

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Caracterización de un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína de superficie de merozoito 45 de *Babesia bigemina*

TESIS

Que como parte de los requisitos para
obtener el Grado de

Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta

Sergio Mc Daniel Cárdenas Rodríguez

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Codirigido por:

M. en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui

Querétaro, Qro. A septiembre 2020



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



Caracterización de un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína de superficie de merozoito 45 de *Babesia bigemina*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta

Sergio Mc Daniel Cárdenas Rodríguez

Dirigido por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Codirigido por

M. en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui

Sinodales

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

Presidente


Firma

M. en C. Miguel Mercado Uriostegui

Secretario


Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gamez

Vocal


Firma

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Vocal


Firma

MSPAS. Alejandro Enríquez Vázquez

Vocal


Firma

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Septiembre, 2020
México

RESUMEN

La babesiosis bovina es una enfermedad transmitida por parásitos intracelulares del género *Babesia*. En México las especies presentes son *B. bigemina* y *B. bovis*, las cuales son transmitidas por garrapatas del género *Rhipicephalus*. La enfermedad en los animales ocasiona anemia, hemoglobinuria, debilidad, ictericia y la muerte. El 80% del inventario nacional de bovinos se encuentra en zonas endémicas de la garrapata. La detección temprana de la enfermedad es necesaria para su control, por lo tanto, herramientas de diagnóstico como los anticuerpos monoclonales son necesarias. El objetivo de este trabajo fue la caracterización de un anticuerpo monoclonal contra la proteína GP-45 de *Babesia bigemina*, así como su producción en un medio de cultivo libre de suero fetal bovino (SFB). Hibridomas de ratón, productores de un anticuerpo monoclonal, fueron descongelados y mantenidos *in vitro*. Los hibridomas fueron adaptados a un medio libre de SFB. Para esto, cada 7 días se redujo 1% de SFB al medio de cultivo empezando en un 10% hasta alcanzar un 0% de SFB. Los sobrenadantes de la adaptación fueron colectados periódicamente y evaluados por ELISA indirecta con antígeno crudo para detectar la presencia de anticuerpos. Los sobrenadantes de cultivo con 10, 7, 5, 3, 2 y 1% de SFB fueron evaluados por ELISA indirecta con péptido lineal de GP-45. Se realizaron inmunofluorescencias con los sobrenadantes de cultivo para observar el patrón de tinción logrado con el anticuerpo monoclonal. En todos los procedimientos se utilizó el sobrenadante de cultivo sin diluir. Hasta el día 15 después de la descongelación, los hibridomas comenzaron a crecer homogéneamente y se mantuvieron con crecimiento constante sin perjudicar el desarrollo de las células. Se observó una mayor señal en la prueba de ELISA con el antígeno crudo que con el péptido lineal. En las inmunofluorescencias el anticuerpo monoclonal se une a estructuras semejantes a la *Babesia*. Sin embargo, no presentó el mismo patrón de tinción, comparado con el control positivo. Se concluye que el anticuerpo monoclonal evaluado puede ser obtenido en medio libre de SFB y que, aunque requiere mayor caracterización, puede ser utilizado para pruebas diagnósticas para la babesiosis bovina causada por *B. bigemina*.

Palabras clave: *Babesia bigemina*, anticuerpo monoclonal, GP-45, ELISA.

ABSTRACT

Bovine babesiosis is a disease transmitted by intracellular parasites of the genus *Babesia*. In Mexico the species present are *B. bigemina* and *B. bovis*, which are transmitted by ticks of the genus *Rhipicephalus*. Animal disease causes anemia, hemoglobinuria, weakness, jaundice and death. 80% of national beef inventory is found in areas endemic to the tick. Early detection of the disease is necessary for its control, therefore diagnostic tools such as monoclonal antibodies are necessary. The objective of this work was the characterization of a monoclonal antibody against the GP-45 protein of *Babesia bigemina*, as well as its production in a culture medium free of bovine fetal serum (BFS). Mouse hybridomas, producing a monoclonal antibody, were thawed and kept *in vitro*. Hybridomas were adapted to an BFS-free environment. For this, every 7 days 1% BFS was reduced to the culture medium starting at 10% to 0% BFS. The adaptation supernatants were collected periodically and evaluated by indirect ELISA with raw antigen to detect the presence of antibodies. Culture supernatants with 10, 7, 5, 3, 2 and 1% BFS were evaluated by indirect ELISA with GP-45 linear peptide. Immunofluorescences were performed with culture supernatants to observe the staining pattern achieved with the monoclonal antibody. Undiluted culture supernatant was used in all procedures. Until day 15 after thawing, the hybridomas began to grow homogeneously and remained constantly growing without impairing cell development. A higher signal was observed in the ELISA test with the raw antigen than with linear peptide. In immunofluorescences, the monoclonal antibody is linked to Structures similar to *Babesia*. However, it did not have the same staining pattern, compared to positive control. It is concluded that the monoclonal antibody evaluated can be obtained in BFS-free medium and, although it requires greater characterization, it can be used for diagnostic tests for bovine babesiosis caused by *B. bigemina*.

DEDICATORIAS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, por haber sido desde hace 8 años el pilar fundamental para mi desarrollo personal y profesional.

A la Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia y a todos los profesores de los que tuve el honor de ser alumno.

Al Laboratorio de Inmunología y Vacunas de la Universidad Autónoma de Querétaro, junto con todos sus integrantes; por darme la oportunidad de tener donde realizar este proyecto de tesis y haberme proporcionado conocimiento invaluable para mi desarrollo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito por todo el apoyo y confianza que me ha proporcionado a lo largo de la licenciatura.

Al MCBM Miguel Ángel Mercado Uriostegui por haberme confiado espacio y tiempo para apoyarme en mis experimentos.

A mis padres, sin ellos no podría haber llegado tan lejos como lo estoy ahora.

A Rosa Vargas, por todo el optimismo y apoyo que me has dado a lo largo de estos últimos años, sin ti, me hubiera perdido hace tiempo atrás.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Definición.....	3
2.2 Ciclo de vida.....	3
2.3 Taxonomía.....	6
2.4 Importancia económica	7
2.5 Métodos de diagnóstico.....	10
2.5.1 Frotis sanguíneos.....	10
2.5.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	11
2.5.3 Inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)	11
2.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	14
2.5.5 Amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP).....	15
2.6 Anticuerpos monoclonales	17
III. HIPÓTESIS	20
IV. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo general	20
4.2 Objetivos específicos.....	20
V. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	21
5.1 Adaptación de hibridomas a medio libre de proteínas	21
5.1.1 Protocolo para el descongelamiento de hibridomas	22

5.1.2 Protocolo para el congelamiento de hibridomas.....	22
5.2 Purificación de antígeno crudo	23
5.2.1 Protocolo para la purificación de antígeno crudo de <i>B. bigemina</i>	23
5.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	24
5.4 Inmunoensayo ligado a enzima	25
5.4.1 Protocolo para el inmunoensayo ligado a enzima indirecto	26
5.5 Evaluación del anticuerpo monoclonal mediante inmunofluorescencia indirecta	27
5.5.1 Protocolo de inmunofluorescencia indirecta	29
VI. DISCUSIÓN	30
VII. CONCLUSIÓN.....	33
VIII. BIBLIOGRAFÍA	34
IX. APÉNDICES	43
9.1 Reactivos	43
9.2 Material.....	44
9.3 Equipos	46
9.4 Soluciones.....	46

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tipos de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)	12
Cuadro 2. Métodos de diagnóstico para la babesiosis bovina	16
Cuadro 3. Cronograma del mantenimiento de los hibridomas en cultivo durante los primeros 24 días.	22

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Babesia bigemina</i>	5
Figura 2. Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata <i>Boophilus spp (Rhipicephalus spp)</i>	10
Figura 3. Tipos de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).....	13
Figura 4. Hibridomas de ratón productores de un anticuerpo monoclonal	21
Figura 5. Cuantificación de antígeno crudo por el método de Bradford.....	24
Figura 6. Inmunoensayo ligado a enzima indirecto con antígeno crudo.....	25
Figura 7. Inmunoensayo ligado a enzima indirecto con péptido lineal de GP-45.	26
Figura 8. Inmunofluorescencia indirecta sin DAPI	27
Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta	28

I. INTRODUCCIÓN

La babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios intraeritrocitarios del género *Babesia* que es transmitida por garrapatas. Las especies más comunes que afectan el ganado bovino son *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*, siendo las dos primeras endémicas de México (Gohil et al., 2013).

Se estima que la población total de bovinos es de 34.8 millones de cabezas de ganado, de las cuáles 4.3 millones se encuentran en el estado de Veracruz. 3.2 millones en Jalisco y 2.5 en el estado de Chiapas (SIAP-SADER, 2019), y a nivel mundial, 1,300 millones de bovinos están en riesgo de padecer la enfermedad (Friedman & Yakubu, 2014) alcanzando pérdidas económicas de hasta 10,000 millones de dólares anualmente, incluyendo, además de la babesiosis, las pérdidas ocasionadas por la anaplasmosis bovina (Rojas et al., 2018).

La enfermedad se caracteriza por ocasionar signos clínicos como fiebre (41 -42 °C), anemia hemolítica, hemoglobinuria, ictericia, deshidratación, temores musculares, debilidad, taquicardia, postración y, en algunos casos, la muerte del animal entre los 8 y 14 días después de la infestación por garrapatas (Almazán et al., 2018; Saad & Shuai, 2015; Suárez & Noh, 2011).

Las parasitemias causadas por *Babesia bigemina* suelen superar el 10%, llegando a alcanzar el 30%. Los signos notables de las infecciones por *B. bigemina* son fiebre, hemoglobinuria y anemia (OIE, 2018).

Babesia bovis tiene la cualidad de desarrollar signos nerviosos en los animales afectados, tales como ataxia, convulsiones, hiperestesia, parálisis y coma en los momentos antes de la muerte; esto ocurre debido al secuestro de parásitos en los capilares cerebrales (Almazán et al., 2018; Suárez & Noh, 2011).

Los métodos de diagnóstico más comunes para la enfermedad son el uso de frotis sanguíneos que se basan en la identificación de los protozoarios con ayuda de un microscopio; la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los ensayos de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) que detectan la

presencia de anticuerpos contra el parásito en el suero de los animales (Mosqueda et al., 2012).

Existen pruebas moleculares para la detección de la enfermedad en el hospedero. Son pruebas sensibles, que detectan la presencia del protozoario en la muestra que generalmente es sangre. La más usada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), la cual es un método que amplifica una región muy corta del genoma de la babesia (Mosqueda et al., 2012).

No obstante, estos métodos diagnósticos enfrentan dificultades, ya sea debido a la lentitud del proceso y la posibilidad de arrojar falsos negativos (extendidos sanguíneos); o por su dificultad para realizar la prueba a un lote de animales (IFI); las pruebas moleculares al ser muy sensibles tienen la peculiaridad de ser costosas cuando se requieren aplicar a un gran número de animales. Por su parte, las pruebas de ELISA indirecta pueden evaluar a un gran número de animales al mismo tiempo, pero tienen la desventaja de no poder discriminar fácilmente entre un animal infectado, uno recientemente recuperado o por una respuesta vacunal contra el protozoario (Mosqueda et al., 2012; OIE, 2018).

Los anticuerpos monoclonales (mAbs, por su siglas en inglés) son moléculas producidas en laboratorio capaces de reconocer un epítipo específico de un antígeno (Posner et al., 2019; Bayer et al., 2019). La obtención de anticuerpos monoclonales requiere la fusión de dos líneas celulares: células plasmáticas productoras de anticuerpos y células de un mieloma inmortal sin la capacidad de producir anticuerpos (Hanack, Messerschmidt, & Listek, 2016).

Al ser moléculas producidas en laboratorio, los anticuerpos monoclonales deben ser puestos a prueba para rectificar el reconocimiento del antígeno para el cual fueron creados; el objetivo de este trabajo es caracterizar un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína de superficie de merozoito 45 (GP-45) de *Babesia bigemina*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Definición

La babesiosis bovina es causada por protozoarios apicomplexos intraeritrocíticos del género *Babesia* y es transmitida por garrapatas; también se le conoce como piroplasmosis, fiebre de Texas o fiebre de la garrapata (Rojas et al., 2018; Almazán et al., 2018; (Friedman & Yakubu, 2014; Gohil et al., 2013). Las especies de *Babesia* que afectan a los bovinos son *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens*, siendo esta última endémica del continente europeo (Saad & Shuai, 2015; Hoch et al., 2012).

La presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* se encuentra asociada a garrapatas del género *Rhipicephalus* (anteriormente conocido como *Boophilus*) en el continente americano, donde existen las especies *R. microplus* y *R. annulatus* (Lohmeyer et al., 2011; Morel et al., 2019), y que son de mayor importancia en el ganado vacuno en México (Almazán et al., 2018).

La enfermedad fue primeramente descrita por Viktor Babes en 1888, quien encontró microorganismos redondos dentro de los eritrocitos de bovinos que padecían hemoglobinuria y lo que en su momento se le conocía como “fiebre de agua roja”. No obstante, Babes fue incapaz de reportar la presencia de garrapatas en los animales infectados y fue hasta 1893 que Smith y Kilborne demostraron la transmisión por garrapatas *Boophilus (Rhipicephalus) annulatus* del microorganismo recién llamado *Piroplasma*, de aquí que a esta enfermedad se le conozca como piroplasmosis en la actualidad (Mosqueda et al., 2012; Uilenberg, 2006).

2.2 Ciclo de vida

La *Babesia* ha desarrollado mecanismos para garantizar su supervivencia y perpetuación entre sus hospederos: vertebrado (bovinos) e invertebrado (garrapata); esto se asegura mediante la combinación de una fase sexual y una fase asexual. El ciclo de vida de *Babesia* sigue el desarrollo común del filo Apicomplexa, que incluye tres fases consecutivas: merogonia, gametogonia y esporogonia (Jalovecka et al., 2019).

El ciclo de vida inicia cuando una garrapata infectada con babesia se alimenta de sangre de un bovino sano, aquí los esporozoitos son inyectados a través de la saliva de la

garrapata al torrente sanguíneo del hospedero vertebrado, donde estos ingresan a los eritrocitos del bovino en la sangre. El esporozoito se diferencia a trofozoito (una célula redonda), que pierde sus organelos de invasión, después se reproduce por fisión binaria formando células hijas, conocidas como merozoitos. Los merozoitos se forman en pares y se produce su salida del eritrocito mediante la lisis del mismo para invadir a un nuevo eritrocito; en este momento termina la fase de merogonia (Jalovecka et al., 2019; Gohil et al., 2013; Mosqueda et al., 2012).

El desarrollo de “pre-gametocitos” ocurre en el torrente sanguíneo a partir de merozoitos; estos son necesarios para la infección de la garrapata; este estadio solo puede observarse mediante microscopía electrónica (Jalovecka et al., 2019; Jalovecka et al., 2016; Chauvin et al., 2009). Según Chauvin et al. (2009), la garrapata se infecta al consumir sangre de un bovino con babesiosis, la sangre se digiere en el intestino del artrópodo y libera los parásitos; únicamente los pre-gametocitos son capaces de sobrevivir y terminar su diferenciación en gametocitos, estos últimos también son conocidos como cuerpos radiados o *Strahlenkörper*.

La fusión de dos gametocitos ocurre en la luz del intestino de la garrapata, formando un cigoto el cual tiene un organelo en forma de púa la para ingresar a las células intestinales de la garrapata en el intestino medio. El cigoto se divide mediante meiosis para formar quinetos poliploides en las células intestinales. Los quinetos salen por medio de lisis para dirigirse a la hemolinfa y diseminarse en los tejidos de la garrapata (Jalovecka et al., 2019; Mosqueda et al., 2012; Chauvin et al., 2009).

Algunos quinetos migran a los ovarios, donde penetran en los huevos, infectando la futura generación de garrapatas, resultando en una transmisión transovárica, cuando la garrapata ovoposita, su progenie se encuentra infectada con babesia (Jalovecka et al., 2019; Suárez, Alzán, & Cooke, 2019; Mosqueda et al., 2012).

La transmisión en el hospedero vertebrado ocurre cuando las larvas de garrapata se alimentan de sangre. En ese momento los quinetos migran a las glándulas salivales de las larvas formando esporoblastos. Cada esporoblasto se diferencia en miles de esporozoitos que

serán transmitidos por la saliva de la larva, cerrando así el ciclo de vida de *Babesia* (Suárez, Alzán, & Cooke, 2019; Mosqueda, et al., 2012).

Ciclo de vida de *Babesia bigemina*

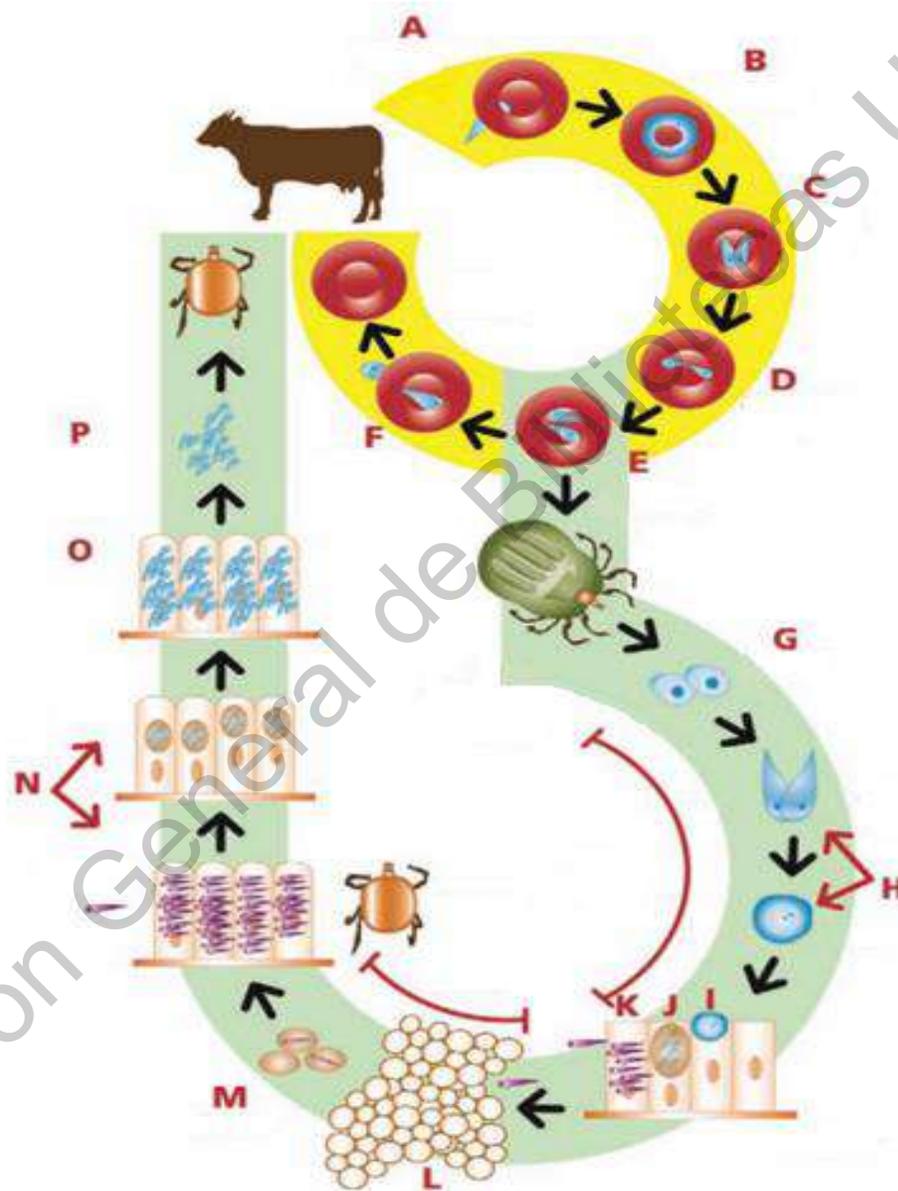


Figura 1. Ciclo de vida de *Babesia bigemina*. A) Esporozoitos invaden un eritrocito y se transforma en un trofozoito. B) Trofozoito en forma de anillo. C) Mediante fisión binaria, de cada trofozoito dos merozoitos son formados. D) Los merozoitos se encuentran inicialmente unidos semejando un par de peras en un ángulo agudo. E) Los merozoitos maduros se separan antes de salir del eritrocito. F) Los merozoitos son liberados del eritrocito. Algunos volverán

a infectar eritrocitos para formar nuevos trofozoitos, mientras que otros serán consumidos por una garrapata para continuar con su ciclo de vida en el invertebrado. G) Estadíos sexuales son liberados de los eritrocitos y se transforman en gametocitos. H) Los gametocitos se diferencian en gametos hembras y machos que forman un cigoto después de su fusión. I) El cigoto se desarrolla en su forma infectiva para ingresar a las células intestinales de la garrapata. J) Cuerpos de fisión son formados que se transforman después en quinetos móviles. K) Los quinetos destruyen la célula intestinal, escapan a la hemolinfa y se esparcen en diferentes tejidos, incluyendo los ovarios. L) En los ovarios, células embrionarias son infectadas por los quinetos (transmisión transovárica). M) Cuando una garrapata ovoposita, los embriones ya se encuentran infectados. N) Larvas recién eclosionadas se unen a un bovino para alimentarse, los quinetos migran a las glándulas salivales de la garrapata y forman un esporoblasto. O) Miles de esporozoitos se liberan de un solo esporoblasto. P) Larvas de garrapata se alimentan del bovino, liberando esporozoitos al torrente sanguíneo del animal. Traducido y modificado de Mosqueda et al., (2012).

2.3 Taxonomía

Dominio: Eucariota

Supergrupo: SAR

Reino: Alveolata

Filo: Apicomplexa

Clase: Aconoidasida

Orden: Piroplasmida

Familia: Babesiidae

Género: *Babesia*

Especie: *bigemina*

(Levine, 1982).

2.4 Importancia económica

La población mundial de ganado bovino era de 1,684 millones de cabezas en el año 2012, se estima que el 77% de estos animales están en peligro de ser mordidos por garrapatas. La babesiosis bovina es el segundo hemoparásito con mayor prevalencia a nivel mundial y su distribución sigue en incremento a consecuencia del cambio climático en los últimos años (Jacob et al., 2020; FAO, 2014; Lohmeyer et al., 2011).

México es el octavo lugar a nivel mundial en producción de carne de bovino con un inventario de 35 millones de cabezas de ganado a finales del año 2018. La mayor densidad poblacional de animales se encuentra en los estados de Veracruz y Jalisco (SIAP-SADER, 2019).

De acuerdo con datos recabados por Rodríguez et al. (2017), el 80% del inventario mexicano de bovinos se encuentra en riesgo de mordedura por garrapatas *Rhipicephalus microplus*. El impacto económico en México por la mordedura de garrapatas, considerando las pérdidas en la producción pecuaria, los costos de prevención y tratamiento, se valúa en 573.6 millones de dólares anualmente.

Australia y México comparten similitudes en la población y producción bovina, ambos con una producción de 2.1 millones de toneladas anuales de carne de bovino (USDA, 2020).

En Australia la babesiosis bovina representará pérdidas de 300 millones de dólares australianos durante la próxima década; dentro de este número se considera la muerte de los animales por la enfermedad, el aumento en la proporción de abortos e infertilidad, la reducción en la producción de leche y carne, y el costo de la prevención y tratamientos (Gohil et al., 2013).

El 62% de las pérdidas económicas atribuidas a la babesiosis son debido a la disminución de la producción, la muerte de los animales y el tratamiento. El 38% restante corresponden a los costos involucrados en el control de la enfermedad, la contratación de Médicos Veterinarios, administración de fármacos y el diagnóstico de la enfermedad (Pupin et al., 2018).

La babesiosis bovina se manifiesta con fiebre, anemia hemolítica, depresión, debilidad, taquipnea, hemoglobinuria, ictericia, temblores musculares, abortos en las hembras preñadas y en algunos casos, la muerte. La aparición de estos signos ocurre entre 8 y 14 días después de la mordedura de una garrapata infectada (Almazán et al., 2018; Saad & Shuai, 2015).

B. bigemina es la especie más prevalente a nivel mundial, las parasitemias alcanzan entre el 10 y el 30%, presentando una mortalidad de 30% en animales sin tratamiento. Las causas de la muerte son choque hipovolémico, y/o falla renal, hepática o pulmonar. Los animales que sobreviven a la enfermedad sin tratamiento sufren un periodo largo de convalecencia (OIE, 2018; Esmailnejad et al., 2018; Jaimes et al., 2018).

Babesia bovis puede modificar la estructura de los eritrocitos, lo que ocasiona su secuestro en capilares sanguíneos del cerebro y riñones. Las infecciones con *B. bovis* pueden presentar signología nerviosa, como ataxia y coma (Suárez & Noh, 2011) (Almazán et al., 2018).

