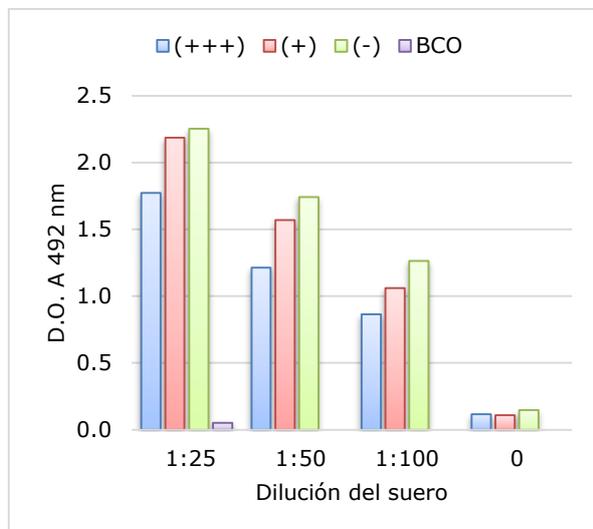


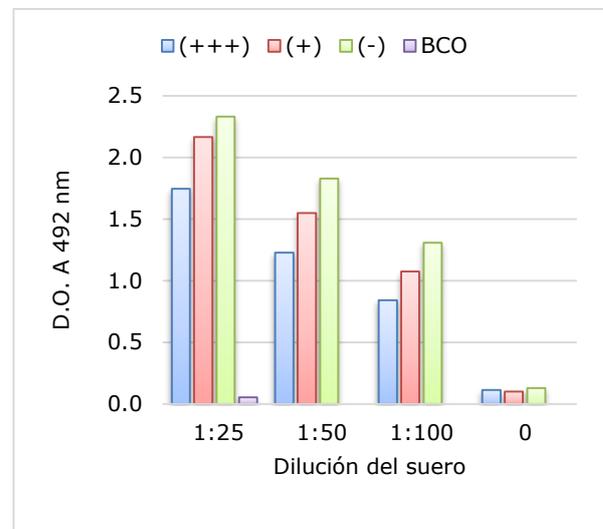
Figura 38. Diagrama de ensayo ELISA de captura.

Se tamizó con 200 µL del anticuerpo monoclonal (LTGD7) en una concentración de 5 µg/mL, posterior a ello se incubó el antígeno (3 grupos de prevalencia y la vacuna) a una

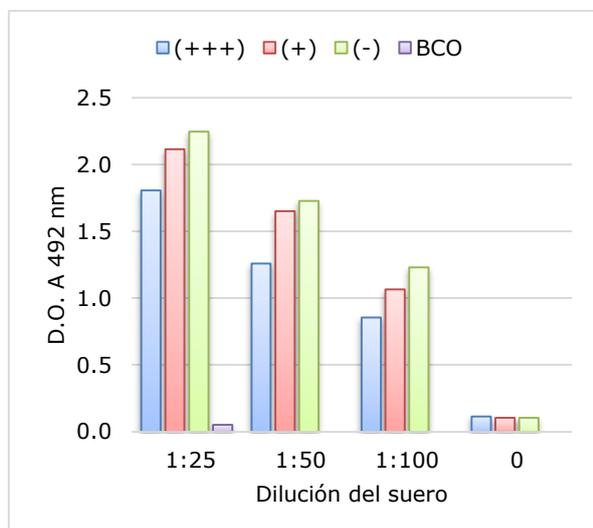
concentración de 10 µg/mL, y finalmente se incubó con sueros humanos agrupados (grupos de 3 sueros) de acuerdo al nivel del título de la prueba MAT: los sueros con mayores títulos (+++) eran las muestras con nivel mayor de anticuerpos, los sueros con títulos medios (+) eran las muestras con anticuerpos con títulos establecidos para ser consideradas muestras positivas, pero con menores títulos y por último muestras negativas (-), así como un blanco como control. La dilución de trabajo de los sueros fue de 1:25-1:100.



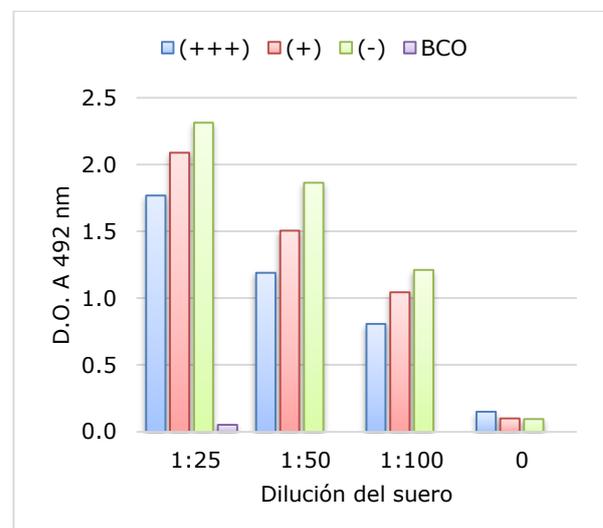
Gráfica 16.1 ELISA de captura Grupo A [10 µg/mL]



Gráfica 16.3 ELISA de captura Grupo C [10 µg/mL]

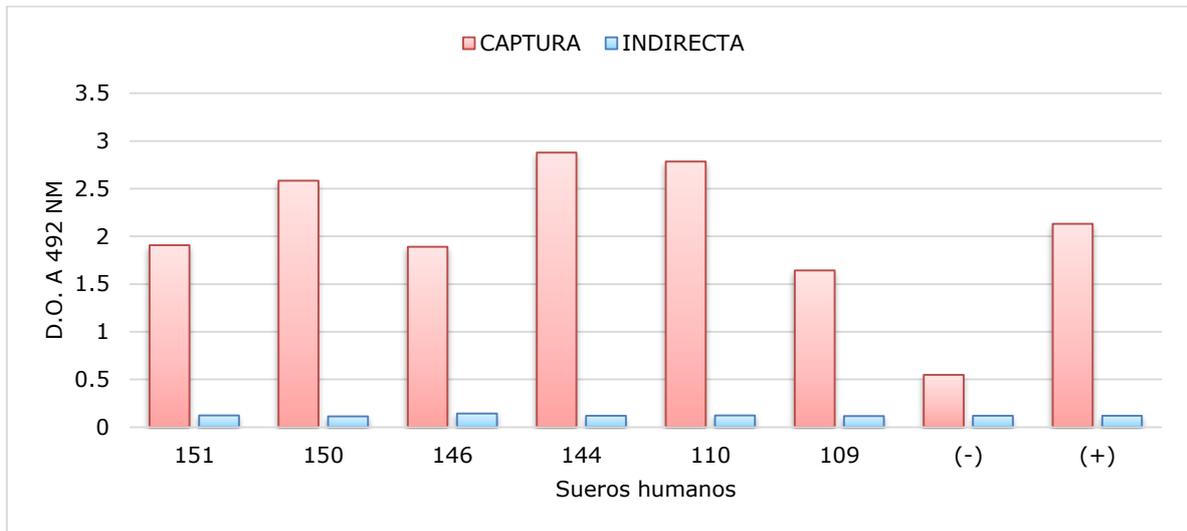


Gráfica 16.2 ELISA de captura Grupo B [10 µg/mL]