El dipropionato de imidocarb es capaz de eliminar la mayoría de los parásitos en la sangre, lo que permite el desarrollo de la respuesta inmune. Es por esto que el imidocarb es uno de los dos fármacos de elección para el tratamiento de la babesiosis (Mosqueda et al., 2012; Lehner et al., 2011).

El mecanismo de acción del imidocarb no está definido, Mosqueda et al. (2012) teorizan que el fármaco evita la producción de poliaminas, moléculas que facilitan el desarrollo del parásito durante su fase intra eritrocítica.

Por otro lado Baneth, 2018 y Lehner et al 2011 estipulan que el imidocarb se une a los ácidos nucleicos de la *Babesia* ocasionando condensación de la cromatina y la subsecuente inhabilidad de reparación y replicación celular.

El otro fármaco usado recurrentemente para el tratamiento de la babesiosis es el aceturato de diminaceno. Se cree que el fármaco dificulta la síntesis del ADN del parásito y la glucólisis aerobia (Tuvshintulga et al., 2019; Baneth, 2018).

El uso de acaricidas en el ganado bovino es una estrategia para disminuir el impacto económico directo ocasionado por las garrapatas y aminorando la incidencia de las enfermedades transmitidas por garrapata como la babesiosis (Almazán et al., 2018).

Los acaricidas más utilizados son los organoclorados, organofosforados, piretroides y el amitraz. Sin embargo, su uso indiscriminado ha ocasionado el surgimiento de cepas de garrapatas resistentes a acaricidas. Además estos compuestos tienen la capacidad de afectar las poblaciones de insectos regionales y tienen un efecto residual en leche y carne (George, Pound, & Davey, 2004; Domingos et al., 2013).

En 1981 surgieron en México las primeras cepas resistentes de garrapatas debido al uso excesivo de organofosforados y organoclorados, éstas cepas fueron llamadas “Tuxpan” y “Tempoal”. En 1985 se aprobó el uso de piretroides y amidinas para el control de garrapatas en México, para el año de 1993 aparecieron cepas resistentes a estos compuestos (“Aldama”, “Coatzacoalcos” y “Mora”). El amitraz ha sido utilizado en México desde el año 1994, presentando el primer caso de resistencia a este componente en el año 2002 (Rosario et al., 2009).

La NOM-019-ZOO-1994 “Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp*” indica los lineamientos para el control y eliminación de la garrapata del territorio mexicano; la cual detalla el uso correcto de acaricidas para la prevención de cepas resistentes. Los esfuerzos de esta campaña son positivos, actualmente los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California Norte y Chihuahua se encuentran en condición libre de garrapata (Almazán et al., 2018) (SENASICA, 2020).



Figura 2. Situación actual de la campaña nacional para el control de la garrapata *Boophilus spp* (*Rhipicephalus spp*) Fuente: SENASICA, 2020.

2.5 Métodos de diagnóstico

2.5.1 Frotis sanguíneo

Es un método sencillo y económico, consiste en la obtención de sangre bovina junto con un anticoagulante. Se coloca una gota de la muestra obtenida sobre un extremo de una laminilla, después con otra laminilla se desliza hacia atrás la gota y en un movimiento rápido hacia adelante se extiende la sangre (Cowell et al., 2009). El frotis sanguíneo es secado al aire, se fija durante 2 minutos en metanol absoluto y por último se tiñen durante 40 minutos con Giemsa 1:20. La sensibilidad y especificidad de esta técnica dependen de la experiencia del examinador, sobre todo para la diferenciación entre *B. bovis* y *B. bigemina*. El uso de frotis gruesos aumenta la sensibilidad de este método (Lempereur et al., 2017).

Las fases intraeritrocitarias son observadas bajo el objetivo 100x con aceite de inmersión como solución de montaje. Los merozoitos de *B. bovis* miden 1.5-2 μm de diámetro, mientras que los de *B. bigemina* 2.5-3.5 μm de diámetro (Mosqueda et al., 2012).

2.5.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Esta técnica se utiliza cuando lo que se quiere es detectar los anticuerpos contra el parásito. Las IFI se basan en el reconocimiento de la *Babesia* por anticuerpos en el suero de los animales sospechosos; los resultados arrojados por este método son subjetivos y no pueden ser cuantificados (OIE,208). Un resultado positivo indica que el animal ya estuvo expuesto previamente a la enfermedad y no sirve para detectar al parásito ni la enfermedad aguda.

Para la IFI, se requiere de antígeno que consiste en eritrocitos infectados con cada una de las especies. Se recomienda una parasitemia entre 2% y 5%, en sangre periférica, la cual después de ser extraída con anticoagulante, es lavada para eliminar las proteínas de la sangre y preservar únicamente los eritrocitos. Con la sangre se realizan frotis sanguíneos delgados, sobre los cuales se incuban sueros de animales sospechosos durante 30 minutos y se añade un anticuerpo anti IgG de bovino marcado con fluorocromo. Este fluorocromo emite una señal luminosa al reconocer la región Fc de los anticuerpos de bovino, es necesario el uso de un microscopio de fluorescencia para emitir un resultado (OIE, 2018).

Los anticuerpos de bovino contra *B. bigemina* tienen reacción cruzada con *B. bovis* (Goodger, 1971). Las desventajas que presenta este método son: la necesidad de obtener antígeno para los frotis, requiere de personal capacitado para leer esta prueba y de un microscopio de fluorescencia (Mosqueda et al., 2012).

2.5.3 Inmunoensayo ligado de a enzima (ELISA)

Este procedimiento permite la cuantificación de la reacción antígeno-anticuerpo a través de un cambio de color, estableciendo la presencia y la concentración de anticuerpos en el suero de los animales (Aydin, 2015).

Descrita inicialmente por Engvall y Perlmann en 1971 para la identificación de IgG de conejo, permite la identificación de proteínas como citocinas, fosfoproteínas, moléculas recombinantes y anticuerpos (Hornbeck, 2015).

La técnica se basa en la unión de un antígeno con un anticuerpo específico. Un antígeno es inmovilizado en una microplaca, el cual es reconocido con un anticuerpo primario presente en la muestra a probar. Finalmente se utiliza un anticuerpo secundario acoplado a una enzima, que se unirá al complejo antígeno-anticuerpo en caso de estar presente. La enzima acoplada al anticuerpo secundario genera un cambio de color en relación a la concentración de anticuerpos específicos en la muestra (Shah & Maghsoudlou, 2016).

Es necesario bloquear los antígenos inmovilizados en la placa para evitar la unión inespecífica de proteínas; de igual forma es primordial realizar lavados entre cada uno de los pasos para evitar la interferencia de anticuerpos que no se unen a su antígeno (Aydin, 2015).

Existen variantes de esta técnica respecto al tipo de molécula que se inmoviliza en la microplaca; se puede utilizar un anticuerpo de “captura” para determinar la presencia del antígeno en la muestra a probar (Shah & Maghsoudlou, 2016).

Cuadro 1. Tipos de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA)

Tipo de ELISA	Uso	Sensibilizado	Muestra
Directa	Detección de antígeno	Antígeno purificado	Antígeno
Indirecta	Detección de anticuerpos	Antígeno purificado	Suero
Tipo sándwich	Detección de antígeno	Anticuerpo de captura	Antígeno
Competitiva	Detección de antígeno	Antígeno purificado	Antígeno + anticuerpo específico

(Shah & Maghsoudlou, 2016)

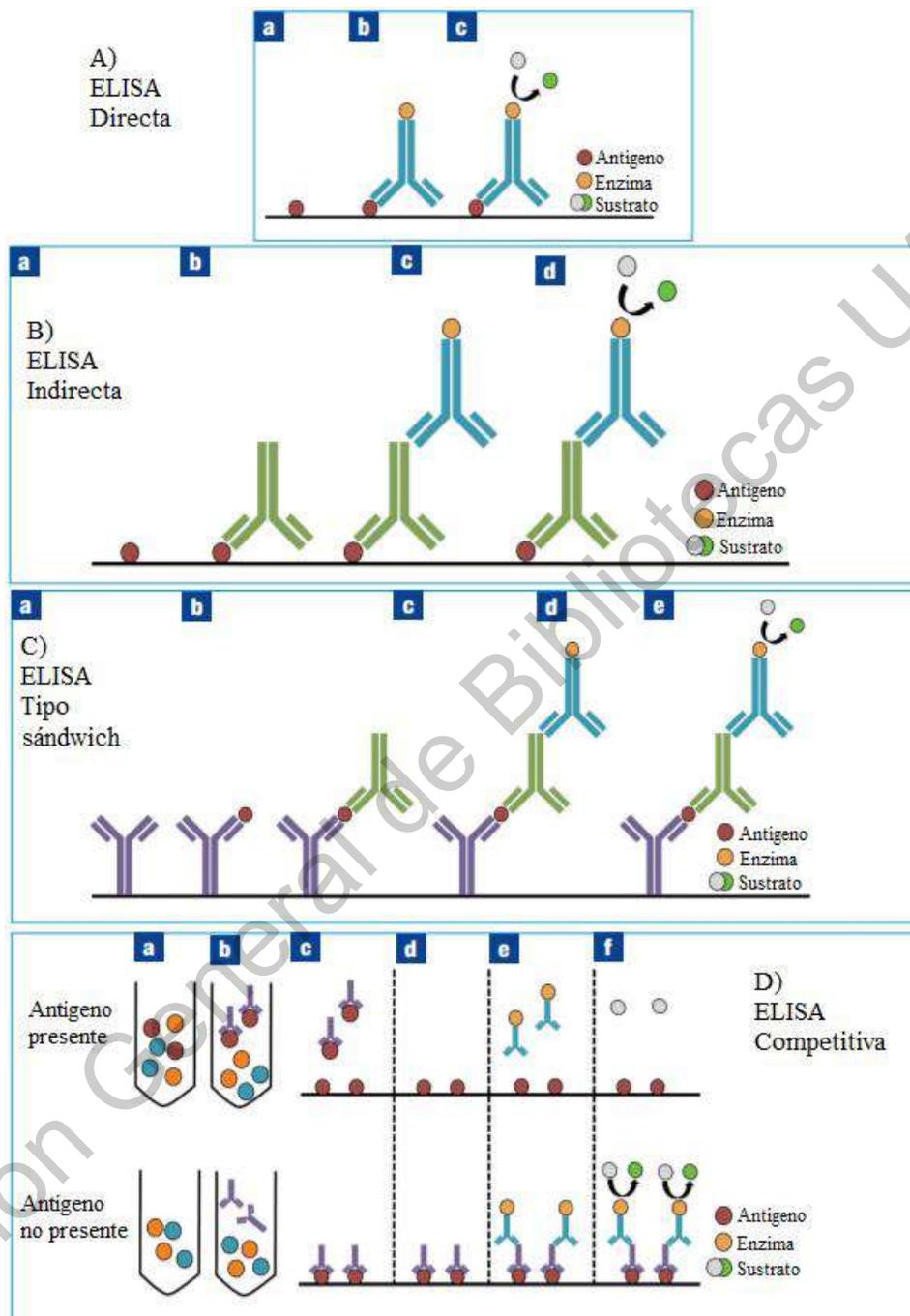


Figura 3. Tipos de inmunoensayo ligado a enzima (ELISA). Traducido y modificado de: Shah & Maghsoudlou, 2016.

La ELISA puede analizar una gran cantidad de muestras al mismo tiempo y otorgan objetividad a los resultados, los cuales pueden ser cuantificados. En comparación con la IFI, la ELISA tiene un mejor rendimiento para evaluar un mayor número de muestras (Mosqueda et al., 2012; OIE, 2018).

Las ELISA indirectas son incapaces de discriminar si el animal está cursando la enfermedad en ese momento, ya que no detectan al patógeno, y usualmente aparecen los anticuerpos cuando ya no existe enfermedad clínica. Otro problema es que el resultado puede verse alterado por la presencia de anticuerpos vacunales o los anticuerpos en el calostro, lo que impide detectar eficazmente los anticuerpos presentes en suero después de la enfermedad, lo cual es el objetivo de esta prueba (Romero et al., 2016).

2.5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR se utiliza para analizar muestras sospechosas de babesiosis cuando el agente etiológico no es común en la población. Esta prueba se basa en la amplificación de una porción del material genético del microorganismo. La prueba requiere de varios componentes incluyendo la enzima ADN polimerasa, el ADN extraído de la muestra, los *primers* y los nucleótidos (Shahi et al., 2018).

El método consta en 3 fases primordiales: la desnaturalización de la cadena bicatenaria de ADN a 94 o 95 °C; el alineamiento de los iniciadores con el material genético de la muestra (la temperatura a la que esta ocurre es dependiente de la secuencia de los iniciadores) y finalmente una fase de elongación de la cadena gracias a la enzima ADN polimerasa, la cual se realiza a 72° C (Green & Sambrook, 2018).

Este proceso se lleva a cabo en ciclos, logrando amplificar miles de copias del gen, lo cual hace muy sensible el diagnóstico con este método. Para poder visualizar el producto del PCR y emitir un diagnóstico, éste debe ser teñido con un fluorocromo intercalante y separado mediante un gel de agarosa, observándose el fragmento de ADN del microorganismo cuando se observa bajo una luz ultravioleta (Green & Sambrook, 2018).

La PCR para la detección de la babesia es capaz de identificar parasitemias entre 0.001% y 0.0000001%, además permite diferenciar animales sanos y los persistentemente infectados, lo cual no se podría realizar con microscopía (OIE, 2018; Álvarez et al., 2019).

Sin embargo, a pesar de la alta sensibilidad y especificidad de esta prueba, su desventaja es que demanda tiempo, requiere equipo y personal especializado y es costosa. No es recomendada para el diagnóstico a gran escala ni para el desarrollo de estudios epidemiológicos, en los cuales se prefiere la utilización de pruebas serológicas como la ELISA (Mosqueda et al., 2012; Organización Mundial de Sanidad Animal, 2018).

2.5.5 Amplificación isotérmica mediada por horquillas (LAMP)

La técnica fue desarrollada en el año 2000 por Notomi *et al.* (2000) como una estrategia para disminuir la necesidad de equipos manteniendo la sensibilidad y especificidad del PCR. El LAMP es capaz de amplificar un fragmento de ADN en condiciones isotérmicas, el procedimiento replica pocas copias de material genético en menos de una hora.

El LAMP requiere de 4 iniciadores (*primers* en inglés) diferentes, los cuales se unen a 6 regiones diferentes del gen de interés. Estos iniciadores son: interno sentido (*FIP* por sus siglas en inglés), externo sentido (F3), interno antisentido (*BIP* por sus siglas en inglés) y externo antisentido (B3); cada uno denominado de acuerdo al punto y dirección de la cadena en la que se unen (Wong et al., 2017).

Estos iniciadores tienen la capacidad de hibridarse entre ellos al momento de culminar con la síntesis de su cadena complementaria, lo que permite la inclusión de nuevos iniciadores y la subsecuente replicación de una nueva cadena de ADN (Wong et al., 2017).

Se puede añadir un fluorocromo para la detección visual de la reacción, esto anula la necesidad de equipos para la confirmación de los diagnósticos (Notomi et al., 2015; Mosqueda et al., 2012).

Cuadro 2. Métodos de diagnóstico para la babesiosis bovina y su propósito

Método	Propósito						
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en los animales antes de la movilización	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Vigilancia epidemiológica	Determinar estado inmunitario post-vacunación	
Microscopía	-	+	-	+++	-	-	
PCR	-	+++	-	+++	-	-	
Identificación del agente							
ELISA	+++	+	+++	-	+++	+++	
IFI	+	-	-	-	++	+++	
Detección de respuesta inmunitaria							

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; - = no adecuado para este propósito.

*Se recomienda aplicar una combinación de los métodos de identificación del agente en la misma muestra

2.6 Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos son proteínas efectoras del sistema inmune, funcionan como la unidad esencial de la respuesta inmune humoral. Son producidos por células plasmáticas y son capaces de reconocer, neutralizar o destruir antígenos ajenos al organismo (Owen et al., 2013).

Existen 5 subclases de anticuerpos: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, esto dado por el tipo de cadena pesada del anticuerpo (Ma & O'Kennedy, 2015).

Cada anticuerpo se encuentra formado por pares idénticos de cadenas, denominadas ligeras (L de *light*) y pesadas (H de *heavy*) las cuales están unidas por puentes disulfuro e interacciones no covalentes. La estructura de los anticuerpos se asemeja a una letra “Y” debido a estas interacciones (Gutiérrez, 2010).

Tras exponer al anticuerpo a la papaína este se fragmenta en dos regiones: la región Fab (fracción de unión a antígeno) y la Fc o fracción cristalizable. La fracción de unión a antígeno se encarga del reconocimiento del antígeno; mientras que la fracción cristalizable es una estructura conservada entre los isotipos de anticuerpos de la misma especie y es reconocida por otras células del sistema inmune (Owen et al., 2013).

La producción de anticuerpos inicia cuando un antígeno ingresa al organismo, es detectado por células presentadoras de antígenos (*APC* por sus siglas en inglés), como los macrófagos, células B y las células dendríticas. Aquí el antígeno es procesado y una fracción de él es presentado en la membrana celular de las *APC* mediante una molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (*MHC II* por sus siglas en inglés) (Tizard, 2009).

La molécula *MHC II* es reconocida por el receptor de células T, evento que promueve la activación y diferenciación de la célula T a un linfocito T cooperador (*Th*). Los linfocitos *Th* inducen la activación y diferenciación de células B a células plasmáticas, las cuales producen anticuerpos específicos contra el antígeno que ingresó al organismo (Gutiérrez, 2010).

Los patógenos son neutralizados por los anticuerpos al no poder unirse con las células del huésped. Cuando un anticuerpo se une con su antígeno en ocasiones se activa la cascada del complemento; también los anticuerpos opsonizan patógenos, immobilizándolos y permitiendo su fagocitosis. Las células asesinas naturales reconocen la región Fc de un anticuerpo sobre un antígeno, lo que induce un evento denominado citotoxicidad dependiente de anticuerpo hacia un antígeno establecido (Owen et al., 2013).

El sistema inmune produce una gran cantidad de células plasmáticas distintas durante un proceso de enfermedad. Cada una de estas células produce anticuerpos contra un antígeno específico. Se define como anticuerpo policlonal al conjunto de anticuerpos producidos de manera natural en un animal contra los distintos epítopos del mismo patógeno (Wootla et al., 2014).

Los anticuerpos monoclonales (*mAbs* por sus siglas en inglés) son moléculas producidas en cultivo celular, las cuales conservan la capacidad para reconocer un epítipo en un antígeno específico e imitar la respuesta inmune normal (Bayer et al., 2019; Posner et al., 2019).

En 1975 Kohler y Milstein fueron los pioneros en la producción de anticuerpos monoclonales con una especificidad predefinida, obteniendo anticuerpos de ratón contra eritrocitos de carnero. Esto fue logrado al fusionar células del bazo de un ratón con un mieloma inmortal, formando hibridomas (Wootla et al., 2014).

El proceso de producción de los *mAbs* inicia generando una respuesta inmune en un animal, para lo cual, éste es inmunizado contra el antígeno de interés. Suelen utilizarse partículas semejantes a virus junto con el antígeno, con el objetivo de mejorar la respuesta inmunitaria en el animal. Este proceso de suele durar entre 8 y 12 semanas, con varios refuerzos para lograr la madurez en la afinidad de los anticuerpos. Antes realizar a la fusión de líneas celulares, se debe confirmar la producción de anticuerpos, esto llevado a cabo mediante una ELISA indirecta (Hanack et al., 2016).

Los mielomas son obtenidos de una variedad de ratón albino llamada *BALB/c*, que posee la facilidad para desarrollar mielomas. En la actualidad se utilizan las líneas celulares

X63-Ag 8.653⁹ y Sp2/0-Ag 14¹⁰, estas líneas son empleadas debido a que son incapaces de secretar anticuerpos por su cuenta (Holzlöhner & Hanack, 2017).

La fusión de las células de bazo con las de mieloma se logra adicionando polietilenglicol a la mezcla, el cual aumenta la permeabilidad de las células y permite su unión; es un procedimiento simple pero la fusión de las células es inespecífica, por lo que en la mezcla final se obtienen células esplenocito-esplenocito, mieloma-mieloma y los híbridos mieloma-esplenocito (Hnasko & Stanker, 2015).

Se han descrito nuevas tecnologías para disminuir la aleatoriedad de este procedimiento, como la formación de cadenas de perlas, en donde se alinean los esplenocitos con las células de mieloma mediante un campo eléctrico, la fusión de las células es llevada a cabo tras la aplicación de pulsos eléctricos (Tomita & Tsumoto, 2011).

Las células obtenidas son cultivadas con medio HAT, el cual contiene hipoxantina, aminopterina y timidina. La aminopterina no permite la división de las células de mieloma, mientras que faculta la supervivencia de los hibridomas. Se realizan inmunoensayos ligado a enzima indirectos para seleccionar a los hibridomas productores de anticuerpos (Nelson et al., 2000).

Los anticuerpos monoclonales son obtenidos tras la dilución seriada de un número definido de células (10 células/ml) en una microplaca de 96 pozos, se cultivan durante 7 días y se vuelven a probar por inmunoensayo ligado a enzima indirecto para su subsecuente producción en masa (Holzlöhner & Hanack, 2017).

Los anticuerpos monoclonales son utilizados terapéuticamente para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y el cáncer; se estima que su uso aumentará en los próximos años (Rajewsky, 2019).

Se han desarrollado *mAbs* para el control de enfermedades infecciosas como la malaria y la influenza, esto es posible por la capacidad de los anticuerpos monoclonales de imitar la respuesta inmune (Rajewsky, 2019).

Domínguez et al. (2004) produjo un anticuerpo monoclonal contra el antígeno de superficie de merozoíto 2c (MSA-2c) de *B. bovis* y lo acopló a una ELISA competitiva para el diagnóstico de la enfermedad. Fisher et al. (2001) desarrolló un anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína de superficie de merozoíto 45 de *B. bigemina*, no obstante, el anticuerpo monoclonal fue incapaz de reconocer babesias provenientes de otros países.

En virtud que los *mAbs* son capaces de reconocer un antígeno específico de un patógeno, pueden ser adaptados para su uso dentro de pruebas diagnósticas; el trabajo de Sozzi et al. (2018) describe el desarrollo y validación de una prueba de ELISA para el diagnóstico del virus de la diarrea epidémica porcina, utilizando anticuerpos monoclonales como anticuerpo de captura y anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa.

III. HIPÓTESIS

El anticuerpo monoclonal de la clona 2A10A5H6 (C1) contra la glicoproteína de membrana de merozoito 45 se obtiene en medio libre de suero fetal bovino y reconoce a *Babesia bigemina*.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener un anticuerpo monoclonal libre de suero fetal bovino que reconozca a la proteína GP-45 de *Babesia bigemina*.

4.2 Objetivos específicos

1. Adaptar la clona C1 productora de un anticuerpo monoclonal contra GP45 a un medio libre de suero fetal bovino.
2. Obtener el anticuerpo monoclonal del sobrenadante de cultivo.
3. Evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal mediante inmunoensayos ligados a enzima.
4. Evaluar la especificidad del anticuerpo monoclonal mediante inmunofluorescencia indirecta.

V. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Durante todos los experimentos de la presente tesis, se trabajó con una clona de hibridomas de ratón obtenida de experimentos del M en C. Miguel Ángel Mercado Uriostegui; específicamente con la clona marcada como “Clona 1” productora de un anticuerpo monoclonal contra la proteína de membrana del merozoito 45 de *Babesia bigemina*.

5.1 Adaptación de hibridomas a medio libre de proteínas

Se realizó una adaptación de las células de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) a un medio comercial libre de proteínas sin SFB. El cambio se llevó a cabo de manera gradual, disminuyendo 1% de SFB cada tercer cambio de medio y congelando células a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ de cada concentración de medio DMEM + SFB. Las células se revisaron diariamente con un microscopio invertido para observar su crecimiento, cambios en morfología y se buscó posibles contaminaciones en el cultivo.

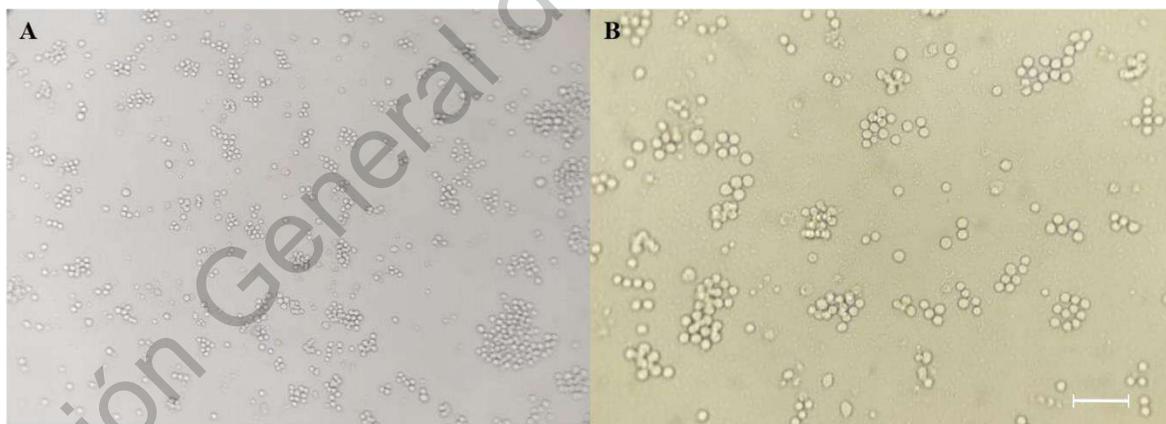


Figura 4. Hibridomas de ratón productores de un anticuerpo monoclonal. Panel A aumento 10x. Panel B aumento 40x. Barra=20 μm

Los cultivos de hibridomas se mantuvieron a condiciones constantes, que fueron temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, humedad del 90% y una concentración de CO_2 de 5%.