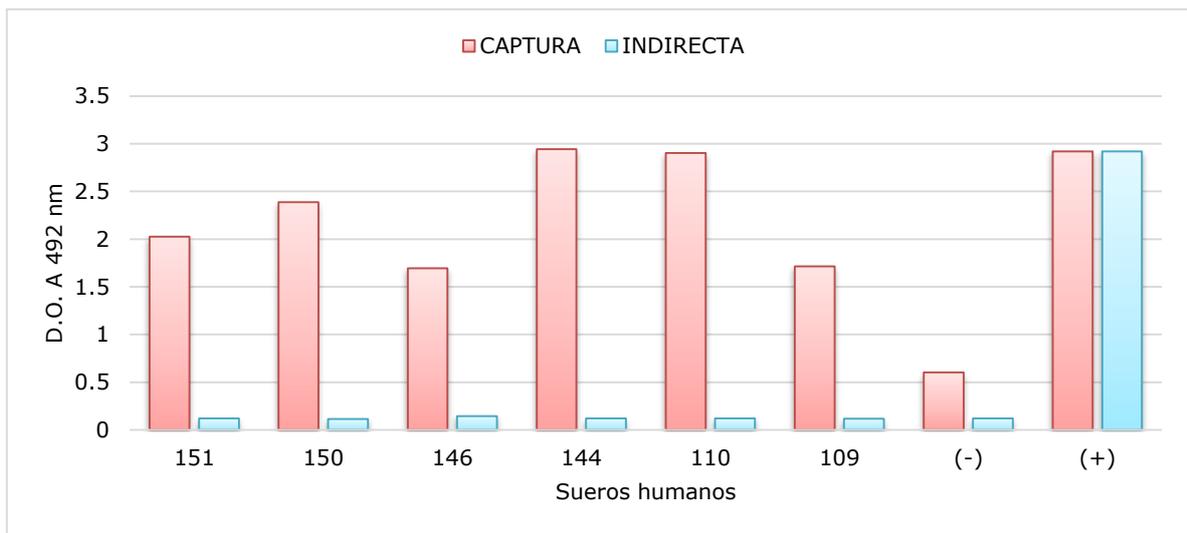


Gráfica 16.4 ELISA de captura Vacuna [10 µg/mL]

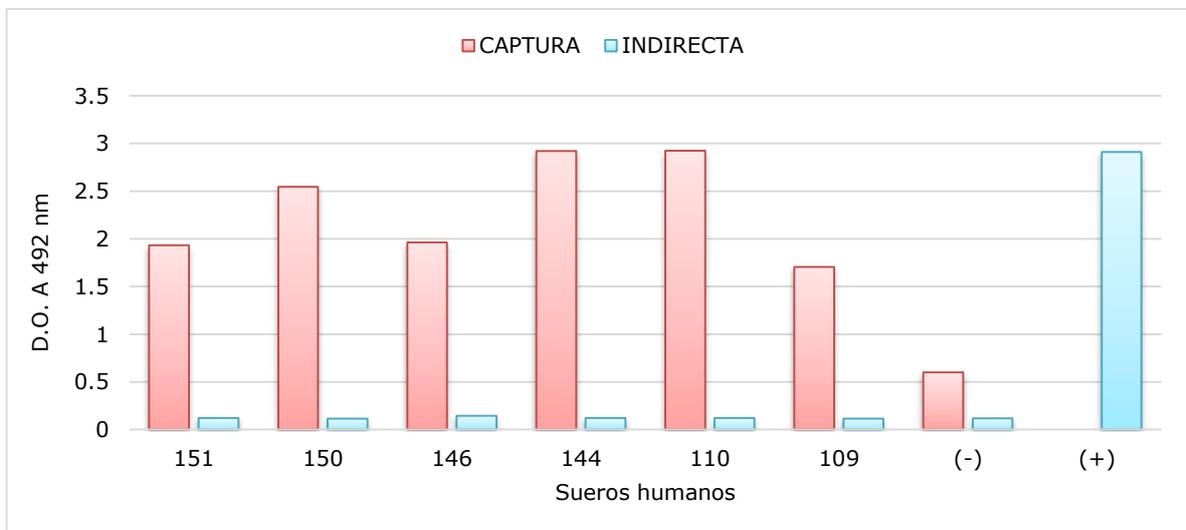
Sin embargo, se observó una respuesta no esperada, es decir los sueros negativos presentaban una absorbancia mayor en comparación con los positivos, por lo cual se repitió el ensayo solo con sueros negativos de forma individual en una dilución 1:50, así como una ELISA indirecta para controlar la reacción, es importante mencionar que, para evitar uniones inespecíficas, se agregó el antígeno y las muestras diluidas en solución de bloqueo (PBS-Tween con leche descremada). Se colocaron controles positivos de los conjugados para la reacción de captura se tamizó con suero de ratón (1:1000) y para la reacción indirecta suero humano (1:4000), mientras que como control negativo se colocó PBS.



Gráfica 17.1 ELISA de captura e indirecto GRUPO A [10 µg/mL] con muestras negativas



Gráfica 17.2 ELISA de captura e indirecto GRUPO B [10 µg/mL] con muestras negativas



Gráfica 17.3 ELISA de captura e indirecto GRUPO C [10 µg/mL] con muestras negativas

Debido a que los ensayos continuaban indicando una respuesta diferente a la esperada, se planteó que se podía deber al tipo de antígeno utilizado, por lo cual se establecieron diferentes métodos de obtención del antígeno.

#### 7.5.1. Evaluación de los antígenos obtenidos por diferentes tratamientos.

Se evaluó por medio de una electroforesis cada uno de los antígenos, para realizar ensayos de ELISA indirecta para evaluar el reconocimiento frente a sueros humanos, así como frente al anticuerpo monoclonal.

##### a) Choque térmico

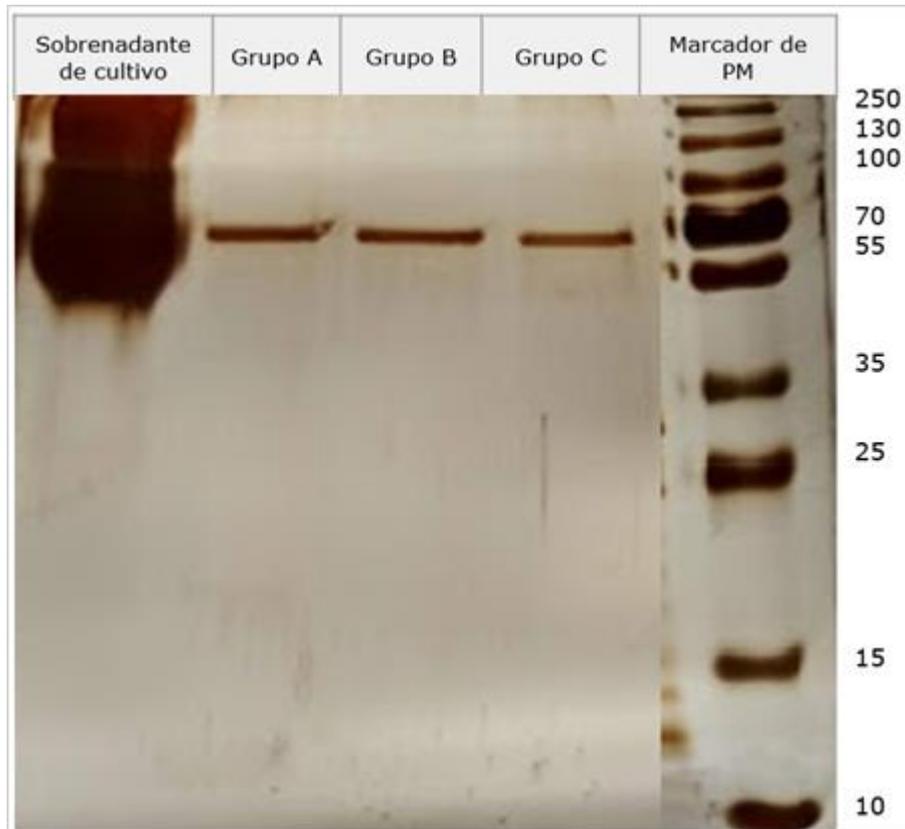


Figura 39. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12%. Tinción nitrato de plata.

Se realizó un gel de electroforesis con tinción de plata (ver anexo I) para evaluar el tratamiento al antígeno obtenido por choque térmico, estos al agruparse en una mezcla de acuerdo a la prevalencia, se observó que en los 3 grupos se observaba una sola banda en un peso de 70 kDa.

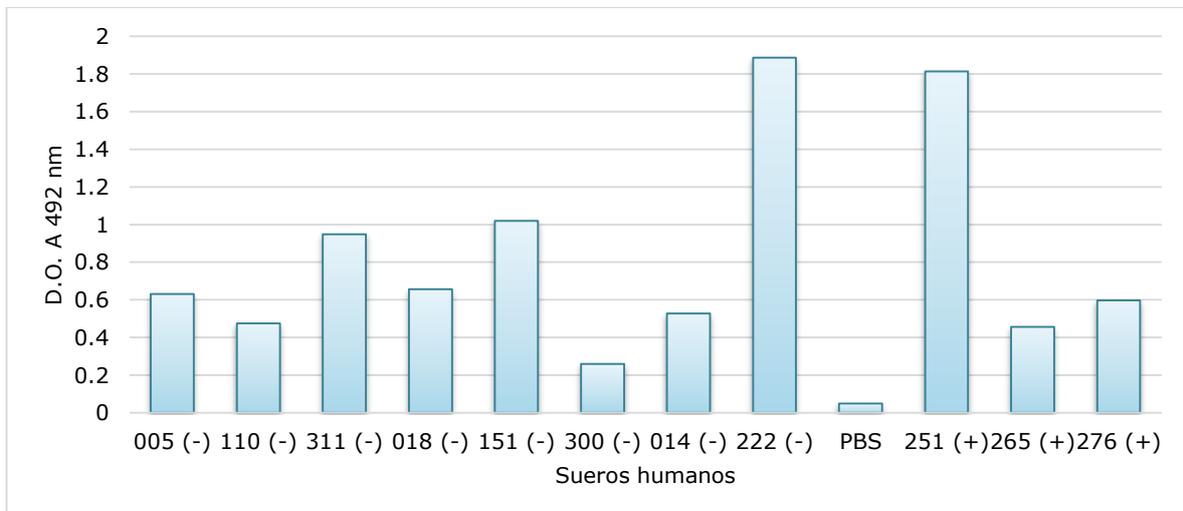
##### b) Sonicación

Se realizó un gel de electroforesis también para el antígeno obtenido por sonicación en donde se observó más una degradación de proteínas, con un clásico patrón de bandeado.



Figura 40. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 10%. Tinción con Coomassie coloidal. Los carriles corresponden a: 1. Sonicado 20 ug ( $\beta$ -mercaptoetanol), 2. Sonicado 10 ug ( $\beta$ -mercaptoetanol), 3. Ag. Sonicado 20 ug, 4. Ag. Sonicado 10 ug, 5. Ag. Choque térmico 10 ug, 6. Sobrenadante de cultivo sin albúmina.

Por lo cual se evaluó el nivel de detección con un ELISA indirecto para observar el comportamiento de los sueros obtenidos por este método, sin embargo se siguió presentando la misma señal no esperada, en la cual los diferentes sueros (1:50) a pesar de ser negativos presentaban una señal de detección y con algunos positivos se presentaba el efecto inverso.



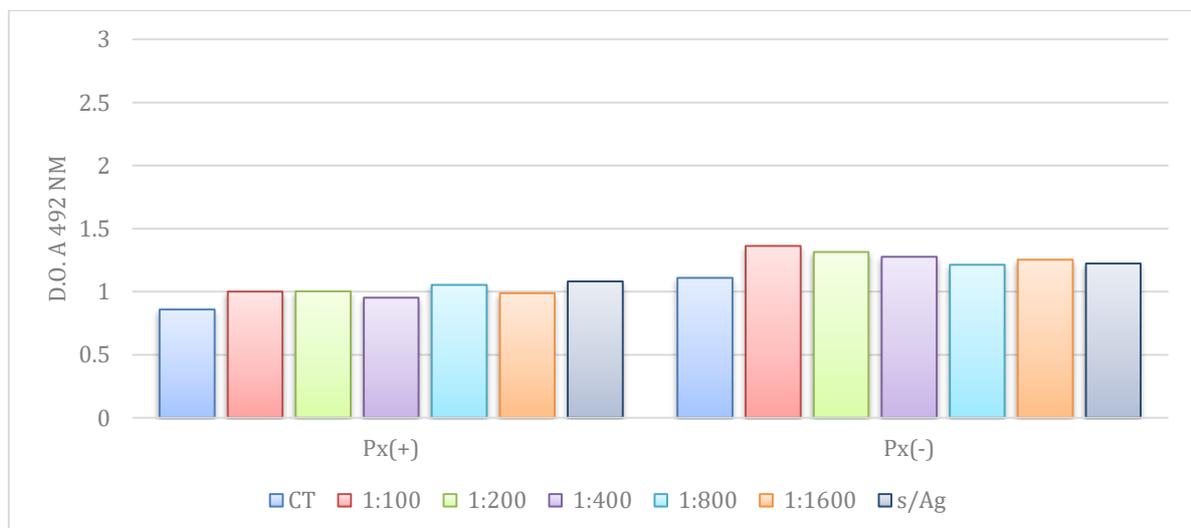
Gráfica 18. ELISA indirecta antígeno sonicado [10  $\mu$ g/mL]

c) Tratamiento con formalina



Figura 41. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 10%. Tinción nitrato de plata.

Debido a la alta concentración del antígeno obtenido con formalina, se realizó una electroforesis a dilución y por medio de una cuantificación de proteínas por el método de Bradford se seleccionó una dilución de trabajo de 1:200. Sin embargo, al observar el gel se decidió a realizar un primo-ensayo con diluciones dobles seriadas del antígeno tratado con formalina 1:100-1:1600.

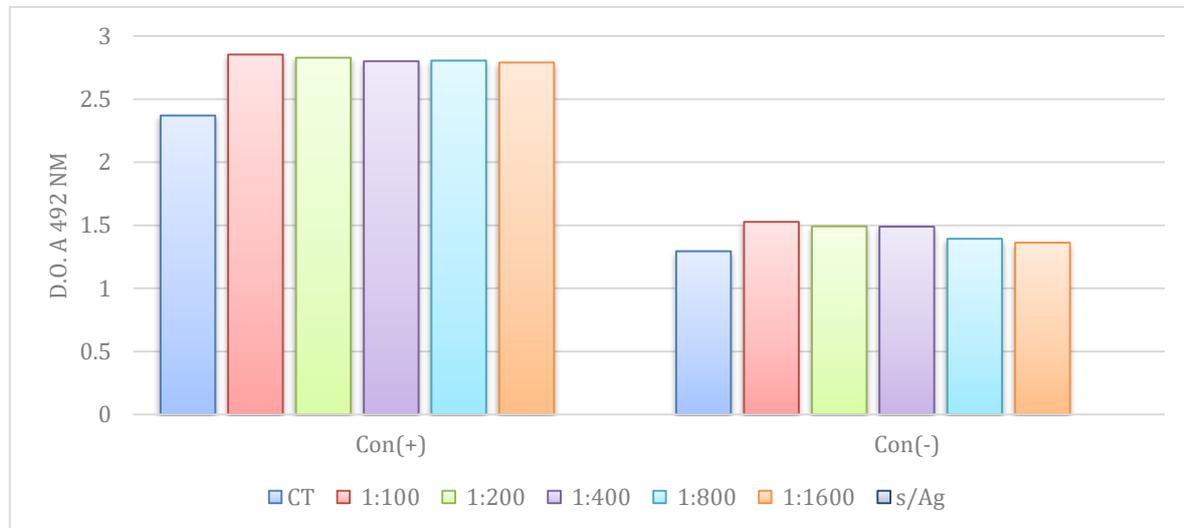


Gráfica 19.1 ELISA de captura con antígeno con formalina (diluciones) y choque térmico. Con sueros humanos

Se tamizó la placa con el AcMo (LTGD7) en una concentración de 10 µg/mL en solución de boratos, posteriormente se colocó el antígeno el de choque térmico (CT) a una concentración de 10 µg/mL y el resultante del tratamiento con formalina en diluciones

diferentes (1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600), se colocó un control sin el antígeno para observar si existía alguna unión inespecífica entre los dos anticuerpos (AcMo y el presente en los sueros), posterior se colocaron los sueros positivos y negativos, y finalmente el conjugado.

Se observó la misma tendencia por lo cual se evaluó un sistema de detección con sueros de conejo.