Se preservaron 2 lotes de 10 ml de sobrenadante de cultivo por cada concentración de SFB en el medio, se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su futuro análisis. Al terminar la adaptación

a medio libre de proteínas sin SFB el cultivo se mantuvo estable hasta lograr la congelación de tres viales para el uso de los hibridomas en futuros proyectos.

%SFB/Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
10	Descongelamiento	Revisión	Revisión	Cambio de medio	Revisión	Revisión	Cambio de medio	Revisión	Congelamiento															
9									Cambio de medio	Revisión	Revisión	Cambio de medio	Revisión	Revisión	Cambio de medio	Revisión	Congelamiento							
8																	Cambio de medio	Revisión	Revisión	Cambio de medio	Revisión	Cambio de medio	Revisión	Congelamiento
7																								Cambio de medio

Cuadro 3. Cronograma del mantenimiento de los hibridomas en cultivo durante los primeros 24 días.

5.1.1 Protocolo para el descongelamiento de hibridomas

1. Retirar el criovial con los hibridomas de su almacenamiento y colocarlo en agua destilada previamente calentada a 37 °C.
2. Trasvasar el contenido a un tubo cónico para centrifuga de 15 ml y adicionar 8 ml de medio DMEM sin suero fetal bovino pre-calentado a 37 °C.
3. Centrifugar a 1.500 rpm durante 5 minutos a 37 °C.
4. Repetir los pasos 2 y 3.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 10 ml de medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino.
6. Sembrar en frascos de cultivo de 25 cm².

5.1.2 Protocolo para el congelamiento de hibridomas

1. Mover el frasco de cultivo suavemente en círculos para despegar las células no viables.
2. Agregar 10 ml de medio DMEM, cerrar la tapa del frasco y golpear con firmeza el frasco para despegar las células.
3. Trasferir el sobrenadante a un tubo cónico para centrífuga de 15 ml.
4. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
5. Desechar el sobrenadante y resuspender el paquete celular en 2 ml de solución crioprotectora.

6. Transferir el producto a un criovial y almacenar a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 Purificación de antígeno crudo

Se purificó antígeno de *B. bigemina* de un bovino con parasitemia del 21%. Cada una de las muestras fue sometida a procesos de calor y frío para obtener los parásitos. Al final un ciclo se centrifugaron las muestras y se desechó el sobrenadante; este fue un procedimiento repetitivo hasta la obtención de un sobrenadante claro.

Al paquete obtenido se le agregó inhibidor de proteasas y la solución fue filtrada por un tamiz de $100\text{ }\mu\text{m}$ y transferido a un tubo cónico para centrífuga de 50 ml. Se almacenó en criovales de 2 ml a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2.1 Protocolo para la purificación de antígeno crudo de *B. bigemina*

1. Calentar las muestras en baño María a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
2. Homogenizar el contenido de los tubos.
3. Depositar las muestras en nitrógeno líquido durante 3 minutos.
4. Calentar las muestras nuevamente a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
5. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos.
6. Desechar el sobrenadante y aforar a 2 ml con PBS.
7. Repetir los pasos 2-6 hasta obtener un sobrenadante claro.
8. Disolver una tableta de inhibidor de proteasas en 15 ml de PBS. Resuspender con esta solución las muestras.
9. Filtrar a través de un tamiz de $100\text{ }\mu\text{m}$ y transferir el contenido a un tubo cónico para centrífuga de 50 ml.
10. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos.
11. Desechar el sobrenadante y aforar el tubo a 50 ml con PBS.
12. Centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos.
13. Desechar el sobrenadante y alicuotar en tubos de 2 ml.
14. Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.3 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La purificación del antígeno crudo fue cuantificada en una microplaca para diluciones. En cada pozo se agregaron 245 μl de reactivo de Bradford y por triplicado se agregaron 5 μl de concentraciones estándar de albúmina sérica bovina.

Se realizaron 6 diluciones de la muestra, alcanzando una concentración final de 1:64; por triplicado se agregaron 5 μl de las muestras y se leyó a 595 nm en un lector de placas.

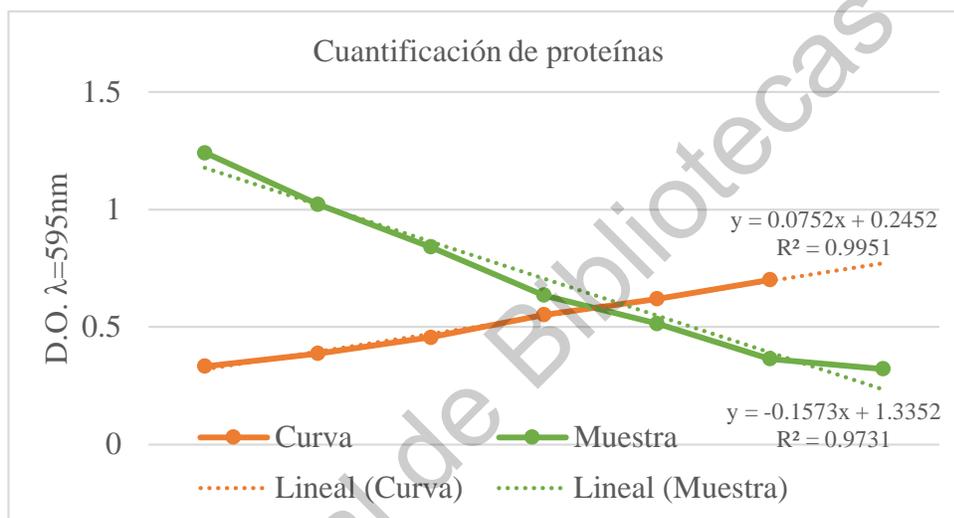


Figura 5. Cuantificación de antígeno crudo por el método de Bradford.

La intersección entre ambas curvas se dio en $(x=3.82, y=0.53)$, resultando en una concentración de 6 mg/ml de antígeno crudo.

5.4 Inmunoensayo ligado a enzima

Los sobrenadantes de cultivo fueron evaluados por ELISA indirecta, con el propósito de identificar la presencia de anticuerpos que reconocen antígeno crudo de *B. bigemina*. La placa fue sensibilizada con antígeno crudo a concentración de 5 µg/ml, la placa fue bloqueada con 5% de leche descremada. Como anticuerpo primario se utilizaron los sobrenadantes de cultivo de la adaptación, que se usaron sin diluir. Por último, se utilizó como anticuerpo secundario anti H+L cadena µ específico de ratón hecho en cabra, este en dilución 1:2000. La reacción fue leída a los 20 minutos, con una absorbancia de 490 nm.

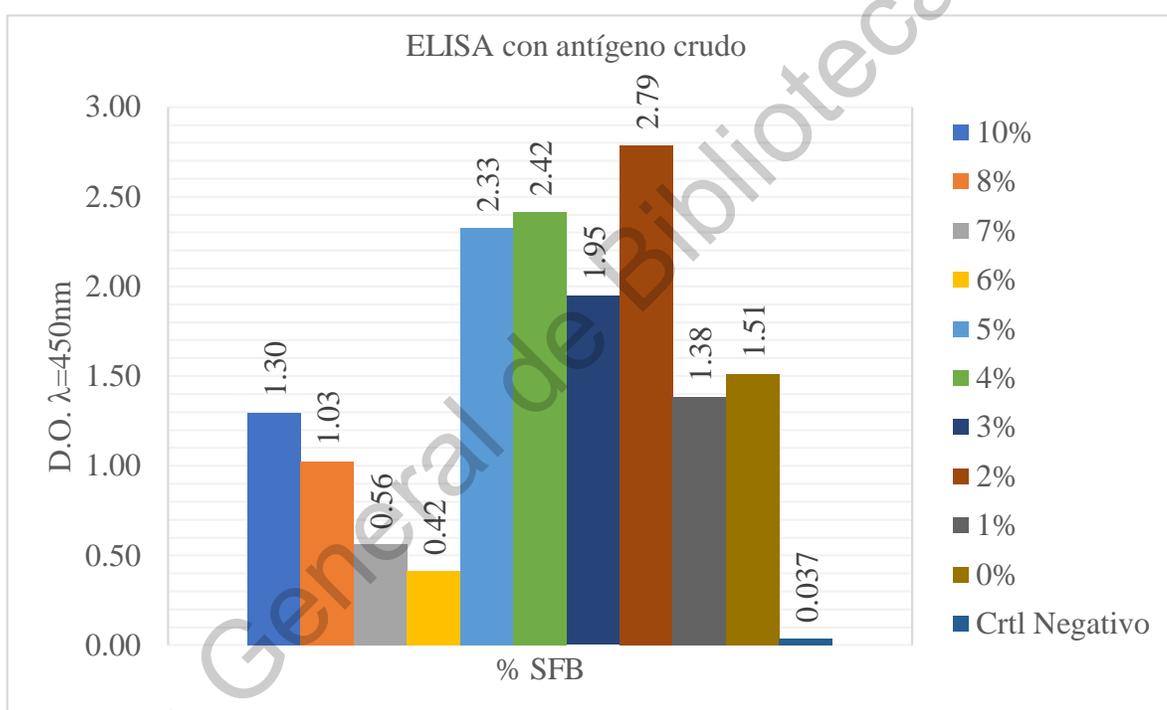


Figura 6. Inmunoensayo ligado a enzimas indirecto con antígeno crudo.

Se seleccionaron sobrenadantes de cultivos con diferentes concentraciones de suero fetal bovino, los cuales fueron examinados nuevamente por ELISA indirecta. Se modificó la sensibilización de la placa, utilizando péptido lineal de GP-45 a concentración de 50 µg/ml. Se agregaron los sobrenadantes de cultivo sin diluir como anticuerpo primario; y se utilizó un anti H+L cadena µ específico de ratón como anticuerpo secundario, a dilución 1:2000 como se detalla a continuación:

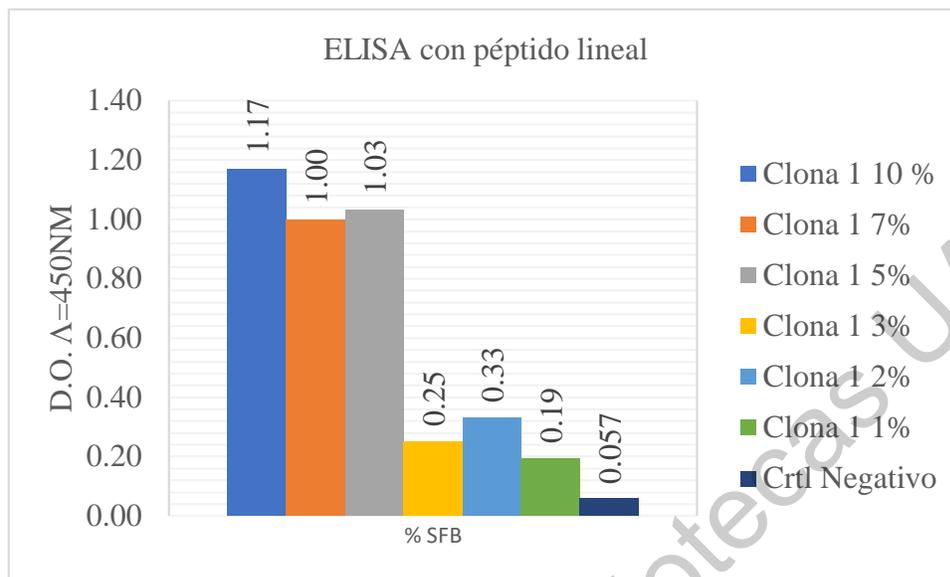


Figura 7. Inmunoensayo ligado a enzimas indirecto con péptido lineal de GP-45.

5.4.1 Protocolo para el inmunoensayo ligado a enzima indirecto

1. Diluir el antígeno en solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 (concentración 0.1-50 µg/ml).
2. Sensibilizar la placa de 96 pozos (Costar 3590) con 100 µl/pozo de la solución del antígeno.
3. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
4. Desechar el contenido de la placa y eliminar el exceso sobre una gasa o paño.
5. Realizar 3 lavados con 200 µl/pozo de PBS-Tween, agitando levemente la placa. Repetir el paso 4.
6. Bloquear la placa utilizando 200 µl pozo de leche descremada al 5%. Incubar durante una hora a 37 °C.
7. Repetir los lavados descritos en el paso 5.
8. Agregar 100 µl/pozo de los sobrenadantes de cultivo. Incubar durante toda la noche a 4 °C.
9. Realizar los lavados descritos en el paso 5.
10. Diluir el anticuerpo secundario a la concentración deseada y verter 100 µl/pozo. Incubar a 37 °C durante 35 minutos.
11. Realizar los lavados descritos en el paso 5.

12. Adicionar 100 μ l pozo de la solución reveladora.

13. Leer en un lector de placas con absorbancia de 590 nm.

5.5 Evaluación del anticuerpo monoclonal mediante inmunofluorescencia indirecta

Se realizaron inmunofluorescencias indirectas usando los sobrenadantes de cultivo. Se utilizaron frotis sanguíneos de un bovino infectado con *B. bigemina* con una parasitemia del 21%, que fueron realizados el 30 de mayo del 2019. Los sobrenadantes de cultivo se utilizaron como anticuerpo primario sin diluir.

Como anticuerpo secundario se utilizó un anti IgM de ratón acoplado a Alexa 488, en dilución 1:200. De control negativo se empleó suero de ratón pre-inmunización con GP-45, en dilución 1:80. Finalmente se usó suero de ratón hiperinmune como control positivo, este a dilución 1:80.

Un frotis sanguíneo fue teñido con DAPI junto con el anticuerpo secundario, a una concentración de 1 μ g/ml.

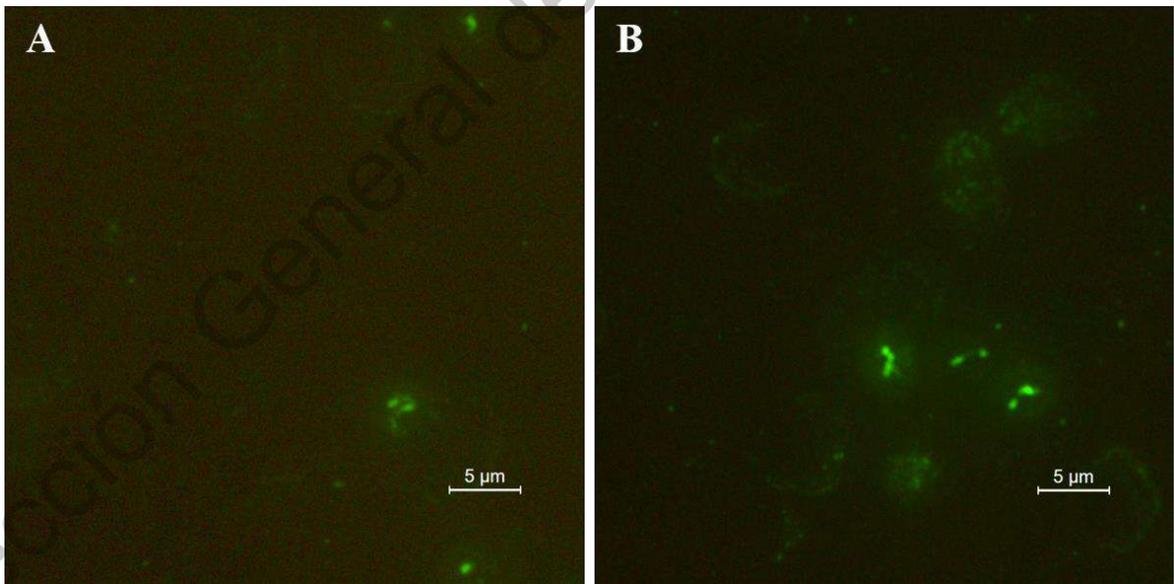


Figura 8. Inmunofluorescencia indirecta sin DAPI. Panel A: Sobrenadante con 7% de SFB, Alexa 488. Panel B: sobrenadante con 5% SFB, Alexa 488. Aumento 100x. Barra=5 μ m

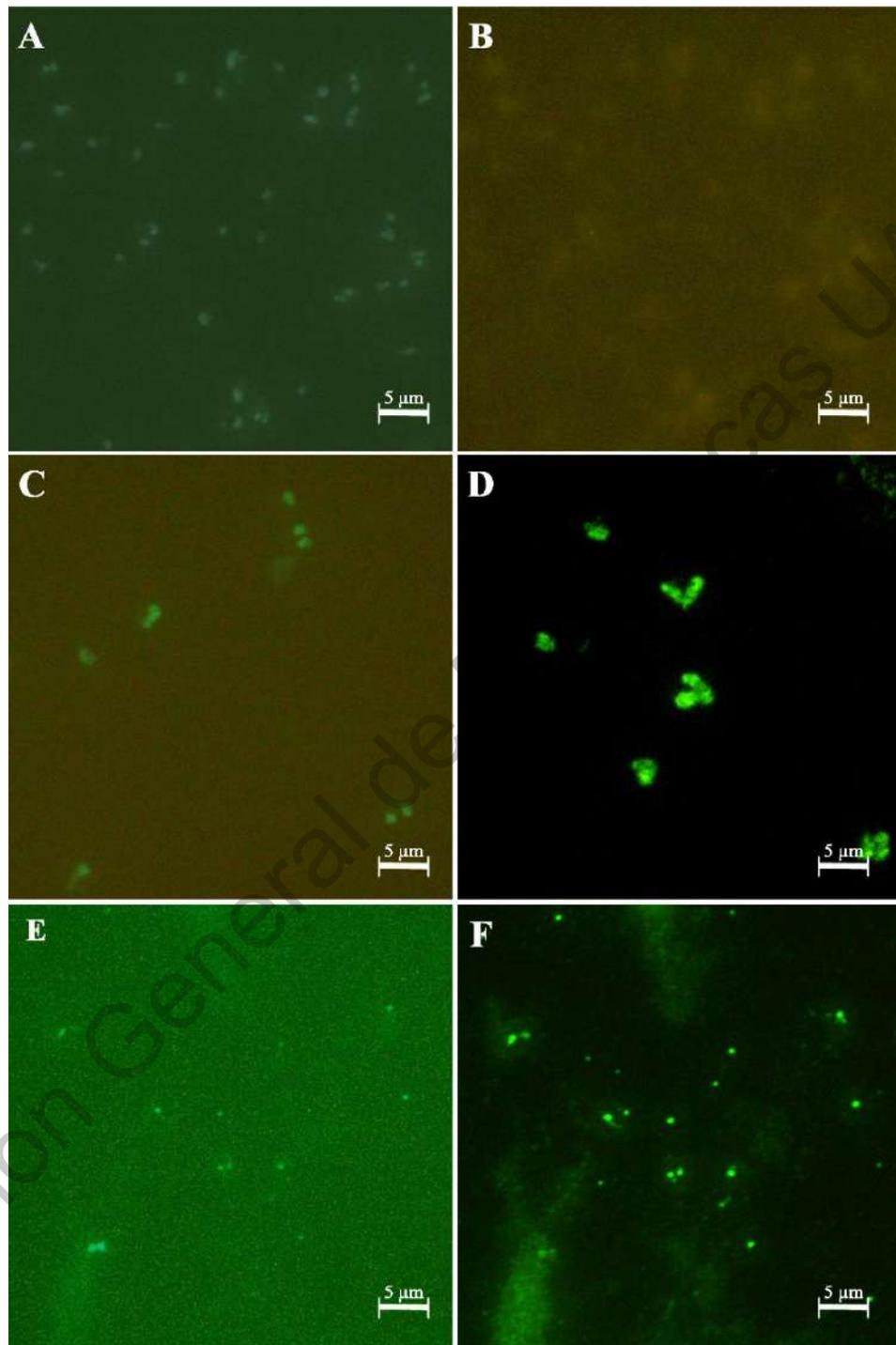


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta. Panel A: Control negativo con DAPI. Panel B: Control negativo con Alexa 488. Panel C: Control positivo con DAPI. Panel D: Control positivo con Alexa 488. Panel E: Sobrenadante de cultivo con DAPI. Panel F: Sobrenadante de cultivo con Alexa 488.

5.5.1 Protocolo de inmunofluorescencia indirecta

1. Retirar los frotis sanguíneos del congelador (-20 °C) y permitir su secado al aire durante 30 minutos.
2. Fijar las laminillas en acetona absoluta, apoyándose con cajas Coplin durante 30 minutos. Mantener las laminillas a -20 °C.
3. Dejar secar las laminillas al aire durante 30 minutos.
4. Realizar círculos sobre las laminillas a manera de identificación.
5. Colocar 200 µl del anticuerpo primario e incubar durante 30 minutos a 37 °C en una cámara húmeda.
6. Desechar el contenido de los frotis y traspasarlos a una caja Coplin con PBS-Tween.
7. Realizar 3 lavados con PBS-Tween y uno extra con agua destilada. Cada lavado con una duración de 5 minutos con una agitación de 80 rpm, desechar el PBS-Tween entre cada lavado.
8. Adicionar el anticuerpo secundario procurando cubrir la totalidad del círculo previamente marcado.
9. Incubar durante 30 minutos a 37 °C.
10. Realizar los lavados descritos en el paso 7 manteniendo los frotis en la oscuridad.
11. Secar los frotis al aire (conservando oscuridad). Observar en el microscopio de fluorescencia usando como solución de montaje glicerina fosfatada.

VI. DISCUSIÓN

La babesiosis bovina es una de las enfermedades más importantes en el ganado vacuno. En México las especies presentes de babesia son *B. bigemina* y *B. bovis*, las cuales son transmitidas por garrapatas del género *Rhipicephalus*.

En este trabajo se obtuvo un anticuerpo monoclonal de ratón en un cultivo libre de suero fetal bovino. Según Chua (2016) el cultivo de hibridomas necesita una alta demanda de nutrientes, la cual es satisfecha a través de suero fetal bovino.

La adaptación de los hibridomas a medio libre fue realizada de manera lenta, reduciendo 1% de SFB cada 7 días, logrando la supervivencia de las células durante todo el proceso. Manna *et al.* (2015) realizaron una adaptación de hibridomas a medio libre, no obstante, la disminución de porcentaje de SFB fue mayor en ese trabajo a comparación con el que aquí se presenta. La velocidad a la que se adaptan los hibridomas a un medio libre de suero fetal bovino puede ser dependiente de la clona con la que se esté trabajando (Manna *et al.*, 2015).

En el trabajo descrito por de Paiva *et al.* (2017) se adaptaron clonas productoras de distintos anticuerpos monoclonales a medio libre, esto lo realizaron disminuyendo directamente el SFB a 0% al inicio de la adaptación; los cultivos fueron totalmente adaptados hasta el pase número 20 de medio. En el trabajo realizado en esta tesis no se observaron alteraciones en el ritmo de crecimiento de los hibridomas en el transcurso de la adaptación.

Los lotes de suero fetal bovino no poseen la misma cantidad de nutrientes. Existe el riesgo de contaminación por bacterias y su uso lleva a regulaciones éticas. La purificación de los sobrenadantes de cultivo adicionado con SFB es difícil debido a la alta concentración de proteínas y a la presencia de anticuerpos de origen bovino; esto resulta en la disminución del rendimiento después de la purificación (de Paiva *et al.*, 2017). En este trabajo se intentó purificar el sobrenadante con menor concentración de SFB, pero no se pudo obtener anticuerpo monoclonal purificado de esos sobrenadantes.

Los inmunoensayos ligados a enzima son el método más común para la caracterización de anticuerpos. Es importante conocer la especificidad de unión, esto tanto

en el antígeno crudo como a nivel de epítopo (Taussig et al., 2018). Por este motivo se decidió realizar dos tipos de ELISA en este trabajo que fueron la sensibilización de la microplaca con antígeno crudo de *B. bigemina* y otra con péptido lineal de GP-45.

Jing *et al.* (2018) caracterizaron anticuerpos monoclonales contra el virus del pez gato americano (*Ictalurus punctatus*). Al realizar inmunoensayos ligados a enzima indirectos observaron absorbancias de 0.8-0.3 en los sobrenadantes con anticuerpos contra el virus, mientras que en sus controles negativos observaron absorbancias menores a 0.1. Las absorbancias obtenidas en este trabajo fueron mayores, en la mayoría de los sobrenadantes, en los cuales se obtuvieron absorbancias de hasta 2.79; en los controles negativos se obtuvieron absorbancias de 0.057, semejantes al trabajo de Jing *et al.* (2018).