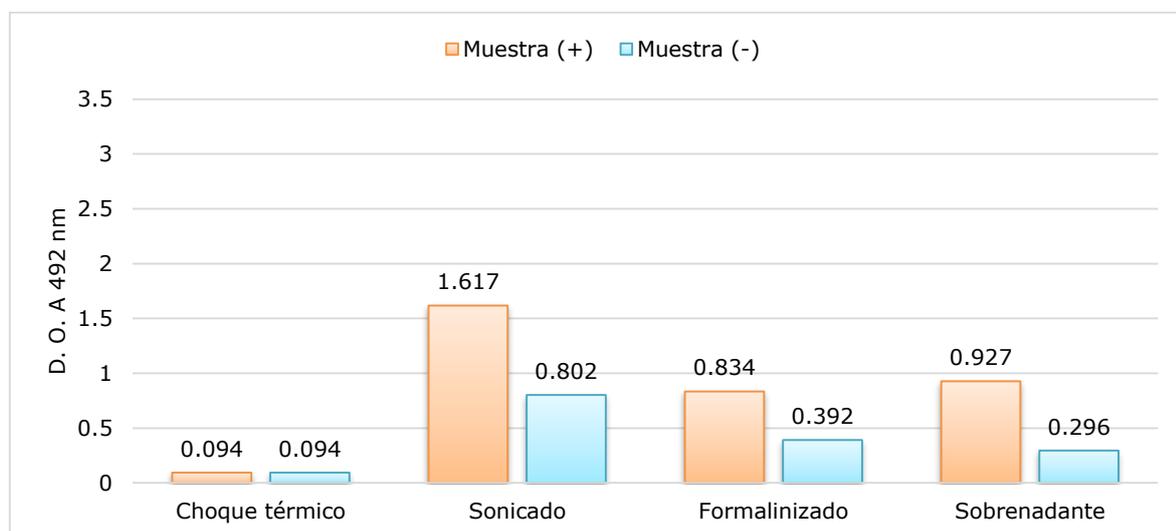


Gráfica 19.2 ELISA de captura con antígeno con formalina (diluciones) y choque térmico. Con sueros de conejo.

En este caso se observó una respuesta esperada, sin embargo, el nivel de reconocimiento en el suero negativo presentaba niveles altos. Cabe resaltar que el sistema con sueros de conejo y con sueros humanos, se realizaron colocando las diluciones del antígeno y de los sueros con solución de bloqueo, para evitar uniones inespecíficas.

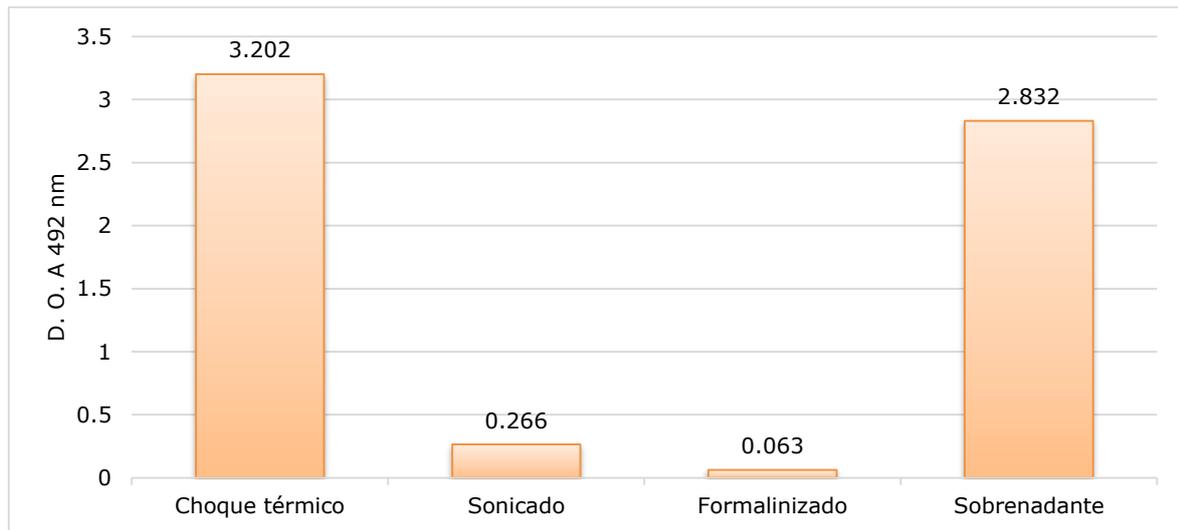
#### 7.5.2. Comparación de los tratamientos de obtención del antígeno para el diagnóstico de ELISA de captura.

Finalmente se recopilaron datos de los 3 métodos de obtención del antígeno, así como un ensayo adicional con sobrenadante de cultivo de las espiroquetas (sin albúmina) de forma comparativa por medio de un ELISA indirecto, en sueros humanos y con el anticuerpo monoclonal (LTGD7).



Gráfica 20.1 ELISA indirecta Comparación de diferentes tratamientos del antígeno contra suero humano.

Adicional se evaluó el reconocimiento individual del AcMo (LTGD7), con los 3 métodos de obtención del antígeno, así como uno adicional del sobrenadante de las *Leptospiras spp.*, por una ELISA indirecta.



Gráfica 20.2 ELISA indirecta Comparación de diferentes tratamientos del antígeno contra el AcMo.

7.6. Evaluación microscópica del reconocimiento del anticuerpo monoclonal (LTGD7) contra *Leptospira spp.* por epifluorescencia y microscopía electrónica.

7.6.1. Observación de *Leptospira spp* con el anticuerpo monoclonal (LTGD7) por epifluorescencia en un inmunoensayo en líquido.

Se realizó un inmunoensayo en líquido como se reporta en la figura 29 de la metodología, en el cual se usaron anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos: anticuerpo-anti-ratón (TRITC) el cual genera un color rojo y anticuerpo-anti-conejo (FITC) el cual genera un color verde, para evaluar al AcMo (LTGD7) y un control con un anticuerpo policlonal de conejo.

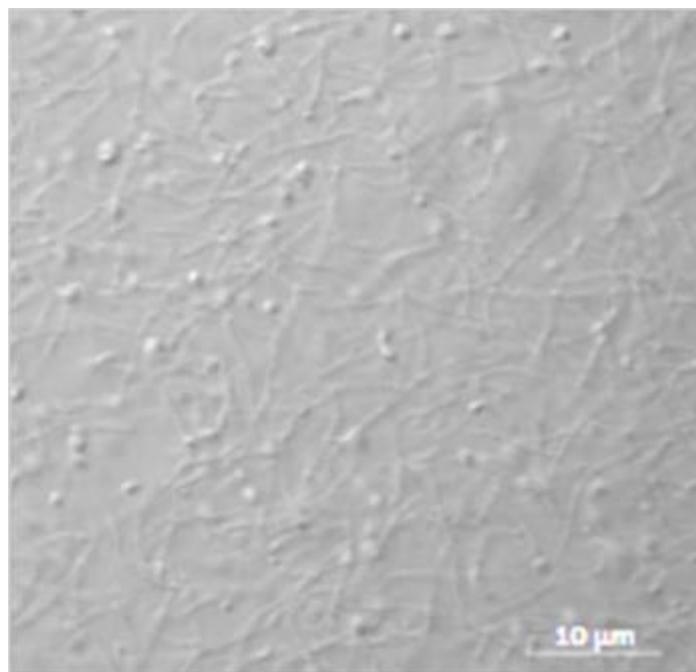


Figura 42. Control blanco de *Leptospira spp.* 63x.

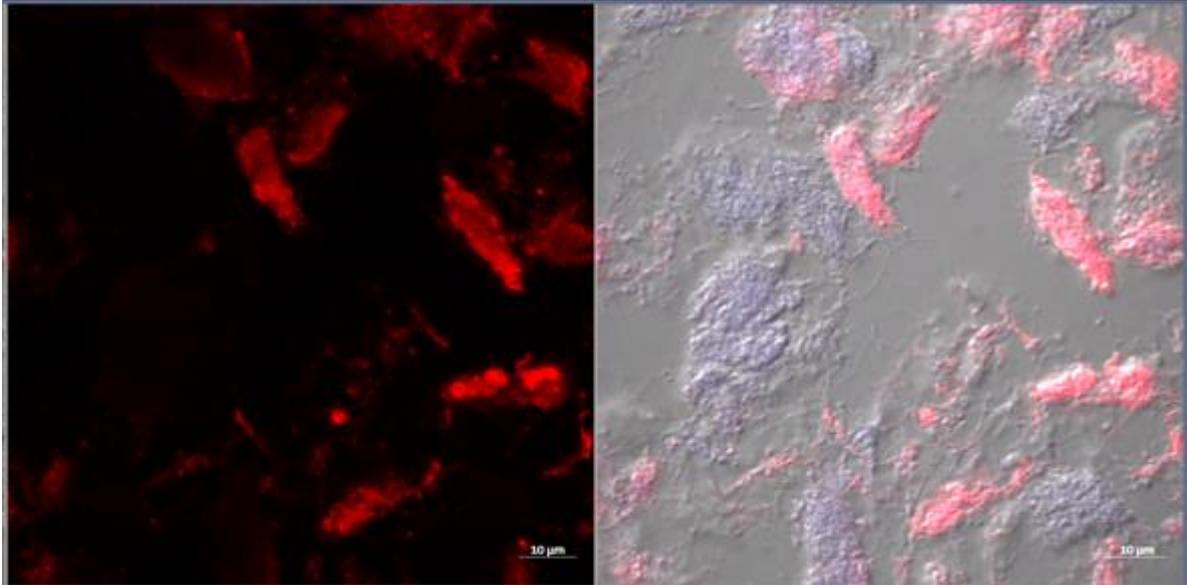


Figura 43. Control positivo (AcPo) con *Leptospira spp.* 10x. TRITC.

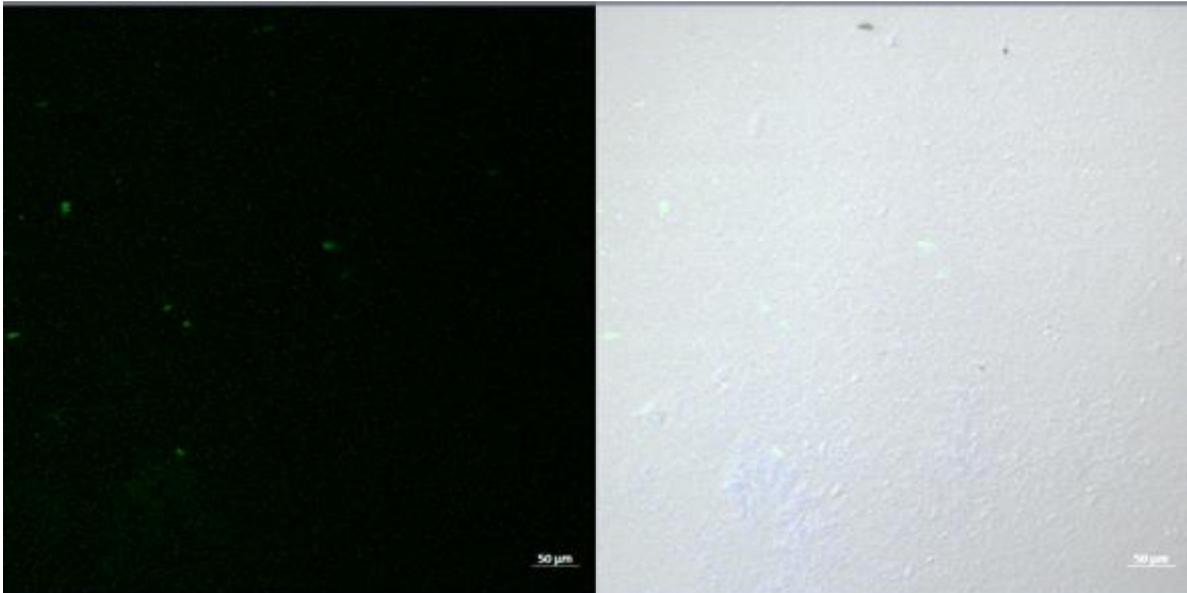


Figura 44. LTGD7 con *Leptospira spp.* 10x. FITC.

#### 7.6.2. Observación de *Leptospira spp* con el anticuerpo monoclonal (LTGD7) por microscopía electrónica.

Se obtuvieron imágenes de microscopía electrónica, en donde se busca observar el acoplamiento de un anticuerpo secundario anti-IgG al AcMo (LTGD7), se colocó suero de conejo (anticuerpo policlonal) como control.

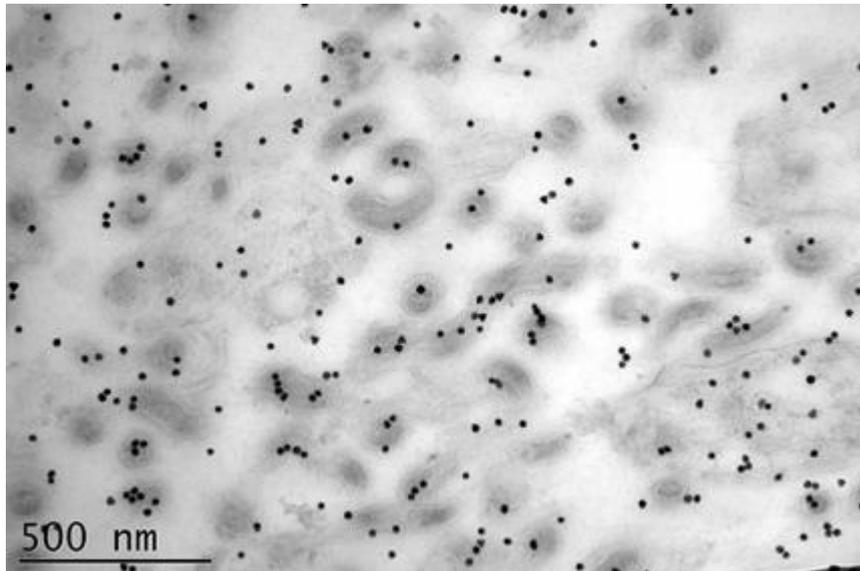


Figura 45. Control positivo con *Leptospira spp.*

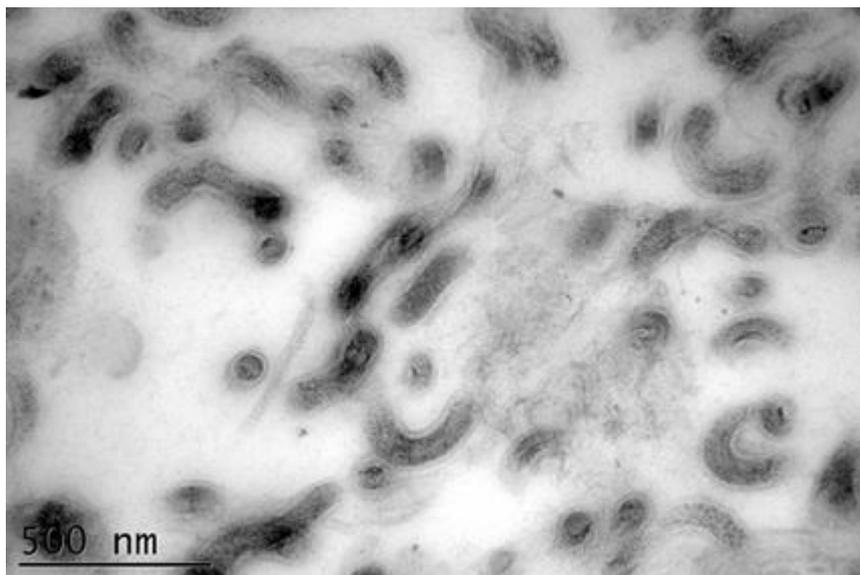


Figura 46. LTGD7 con *Leptospira spp.*

Sin embargo, el ensayo realizado con el AcMo (LTGD7) se descartó como negativo debido a la baja concentración del mismo y a la baja sensibilidad del ensayo por lo cual es necesario obtener una concentración mayor del anticuerpo para poder repetir el ensayo y poder determinar si es un ensayo positivo o negativo.

## 8. Análisis de resultados y discusión.

Se mantuvo en crecimiento *in vitro* un hibridoma, obteniendo un anticuerpo monoclonal (LTGD7) de acuerdo a lo esperado (Hilario, 2010), al obtener células con la morfología deseada, mantener un crecimiento constante, así como una producción de anticuerpos esperada (Manchado et al., 2006). Se evaluó el nivel de reconocimiento frente a las *Leptospira spp.*, al observarse un alto nivel de reconocimiento en el sobrenadante de cultivo (mayor a 0.7 D.O. a 492 nm) se continuo con la purificación para poder aumentar el nivel de respuesta. El anticuerpo ya purificado evidencio un nivel de reconocimiento mayor (al menos 2 D.O.) hacía 27 serovariedades proporcionadas en el InDRE, además se descartó alguna reacción de reconocimiento inespecífico con otras enterobacterias, comunes en el diagnóstico diferencial (Céspedes et al., 2005).

Se establecieron 3 mezclas antigénicas, de acuerdo a la prevalencia de las 27 serovariedades, para poder optimizar la técnica, debido a que el diagnóstico realizado en el InDRE se hace con fines epidemiológicos, aunado a que la optimización del resultado se sugería para disminuir el número de reacciones de trabajo al tener un primer pareo de la muestra y especular que los anticuerpos presentes en la muestra reconocen un tipo de serovariedad (Agudelo et al, 2006).

Se realizó un primer ensayo de ELISA competitiva esperando que el AcMo pudiera reconocer el mismo epítopo que el anticuerpo presente en los sueros. Se evaluaron sueros de conejo (con anticuerpos policlonales), proporcionados por el laboratorio de LERI, estos se obtuvieron a partir de la inmunización con cada serovar, obteniendo títulos altos, con lo cual se podía asimilar a un suero de un paciente positivo, es importante recordar que los títulos para considerar una muestra positiva no son específicos (Cumberland et al, 1999); por lo cual también se obtuvieron sueros de cerdo, productos de una infección (proporcionados por la facultad de veterinaria de la UNAM).

Al observarse una baja competencia en las muestras de conejo, pero una posible competencia en las muestras de cerdo, se observó que la respuesta de los anticuerpos presentes en sueros era variable según la especie, adicionalmente que los sueros de cerdo si eran producto de una inmunización natural, mientras que los de conejo fueron por una inmunización artificial.

Cuando se usaron los sueros humanos se obtuvieron resultados no esperados y/o reproducibles en todas las muestras (títulos altos y títulos bajos), ya que en algunas si se presentó un nivel de competencia, sobre todo en muestras muy concentradas (1:50 y 1:100), sin embargo, si se disminuía la cantidad de AcMo este comportamiento no se presentaba, por lo cual no se pudo establecer un sistema de competencia debido a que no había distinción entre las muestra positivas y negativas sin importar el título determinado por MAT de las muestras positivas, incluso en algunas muestras se observó un efecto de sinergia. La respuesta era diferente de acuerdo a el tipo de muestra, ya que los títulos en muestras humanas se consideran positivos en el InDRE a partir de 1:1280, mientras que las muestras en cerdo presentaron títulos positivos de 1:100, y en los sueros de conejo se presentan títulos de 1:2048. Lo cual establece que la concentración de anticuerpo presentes en las muestras es diferente a pesar de que se traten en las mismas condiciones los sueros, el nivel de anticuerpos es diferente

Por lo cual se continuo con el siguiente sistema propuesto un ELISA de captura, se evaluaron muestras negativas y positivas, provenientes de humano, sin embargo, se obtenía una mayor respuesta en muestras negativas, en contraste con las positivas, por lo cual se optimizó la técnica al aumentar el tiempo de bloqueo e incluso se realizó toda la metodología con solución de bloqueo, sin embargo se seguía presentando un nivel mayor en muestras negativas, por lo cual se modificó el tipo técnica de obtención del antígeno.

Se evaluaron diferentes técnicas de obtención del antígeno de acuerdo lo reportado en la bibliografía, los cuales se evaluaron por ELISA indirecta para determinar el nivel de reconocimiento del AcMo así como de las demás muestras (conejo y humano),

Se propuso someter a la espiroqueta a sonicación, esto debido a que proteínas tales como Lip32 se encuentra presente únicamente en especies patógenas y Lip 41 se encuentra en mayor cantidad resultando de procesos de inmunización artificial, como la vacunación (Baquero et al, 2010), y se asegura su liberación al medio por esta técnica (Velineni S. et al., 2016). La espiroqueta sonicada se evaluó con un ELISA indirecto con los sueros humanos y de conejo, sin embargo, no existía una diferencia entre sueros positivos y negativos, por lo cual se continuó con otro método de obtención.

Se trató a la *Leptospira* con formalina, ya que es de las técnicas más usadas al establecer un sistema de ELISA específico para algún serovar, debido a que se liberan casi todos los componentes proteicos de interés (Bourhy P. et al., 2013).

Sin embargo, solo se observó una reacción que pudiese permitir el diagnóstico cuando se trataba de sueros de conejo, con los sueros de humano, se continuó con la misma respuesta que en el Sistema de ELISA competitiva, es decir, no había una discriminante entre sueros positivos y negativos.

Las muestras de humano son de pacientes enfermos que pueden ser positivas o negativas pero que llegan al InDRE con el fin de diagnosticar una enfermedad y descartar la presencia de otras, mientras que los sueros de conejos son elaborados a partir de una infección controlada con la serovariedad, por lo cual es más específica la respuesta, al igual que los sueros de cerdo. EL CDC estableció un título de 1:200 para definir un caso probable de Leptospirosis, sin embargo, esto es solo para poblaciones donde la exposición es frecuente en áreas endémicas se recomiendan títulos de 1:800 en pacientes sintomáticos. Los títulos que siguen después de la infección aguda generalmente son extremadamente altos 1:25600. (Céspedes, 2005)

Este es uno de los principales problemas al establecer un sistema de detección serológico por medio de una ELISA, además que el diagnóstico se hace en muestras que generalmente son en la primera semana de la infección, donde preferentemente se identifican IgM.

Se realizó un último ensayo para la identificación de los antígenos que detectaba AcMo ya sean superficiales o intracelulares, con el uso de epifluorescencia y microscopía electrónica, se obtuvo una respuesta positiva por epifluorescencia sin embargo debido a la baja sensibilidad del ensayo de la microscopía electrónica con anticuerpos acoplados a oro coloidal se necesita aumentar la concentración del AcMo.

Se evaluaron diferentes métodos que pudieran apoyar en el diagnóstico de la Leptospirosis humana, debido al alto nivel de detección del anticuerpo monoclonal, pero no fue posible generar un método que fuese reproducible. Sin embargo, se observó una respuesta favorable al diagnóstico de la leptospirosis al utilizar sueros de conejo y/o cerdo, lo cual puede permitir una posterior estandarización. Además, los diferentes tipos de antígenos comprueban que el reconocimiento del anticuerpo monoclonal y de los anticuerpos presentes en los sueros era variable, reconociendo diferentes epítomos en algunos casos. Aunado a esto los cerdos al ser hospederos accidentales, son capaces de excretar espiroquetas por meses o años (Torres-Castro, et al., 2016), por lo cual suelen presentar títulos mayores de anticuerpos en contraste con el humano, el cual pese a que también es un hospedero accidental no logra arrojar suficientes leptospiras como para ser además una fuente de transmisión (Ko, et al., 2009).

Finalmente, se esperaba que la microscopia permitiese tener un panorama más amplio para poder establecer el tipo de antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal y establecer un uso de éste con fines específicos.

## 9. Conclusiones.

Se cultivó un hibridoma y se mantuvo en cultivo celular, obteniendo anticuerpo monoclonal (LTGD7) específico que reconociera serovariedades de *Leptospira spp.* Se purificó de acuerdo a la clase y subclase de anticuerpo (IgG2ab), comprobando una pureza adecuada, así como cantidades deseables de anticuerpo monoclonal, suficiente para poder con esto evaluar y estandarizar un sistema de diagnóstico por medio de ELISA (de captura o de competencia).

No fue posible una estandarización de un método de diagnóstico por ELISA competitiva ni de captura, al menos en sueros humanos, por lo cual el anticuerpo monoclonal podría funcionar para un sistema de diagnóstico en otras especies como lo son cerdos o conejos.

## 10. Perspectivas.

El alto nivel de reconocimiento del anticuerpo monoclonal hacia los antígenos presentes puede permitir un uso alternativo útil en otros aspectos importantes de la enfermedad o aspectos fisiológicos de la bacteria. Así como su potencial uso diagnóstico en el diagnóstico de otras especies (cerdos, conejos, perros, etc.).

También se puede sugerir como control de reacción ya que este siempre detectará todas las serovariedades con las que fue probada.

Es importante saber que se puede utilizar con mezclas de antígenos, y esto no disminuye su nivel de respuesta.

## 11. Bibliografía.

- 1) Adler B., Murphy A., Locarnini S. & Faine S.(1980) Detection of Specific Anti-Leptospiral Immunoglobulins M and G in Human Serum by Solid-Phase Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, *Journal of Clinical Microbiology*, 11(5).
- 2) Agudelo P., Restrepo M. & Lotero M.(2006) Evaluación de la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Biomédica*, 26(2).
- 3) Baquero M., Gómez A. & Hernández P.(2010) Aspectos moleculares relevantes de las proteínas de patogenicidad de *Leptospira sp.* *Revista de Medicina Veterinaria*, 19(1).
- 4) Bercovich Z., Taaijke R. & Bokhout B.(1990) Evaluation of an ELISA for the Diagnosis of Experimentally Induced and Naturally Occurring *Leptospira hardjo* Infections in Cattle. *Veterinary Microbiology*, 21(1).
- 5) Bharti A., Nally J., Ricaldi J., Matthias M., Diaz M., Lovett M., Levett P., Gilman R., Wilig M., Gotuzzo E. & Vinetz J.(2003) Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *Infectious Diseases*, 3(1)
- 6) Bona C., Bonilla F.(1990) Textbook of immunology. Amsterdam: Harwood Academic Publisher.
- 7) Bourhy P., Vray M. & Picardeau M.(2013) Evaluation of an in-house ELISA using the intermediate species *Leptospira fainei* for diagnosis of leptospirosis. *Journal of Medical Microbiology*, 63(1).
- 8) Bradford M.(1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1).
- 9) Burth P., Younes M., Gonçalez F., Costa E. & Castro M.(1997) Purification and Characterization of a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase Inhibitor Found in an Endotoxin of *Leptospira Interrogans*. *Infection and Immunity*, 65(4).
- 10) Cerqueira G., McBride A., Picardeau M., Ribeiro S., Moreira A., Morel V., Reis M., Ko A. & Dellagostin O.(2009) Distribution of the leptospiral immunoglobulin-like (Lig) genes in pathogenic *Leptospira* species and application of LigB to typing leptospiral isolates. *Journal of microbiology medical*, 58(1)
- 11) Céspedes M., Glenny M., Felices V., Balda L. & Suárez V.(2002) Prueba de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos IgM para el diagnóstico de leptospirosis humana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(4).
- 12) Céspedes M., Glenny M., Felices V., Balda L. & Suárez V.(2005) Leptospirosis: Enfermedad Zoonótica Emergente. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 22(4).
- 13) Champagne M., Higgins R., Fairbrother J. & Dubreuil D.(1991) Detection and Characterization of Leptospiral Antigens using a Biotin/Avidin Double-antibody Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Immunoblot. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 55(1).
- 14) Cinco M., Balanzin D. & Banfi E.(1992) Evaluation of an Immunoenzimatic Test (ELISA) for the Diagnosis of Leptospirosis in Italy. *European Journal of Epidemiology*, 8(5).
- 15) Cumberland P., Everard C. & Levett P.(1999) Assessment of the efficacy of an IgM-ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61(5)
- 16) Curtis, H., Sue N., Schnek A. & Flores G.(2006) Invitación a la biología, Uruguay: Médica Panamericana.
- 17) Del Brio M. & Riera P.(1995) Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica. Universidad de Oviedo

- 18) Dey S., Madhan C., Senthil T., Ramadass P., Mahalinga A. & Nachimuthu K. (2004) Recombinant LipL32 antigen-based single serum dilution ELISA for detection of canine leptospirosis. *Veterinary Microbiology*, 103(1).
- 19) Dorigatti F., Brunialti M., Romero E., Kallas E. & Salomao R.(2005) *Leptospira interrogans* activation of peripheral blood monocyte glycolipoprotein demonstrated in whole blood by the release of IL-6. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(6).
- 20) Escobar A., Medina Y., Medina E., Carpio J., Mata O., Gavilondo J., Manzo A., (2019) Manual de Taller de Anticuerpos Monoclonares contra Agentes infecciosas y Otras Moléculas. *InDRE*, 58(23)
- 21) Fairbrother J.(1984) Serological Interrelationship of *Leptospira* Serovar and Genus-Specific Antigens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(6).
- 22) Gamundi, M. (2002) Farmacia hospitalaria. *Sociedad Española de Farmacia Española*. 2(1)
- 23) García, A. (2011) Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*. 26(5)
- 24) García R., Reyes A., Basilio D., Ramírez M. & Rivas B.(2013) Leptospirosis; un problema de salud pública. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 60(1).
- 25) Goding J. (1986) Monoclonal antibodies: Principles and practice. *Academic Press* 21(1)
- 26) Guzmán B., Peña S., Flórez R., Amado D., Rodríguez E. & Verjan N.(2016) Prevalencia de anticuerpos anti-*Leptospira spp.* en personas con exposición laboral en el departamento del Tolima. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2).
- 27) Haake D., Chao G., Zuerner R., Barnet J., Barnett D., Mazel M., Matsunaga J., Levett P. & Bolin C.(2000) The Leptospiral Major Outer Membrane Protein LipL32 Is a Lipoprotein Expressed during Mammalian Infection. *American Society for Microbiology*, 68(4)
- 28) Hilario, L. (2010) Producción y caracterización de anticuerpos monoclonales contra *Leptospira spp.* (Tesis de Licenciatura) Universidad Nacional Autónoma de México, México
- 29) IICA, (2017) Oportunidades de las biotecnologías agropecuarias en América central. Honduras.
- 30) Inada R., Ido Y., Hoki R., Kaneko R. & Ito H.(1916). The etiology, mode of infection, and specific therapy of Weil's disease (spirochaetosis icterohaemorrhagica). *The Journal of experimental medicine*, 23(3).
- 31) Kanagavel M., Shanmughapriya S., Aishwarya K., Ponmurugan K., Murugan K., Al-Dhabi N. & Natarajaseenivasan K.(2017) Peptide specific monoclonal antibodies of Leptospiral LigA for acute diagnosis of leptospirosis. *Scientific Reports*, 7(1).
- 32) Kindt, T.J., Goldsby, R.A. & Osborne, B.A.(2007). *Inmunología de Kubly*. McGraw-Hill Interamericana.
- 33) Ko A., Goarant C. & Picardeau M.(2009) *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. *Nature reviews. Microbiology*, 7(10).
- 34) Letocart M., Baranton G. & Perolat P.(2007) Rapid Identification of Pathogenic *Leptospira* Species (*Leptospira interrogans*, *L. borgpetersenii*, and *L. kirschneri*) with Species-Specific DNA Probes Produced by Arbitrarily Primed PCR.*Journal of Clinical Microbiology*, 97(1).
- 35) Manchado N., Téllez G. & Castaño J.(2006) Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Asociación Colombiana de Infectología*, 10(3).
- 36) Mariya R., Chaudhary P., Kumar A., Thangapandian E., Amutha R. & Srivastava S. (2006) Evaluation of a recombinant LipL41 antigen of *Leptospira interrogans* serovar *Canicola* in ELISA for serodiagnosis of bovine Leptospirosis. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 29(1).

- 37) Moreno O., Trujillo C., Cavalcante C. & Torres J.(2015) Diagnóstico y monitoreo de leptospirosis en Latinoamérica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 6(2).
- 38) Nally J., Timoney J. & Stevenson B.(2001) Temperature-Regulated Protein Synthesis by *Leptospira Interrogans*. *American society for microbiology*, 6(1)
- 39) Obregón A., Fernández C., Rodríguez I., Rodríguez Y., Echevarría E., Rodríguez J. & Baños Y.(2013) Detección de anticuerpos IgM contra leptospirosis por un sistema comercial ELISA-IgM. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 65(2).
- 40) Obregón A.(2017) Avances de laboratorio sobre la leptospirosis humana en Cuba, 1989-2016. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3).
- 41) Okuda M., Sakai Y., Matsuuchi M., Oikawa T., Watanabe M., Itamoto K., Iwata H., Kano R., Hasegawa A., Onishi T. & Inokuma H.(2004) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Canine *Leptospira* Antibodies Using Recombinant OmpL1 Protein. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(7).
- 42) Otero A.(2010) Los anticuerpos y su papel como herramientas analíticas en los ensayos inmunoenzimáticos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 62(2).
- 43) Patcharin S., Yuwaporn S., Santi M., Kanchana T., Pongsri T., Pramaun T. & Wanpen C.(2007) Components of Pathogenic *Leptospira* spp. with Potentials for Diagnosis of Human Leptospirosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 25(1).
- 44) Penna B., Marassi C., Libonati H., Narduche L., Lilenbaum W. & Bourhy P.(2017) Diagnostic accuracy of an in-house ELISA using the intermediatespecies *Leptospira fainei* as antigen for diagnosis of acute leptospirosis in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 50(1).
- 45) Pérez Y., Obregón M., Rodríguez I. & Alfonso M.(2015) Actualización en el diagnóstico de la leptospirosis humana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 44(4).
- 46) Picardeau M., Bulach D., Bouchier C., Zuerner R., Zidane N., Wilson P., Creno S., Kuczek E., Bommezzadri S., Davis J., McGrath A., Johnson M., Boursaux-Eude C., Seemann T., Rouy Z., Coppel R., Rood J., Lajus A., Davies J., Médigue C. & Adler B.(2008) Genome Sequence of the Saprophyte *Leptospira Biflexa* Provides Insights into the Evolution of *Leptospira* and the Pathogenesis of Leptospirosis. *PLoS ONE*, 3(2).
- 47) Rojas W. & Cano L.(2001) *Inmunología*. Medellín: Corporación para Investigaciones Biológicas.
- 48) Romero C. & Falconar A.(2016) *Leptospira* spp. y leptospirosis humana. *Salud Uninorte. Barranquilla*, 32(1).
- 49) Seenichamy A., Bahaman A., Mutalib A. & Khairani-Bejo S.(2014) Production and Characterization of a Polyclonal Antibody of Anti-rLipL21-IgG against *Leptospira* for Early Detection of Acute Leptospirosis. *BioMed Research International*, 10(1).
- 50) Seoung Hoon L., Sangduk K., Seung C. & Min Ja K.(2002) Cytotoxic Activities of *Leptospira interrogans* Hemolysin SphH as a Pore-Forming Protein on Mammalian Cells. *Infection and immunity*, 70(1).
- 51) Sharma R., Tuteja U., Khushiramani R., Shukla J. & Batra H.(2008) Application of Monoclonal Antibodies in a Rapid Sandwich Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Identification and Antigen Detection of *Leptospira* Serovars. *Hybridoma*, 27(2).
- 52) Solano A., Boza R. & Sáenz E.(1996) Leptospirosis en humanos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 17(29).
- 53) Suwimonteerabutr J., Chaicumpa W., Saengjaruk P., Tapchaisri P., Chongsa-nguan M., Kalambaheti T., Ramasoota P., Sakolvaree Y. & Virakul P.(2005) Evaluation of a monoclonal antibody-based dot-blot ELISA for detection of *Leptospira* spp in bovine urine samples. *American Journal of Veterinary Research*, 66(5).
- 54) Tahiliani P., Mohan M., Chandu A., Nagaraj C. & Nandi D.(2005) Gel purified lipL32: A prospective antigen for detection of leptospirosis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 51(3).

- 55) Terezinha de Queiroz L., Resende M., De Souza W., Camargos E. & Cota M.(1996) Production and characterization of monoclonal antibodies to the edta extract of *Leptospira interrogans*, serovar *Icterohaemorrhagiae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29(5).
- 56) Torres-Castro, M., Hernández Betancourt, S., Agudelos-Flores, P., Arroyave-Sierra, E., Zavala-Castro, J. & Puerto, F. (2016) Revisión actual de la epidemiología de la leptospirosis. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54 (5)
- 57) Trueba G., Zapata S., Madrid K. & Peñafiel N.(2002) Adaptación de *Leptospira interrogans* (sensu stricto) al agua dulce. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 54(1).
- 58) Vasconellos F., Coutinho M., Da Silva E., Fernandes C., Monte L., Seyffert N., Dellagostin O. & Aleixo J.(2010) Testing different antigen capture ELISA formats for detection of *Leptospira spp.* in human blood serum. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 104(1).
- 59) Velasco O., Rivas B., Espinoza J. & Martínez E.(2007) Diagnóstico de leptospirosis crónica, comparación entre la aglutinación microscópica y 3 técnicas diagnósticas confirmatorias. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 59(1).
- 60) Velineni S. & Timoney J.(2016) Preliminary evaluation of a dual antigen ELISA to distinguish vaccinated from *Leptospira* infected horses. *Veterinary Record*, 179(22).
- 61) Vinh T., Adler B. & Faine S.(1986) Glycolipoprotein Cytotoxin from *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni*. *Journal of General Microbiology* 132(1).
- 62) Widiyanti D., Koizumi N., Fukui T., Muslich L., Segawa T., Villanueva S. & Saito M.(2013) Development of Immunochromatography-Based Methods for Detection of Leptospiral Lipopolysaccharide Antigen in Urine. *Clinical and Vaccine Immunology*. 20(5).
- 63) Leptospirosis humana: guía para el diagnóstico, vigilancia y control / Organización Mundial de la Salud; traducción del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. - Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa –VP/OPS/OMS, 2008.

## 12. Anexos.

### I. Tinción con nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) \*

#### 1. Fijación

- Al finalizar la electroforesis se coloca el gel de poliacrilamida en solución fijadora por 30-45 minutos a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

#### 2. Lavados

- Se realizan 4 lavados de 10 minutos cada uno, los primeros dos con etanol al 20% y los últimos dos con agua tridestilada y desionizada.

#### 3. Tren de Tinción

- Se coloca el gel en una solución con 0.02 g de tiosulfato de sodio (pentahidratado) en 100 mL (.0008 M) por 60 segundos
- Posterior a ello se cambia en agua tridestilada y desionizada por 60 segundos.
- Al finalizar los 60 segundos se coloca en una solución con 0.203 g de nitrato de plata en 100 mL (12mM) por 30-35 minutos.
- Al final se coloca en agua tridestilada y desionizada por 10 segundos.

#### 4. Revelado

- Se coloca en la solución de revelado, cubriendo perfectamente el gel (100 mL aproximadamente, dependiendo del contenedor), hasta que se visualice adecuadamente el marcador de peso molecular y el patrón de bandas de las muestras, cuidando que no se vea o se manche, para detener el revelado se adiciona la misma cantidad de solución de paro, que de revelado
- Posterior a ello se puede dejar el gel en agua tridestilada y desionizada o se puede secar para su conservación.

\*Todos los pasos se realizan en agitación constante. Todas las soluciones se utilizan solo una vez, son preparadas 1 minuto antes de su uso y en protección de la luz. Los contenedores donde se preparen los reactivos y se coloque el gel, no deben tener contacto con sales o detergentes y deben ser previamente lavados únicamente con agua tridestilada y desionizada, se recomienda que sean exclusivos para la técnica.

#### Soluciones.

Todas las soluciones se utilizan solo una vez, son preparadas 1 minuto antes de su uso y en protección de la luz. (excepto el tiosulfato de sodio 0.09M) \*\*

I. Solución fijadora. Se prepara una solución al 30% de etanol, 10% de ácido acético y 60% de agua tridestilada y desionizada.

II. Solución de revelado. Se pesan 3 g de carbonato de sodio y se disuelven en 100 mL de agua tridestilada y desionizada se mantienen a 4°C hasta el momento de su uso, al momento de usarla se adicionan 250  $\mu\text{L}$  de formaldehído al 37% y 125  $\mu\text{L}$  de tiosulfato de sodio al 0.09M\*\*

III. Solución de paro. Se pesan 4 g de TRIS base y se disuelven en 100 mL de agua tridestilada y desionizada y se agregan 2 mL de ácido acético.

\*\* (Se puede preparar un stock con 0.15 g de tiosulfato de sodio pentahidratado en 6.25 mL de agua tridestilada y desionizada)