El trabajo de Figueiredo *et al.* (2000) describe la caracterización de anticuerpos monoclonales contra *B. bovis*. En los inmunoensayos ligados a enzima indirectos obtuvieron absorbancias de 0.368-0.502, ensayo donde se usó antígeno crudo de *B. bovis* para sensibilizar la placa. Las diferencias en las absorbancias reportadas por Figueiredo *et al.* (2000) y Jing *et al.* (2018) con respecto a este trabajo se deben a que los cultivos celulares no son homogéneos, el ritmo de crecimiento varía día con día, además del hecho que las clonas utilizadas en estos trabajos no están emparentadas ni su tratamiento fue el mismo (Chua, 2016). Para evitar estas dificultades, se recomienda la purificación y cuantificación de los anticuerpos producidos, con la finalidad de que sean usados de forma comercial. De igual manera es recomendable la utilización de biorreactores o sistema de cultivo de perfusión continua, esto es debido al bajo rendimiento de los hibridomas (García, 2011).

En ese trabajo se obtuvo una absorbancia de 0.19, la cual se encuentra por debajo de lo reportado por Figueiredo *et al.* (2000) y Jing *et al.* (2018), esto puede ser explicado debido a la edad del sobrenadante, el cual fue analizado 4 meses después de su obtención. Los sobrenadantes de cultivo no deben ser almacenados por un periodo mayor a 60 días (Chua, 2016).

En la ELISA con antígeno crudo se observaron absorbancias mayores a menor concentración de SFB, donde el valor más alto se obtuvo a 2% de SFB, esto contradice a los

resultados obtenidos por Manna *et al.* (2015) quienes obtuvieron un mejor rendimiento de anticuerpos en el medio de control, a 10% de SFB. No obstante, en la ELISA con péptido lineal los valores obtenidos corresponden a los obtenidos por Manna *et al.* (2015). Esto puede ser debido a que la ELISA con antígeno crudo fue realizada pocos días después de terminar la adaptación, mientras que la ELISA con péptido lineal fue realizada varios meses después.

Se hipotetiza que la proteína GP-45 interviene en la unión de la babesia con los eritrocitos de bovino, acto que permite la invasión del parásito (Carcy *et al.*, 2006). Al realizar la inmunofluorescencia se esperaba un patrón sobre la membrana del parásito, no obstante, el patrón de fluorescencia en los controles positivos fue diferente a los observados en los sobrenadantes de cultivo. Los controles positivos presentaron un patrón de fluorescencia bien definido, mientras que en los sobrenadantes de cultivo se observó un puntillado sobre estructuras semejantes a babesia. Esto puede deberse a que los anticuerpos policlonales, como los del control positivo, se unen a una diversa cantidad de epítomos de su antígeno, provocando un patrón distinto de fluorescencia (Weis & Carnahan, 2017).

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los reportados en el trabajo de Figueiredo *et al.* (2000), las cuales reconocieron diferentes antígenos de *B. bovis* al ser evaluadas por inmunofluorescencia. La gran mayoría reconoció el parásito en su totalidad, mientras que otras reconocían la superficie o las regiones polares de la babesia.

En el trabajo realizado por Fisher *et al.* (2001) se produjo un anticuerpo monoclonal al inmunizar ratones con merozoitos de *B. bigemina*, el cual reconoce la proteína GP-45. No obstante, este anticuerpo solamente se une a los merozoitos de la cepa utilizada en la inmunización y a una clona derivada de esta cepa. El anticuerpo monoclonal producido en este trabajo reconoció a la babesia en cepas diferentes a la suya.

Se debe aclarar que los anticuerpos monoclonales mencionados en esta discusión (Jing *et al.*, 2018; Figueiredo *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2019; Fisher, McElwain, & Palmer, 2001) son IgG de ratón. Los anticuerpos monoclonales obtenidos en este trabajo son de isotipo IgM. De igual manera los anticuerpos producidos en esos trabajos fueron purificados,

mientras que en este trabajo se utilizaron directamente los sobrenadantes de cultivo, lo cual puede explicar varias de las diferencias encontradas con estos trabajos.

La mayoría de anticuerpos monoclonales difiere en la identificación de su antígeno, al ser probado en diversas pruebas. Esto es debido a la diferencia entre la proteína nativa, una fijada y la proteína desnaturalizada (Taussig *et al.*, 2018). De igual manera, se debe considerar que el epítipo donde se une el anticuerpo monoclonal puede no estar disponible entre diferentes experimentos. Las interacciones proteína-proteína pueden enmascarar el epítipo, sobre todo en experimentos como las inmunofluorescencias donde se usa antígeno nativo. Estas interacciones pueden ser alteradas por la naturaleza de las muestras (Weis & Carnahan, 2017); las características de los sobrenadantes de cultivo no son uniformes, la diferencia de pH puede influenciar en el anclaje del parátipo con su antígeno.

VII. CONCLUSIÓN

Se produjo un anticuerpo monoclonal contra la proteína GP-45. El anticuerpo monoclonal provino de hibridomas de ratón inmunizados con la proteína recombinante.

Se logró preservar un hibridoma adaptados a un medio libre de suero fetal bovino, el cual aún conserva su capacidad para producir un anticuerpo monoclonal contra *B. bigemina*.

El anticuerpo monoclonal producido reconoce tanto la proteína nativa como el péptido lineal, esto cuando se realiza un inmunoensayo ligado a enzima, lo cual es indicativo de la especificidad del anticuerpo. Sin embargo, es necesario estandarizar las muestras obtenidas de los cultivos, para tener una aproximación real de la eficiencia de estos hibridomas.

Los resultados arrojados por las inmunofluorescencias son inconclusos; el patrón de fluorescencia es diferente entre el control positivo y los sobrenadantes de cultivo evaluados. Es necesario realizar más experimentos para argumentar si el anticuerpo monoclonal reconoce la proteína GP-45; un Western Blot podría solventar esta problemática ya que identifica a la proteína por su peso molecular.

Los hibridomas adaptados a medio libre de suero fetal bovino podrían servir como alternativa para abaratar costos de producción de anticuerpos monoclonales de manera tradicional.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Alcala, Y., Figueroa, J., Ibarra, F., Vera, Y., Cervantes, M., Salem, A., & Cuéllar, J. (2018). Development of the first georeferenced map of *Rhipicephalus* (Boophilus)spp. in Mexico from 1970 to date and prediction of its spatial distribution. *Geospatial Health*, *13*, 110-117.
- Almazán, C., Aguilar, G., Rodríguez, S., Mosqueda, J., & Pérez, A. (2018). Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. *Frontiers in Bioscience*, 1535-1551.
- Álvarez, A., Rojas, C., & Figueroa, J. (2019). Diagnostic Tools for the Identification of *Babesia* sp. in Persistently Infected Cattle. *Pathogens*, *8*(143).
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 4-15.
- Baneth, G. (2018). Antiprotozoal treatment of canine babesiosis. *Veterinary Parasitology*, 58-63.
- Bayer, V., BSN, RN, & OCN. (2019). An Overview of Monoclonal Antibodies. *Seminars in Oncology Nursing*, *35*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.08.006>
- Carcy, B., Précigout, E., Schetters, T., & Gorenflot, A. (2006). Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Veterinary Parasitology*, 33-49.
- Chauvin, A., Mareau, E., Bonnet, S., Plantard, O., & Malandrin, L. (2009). *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Veterinary Research*, S/N.

- Chua, G. (2016). Development of a low serum medium for the production of monoclonal antibody against congenital adrenal hyperplasia by hybridoma culture. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 679-685.
- Cowell, R., Tyler, R., Meinkoth, J., & DeNicola, D. (2009). *Diagnóstico citológico y hematológico del perro y el gato*. Madrid: Elsevier.
- de Paiva, F., de Souza, R., dos Reis, A., Nascimento, H., Barbosa, P., Barbosa, S., . . . Arissawa, M. (2017). Production of monoclonal antibody that recognizes zika virus and other flavivirus in serum-free conditions. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 36(6), 264-271.
- de Paiva, F., de Souza, R., dos Reis, A., Nascimento, H., Barbosa, P., Barbosa, S., . . . Arissawa, M. (2017). Production of Monoclonal Antibody That Recognizes Zika Virus and Other Flaviviruses in Serum-Free Conditions. *Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy*, 36(6), 264-271.
- Domingos, A., Antunes, S., Borges, L., & Estólio, V. (2013). Approaches towards tick and tick-borne diseases control. *Revista de la sociedad brasileña de medicina tropical*, 265-269.
- Domínguez, M., Zabal, O., Wilkowsky, S., Echaide, I., Torioni, S., Asenzo, G., . . . Florin, M. (2004). Use of a monoclonal antibody against Babesia bovis merozoite surface antigen-2c for the development of a competitive ELISA test. *Ann N Y Acad Sci*, 165-170.
- Esmailnejad, B., Tavassoli, M., Samiei, A., Abbasi, A., Shafipour, A., & Esmailnejad, N. (2018). Histopathological changes and oxidative damage in hepatic tissue of rats experimentally infected with Babesia bigemina. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 517-524.
- Estrada, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*, 53-65.

- FAO. (noviembre de 2014). *Fuentes de Carne*. Obtenido de http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_sources.html
- Figueiredo, J., Martins, M., Ribeiro, M., & Passos, L. (2000). Production and Characterization of a Panel of Monoclonal Antibodies for the Identification of Antigens of *Babesia bovi*. *Journal of Veterinary Medicine*, 121-126.
- Fisher, T., McElwain, T., & Palmer, G. (2001). Molecular Basis for Variable Expression of Merozoite Surface Antigen gp45 among American Isolates of *Babesia bigemina*. *Infection and Immunity*, 3782-3790.
- Friedman, A., & Yakubu, A. (2014). A Bovine Babesiosis Model with Dispersion. *Bulletin of Mathematical Biology*, 98-135.
- García, A. (2011). Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos. *Neurología*, 301-306.
- George, J., Pound, J., & Davey, R. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology*, 353-366.
- Gohil, S., Herrmann, S., Günther, S., & Cooke, B. (2013). Bovine babesiosis in the 21st century: Advances in biology and functional genomics. *International Journal for Parasitology*, 125-132.
- Goodger, B. (1971). Preparation and preliminary assessment of purified antigens in the passive haemagglutination test for bovine babesiosis. *Australian veterinary journal*, 47(6), 251-256.
- Green, M., & Sambrook, J. (2018). The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*.
- Gutiérrez, J. (2010). *Inmunología Veterinaria*. México: Manual Moderno.
- Hanack, K., Messerschmidt, K., & Listek, M. (2016). Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. *Protein Targeting Compounds. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 917, 11-22. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-319-32805-8_2

- Hnasko, R., & Stanker, L. (2015). Hybridoma Technology. *ELISA: Methods and protocols*, 1318, 15-28.
- Hoch, T., Goebel, J., Agoulon, A., & Malandrin, L. (2012). Modelling bovine babesiosis: A tool to simulate scenarios for pathogen spread and to test control measures for the disease. *Preventive Veterinary Medicine*, 136-142.
- Holzlohner, P., & Hanack, K. (2017). Generation of Murine Monoclonal Antibodies by Hybridoma Technology. *Journal of Visualized Experiments*, 119, 1-7. doi:<http://dx.doi.org/10.3791/54832>
- Hornbeck, P. (2015). Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Current Protocols in Immunology*, 2.1.1-2.1.23.
- Jacob, S., Sengupta, P., Paramanandham, K., Suresh, K., Chamuah, J., Rudramurthy, G., & Roy, P. (2020). Bovine babesiosis: An insight into the global perspective on the disease distribution by systematic review and meta-analysis. *Veterinary Parasitology*.
- Jaimés, J., Triana, O., Holguín, A., Tobon, A., & Mejía, A. (2018). Molecular surveillance and phylogenetic traits of *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* in cattle (*Bos taurus*) and water buffaloes (*Bubalus bubalis*) from Colombia. *Parasites & Vectors*, 1-12.
- Jalovecka, M., Bonsergent, C., Hajdusek, O., Kopacek, P., & Malandrin, L. (2016). Stimulation and quantification of *Babesia divergens* gametocytogenesis. *Parasite & Vectors*, S/N.
- Jalovecka, M., Sojka, D., Ascencio, M., & Schnitter, L. (2019). *Babesia* Life Cycle – When Phylogeny Meets Biology. *Trends in Parasitology*, 35(5), 356-368.
- Jing, H., Wu, S., Lin, X., Gao, L., & Wang, N. (2018). Characterization and application of monoclonal antibodies against channel catfish virus (CCV). *Archives of Virology*(163), 2503-2506. doi:<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3884-9>

- Lehner, A., Hitron, J., May, J., Hughes, C., Eisenberg, R., Schwint, N., . . . Tobin, T. (2011). Evaluation of Mass Spectrometric Methods for Detection of the Anti-Protozoal Drug Imidocarb. *Journal of Analytical Toxicology*, 199-204.
- Lempereur, L., Beck, R., Fonseca, I., Marques, C., Duarte, A., Santos, M., . . . Zintl, A. (2017). Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector Borne and zoonotic diseases*, 51-65.
- Levine, N. (1982). The genus atoxoplasma (Protozoa, Apicomplexa). *Journal of Parasitology*, 68(4), 719-723.
- Lohmeyer, K., Pound, J., May, M., Kammlah, D., & Davey, R. (2011). Distribution of Rhipicephalus (Boophilus) microplus and Rhipicephalus (Boophilus) annulatus (Acari: Ixodidae) Infestations Detected in the United States Along the Texas/Mexico Border. *BioOne*, 770-774.
- Ma, H., & O'Kennedy, R. (2015). The Structure of Natural and Recombinant Antibodies. *Methods in molecular biology*, 1348.
- Morel, N., Mastropaolo, M., Torioni, S., Signorini, M., & Mangold, A. (2019). Risks of cattle babesiosis (Babesia bovis) outbreaks in a semi-arid region of Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 170, S/N.
- Mosqueda, J., Olvera, A., Aguilar, G., & Cantó, G. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 1504-1518.
- Nelson, P., Reynolds, G., Waldron, E., Ward, E., Giannopoulos, K., & Murray, P. (2000). Monoclonal antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 111-117.
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., & Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 1-5.

- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acid Research*, 28(12).
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (8va ed., Vol. 2). París.
- Owen, J., Punt, J., Stranford, S., & Jones, P. (2013). *Kuby Inmunología* (Séptima ed.). México: McGraw Hill.
- Posner, J., Barrington, P., Brier, T., & Datta-Mannan, A. (2019). Monoclonal Antibodies: Past, Present and Future. *Concepts and Principles of Pharmacology*, 260, 81-141. doi:https://doi.org/10.1007/164_2019_323
- Pupin, R., Castro, C., Amaral, R., Beck, T., Almeida, F., Lino, D., & Carloto, D. (2018). Retrospective study of epidemiological, clinical and pathological findings of bovine babesiosis in Mato Grosso do Sul, Brazil (1995 –2017). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 36-42.
- Rajewsky, K. (2019). The advent and rise of monoclonal antibodies. *Nature*, 575, 47-49.
- Rodríguez, R., Grisi, L., Pérez, A., Silva, H., Torres, J., Fragoso, H., . . . García, D. (2017). Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 61-74.
- Rojas, C., Rodríguez, R., Figueroa, J., Acosta, K., Gutiérrez, E., & Álvarez, J. (2017). Putrescine: Essential factor for in vitro proliferation of *Babesia bovis*. *Experimental Parasitology*, 79-84.
- Rojas, C., Rodríguez, R., Figueroa, J., Bautista, C., Castañeda, R., Lira, J., . . . Álvarez, J. (2018). ovine babesiosis: Cattle protected in the field with a frozen vaccine containing *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* cultured in vitro with a serum free medium. *Parasitology International*, 190-195.

- Romero, D., Mira, A., Mosqueda, J., García, Z., Hidalgo, M., Ortíz, N., . . . Schnittger, L. (2016). Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Veterinary Parasitology*, 101-107.
- Rosario, R., Almazán, C., Miller, R., Domínguez, D., Hernández, R., & de la Fuente, J. (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers of Bioscience*, 2657-2665.
- Saad, C., & Shuai, Z. (2015). Models of Bovine Babesiosis Including Juvenile Cattle. *Bulletin of Mathematical Biology*, 514-547.
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (26 de junio de 2020). *Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata Boophilus spp.* Obtenido de <https://www.gob.mx/senasica/documentos/situacion-actual-del-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
- Shah, K., & Maghsoudlou, P. (2016). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *British Journal of Hospital Medicine*, 98-101.
- Shahi, S., Zununi, S., Fathi, N., & Sharifi, S. (2018). Polymerase chain reaction (PCR)-based methods: Promising molecular tools in dentistry. *Biological Macromolecules*, 983-992.
- SIAP-SADER. (2019). *Población ganadera*. Obtenido de <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-pecuaria?idiom=es>
- Sozzi, E., Moreno, A., Lelli, D., Perulli, S., Prospero, A., Brocchi, E., . . . Lavazza, A. (2018). Development and validation of a monoclonal antibody-based competitive ELISA for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV). *Research in Veterinary Science*, 106-110. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.011>
- Stanker, L., & Hnasko, R. (2015). A Double-Sandwich ELISA for Identification of Monoclonal Antibodies Suitable for Sandwich Immunoassays. *Methods in Molecular Biology*, 69-78.

- Suárez, C., & Noh, S. (2011). Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*, 109-125.
- Suárez, C., Alzán, H., & Cooke, B. (2019). Unravelling the cellular and molecular pathogenesis of bovine babesiosis: is the sky the limit? *International Journal of Parasitology*, 183-197.
- Taussig, M., Fonseca, C., & Trimmer, J. (2018). Antibody validation: a view from the mountains. *New Biotechnology*, 1-8.
- Thompson, C., Baravalle, M., Torioni, S., Shkap, V., Mangold, A., Farber, M., & Echaide, I. (2007). Utilidad del gen gp45 como marcador genético de Babesia bigemina. *Society for Tropical Veterinary Medicine*, 209.
- Tizard, I. (2009). *Inmunología Veterinaria*. Barcelona: Elsevier.
- Tomita, M., & Tsumoto, K. (2011). Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, 3, 371-380. doi:<https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.2217%2Fimt.11.4>
- Tuvshintulga, B., Sivakumar, T., Yokoyama, N., & Igarashi, I. (2019). Development of unstable resistance to diminazene aceturate in Babesia bovis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 87-92.
- Uilenberg, G. (2006). Babesia: A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138, 3-10.
- USDA. (abril de 2020). *International Baseline Data*. Obtenido de <https://www.ers.usda.gov/data-products/international-baseline-data/international-baseline-data/#2019%20International%20Long-Term%20Projections%20to%202028>
- Wang, P., Song, J., Song, R., Zhang, M., Wu, L., Li, F., . . . Liao, M. (2019). Preparation of monoclonal antibodies against Bc48 and development of a rapid detection assay for

infection with *Babesia caballi* in China. *Folia Parasitologica*, 66.
doi:10.14411/fp.2019.005

Weis, F., & Carnahan, R. (2017). Characterizing Antibodies. *Cold Spring Harb Protocols*, 857-869.

Wong, Y., Othman, S., Lau, Y., Radu, S., & Chee, H. (2017). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 626-643.

Wootla, B., Denic, A., & Rodríguez, M. (2014). Polyclonal and Monoclonal Antibodies in Clinic. *Methods in Molecular Biology*, 1060.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

IX. APÉNDICES

9.1 Reactivos

- 2-propanol 1 l. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 9084-02
- Acetona 4 l. Marca Jalmek. Número de catálogo 67-64-1.
- Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) anhidro 500g. Marca Meyer. Número de catálogo 72-92-9.
- Ácido sulfúrico 1 l. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 9681-02.
- Agua destilada 20 l. Marca Ecopura.
- Agua estéril para uso inyectable 1000mL. Marca PISA Farmacéutica.
- Alcohol etílico 20 l. Marca Ecopura. Número de catálogo 64-17-15.
- Aminoácidos no esenciales para medio MEM. Solución. Marca Gibco. Referencia 11140-050.
- Anticuerpo de burro acoplado a Alexa flúor 488 anti IgM cadena específica de ratón. Marca Jackson Immunoresearch. Código 715-545-020.
- Anticuerpo de cabra acoplado a peroxidasa de rábano anti H+L cadena μ de ratón. Marca Jackson Immunoresearch- Código 115-035-146.
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) 500 g. Polvo. Marca J.T. Baker. Número de catálogo 3506-01.
- Carbonato de sodio monohidratado ($Na_2CO_3 \cdot H_2O$), cristal 500g. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3598-01.
- Citrato de sodio dihidrato, granular 500g. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3646-01.
- Cloruro de potasio (KCl) 500g. Marca Research Organics. Número de catálogo 0714P.
- Cloruro de sodio (NaCl), cristal 2.5kg. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 3624-05.
- Curva estándar de albúmina sérica bovina. Marca BioRad. Número de catálogo 500-0207.

- DAPI 50 mg. Marca Sigma-Aldrich. Número de catálogo 28718-90-3.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) 10ml. Ampolleta. Marca Sigma. Número de catálogo 68-67-5.
- Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 500g. Marca Research Organics. Número de catálogo 0712P.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4) 500g. Marca Jalmek. Número de catálogo 7558-79-4.
- Glicerina 1l. Marca Jalmek. Número de catálogo G0925-13.
- HEPES. Polvo. Marca MP Biomedicals. Número de catálogo 194550.
- Inhibidor de proteasas, tabletas. Marca Roche. Número de catálogo 11836170001.
- Leche descremada 500g. Marca Difco. Número de referencia 232100.
- Medio Eagle Modificado por Dulbecco en polvo. Marca Gibco. Número de catálogo 12100046.
- Medio para hibridomas libre de proteínas 1 l PFHM-II. Marca Gibco. Código de Catálogo 12040077.
- Orto-fenilendiamina (OPD) 5 g. Marca Sigma. Número de catálogo P23938.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% 1l. Marca J. T. Baker. Número de catálogo 7722-84-1.
- Piruvato de sodio S8636-100ml. Solución. Marca Sigma. Número de catálogo 113-24-6.
- Polioxietileno-20 (Tween-20) 500ml. Marca Biotech. Número de catálogo 9005-64-5.
- Reactivo de Bradford 500ml. Marca Sigma. Número de catálogo B6916.
- Suero fetal bovino (SFB) 500 ml. Marca Gibco. Número de catálogo A4766801.

9.2 Material

- Contenedor para congelar células CoolCell LX. Marca Corning. Número de catálogo CLS432001.

- Filtros para jeringa de 28 mm con membrana de 0.22 μm . Marca Corning. Número de producto 431219.
- Frascos de cultivo de 25 cm^2 . Marca Corning. Número de producto 430168.
- Frascos de cultivo de 75 cm^2 . Marca Corning. Número de producto 430720U.
- Jeringa de 50 ml sin aguja. Marca Terumo. Número de producto SS*50.
- Microplaca de 96 pozos de alta unión 3590. Marca Costar. Número de producto COR-3590.
- Microplaca de 96 pozos sin afinidad de unión. Marca Greiner. Número de catálogo 89131-676.
- Pipeta 0.5-2 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV10.
- Pipeta 100-1000 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV1000.
- Pipeta 20-200 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV200.
- Pipeta 2-20 μl omniPette. Marca Cleaver Scientific. Número de catálogo CV20.
- Pipeta de 8 canales Finnpipette F1 volumen 10-100 μl . Marca Thermo Scientific. Número de catálogo 46S1020.
- Pipeta de 8 canales Finnpipette F1 volumen 30-300 μl . Marca Thermo Scientific. Número de catálogo 4661030.
- Pipeta serológica estéril. Paquete individual. Marca NEST. Número de catálogo 327001.
- Pipeta serológica estéril. Paquete individual. Marca NEST. Número de catálogo 328001.
- Pipeteador automático MaxPette. Marca Tomos.
- Separador celular de 100 μm . Marca BD Falcon. Número de producto 352360.
- Tubos cónicos para centrífuga 15 ml. Bolsa. Número de catálogo 601052.
- Tubos cónicos para centrífuga 50 ml. Bolsa. Número de catálogo 602052.

9.3 Equipo

- Agitador orbital de sobremesa MaxQ4450. Marca Thermo Scientific. Modelo SHKA4450.
- Balanza analítica 0.1 mg- 220 g AX224. Marca Sartorius Mecatronics. Serio M-Pact.
- Baño María. Marca Anova Inc. Modelo 6W.
- Campana de flujo laminar. Marca ESCO Global. Modelo AC2-3S9.
- Centrifuga multifunción refrigerada CR3i. Marca Thermo Electron Corporation. Número de catálogo 11175774.
- Incubadora CO2cell 50 standard. Marca Grupo MMM. Número de serie LS 13049.
- Lector de microplacas iMark. Marca Bio-Rad. Número de serie 13600.
- Mezclador VX-200. Marca Labnet. Número de catálogo S0200.
- Microcentrífuga de alta velocidad LSE. Marca Corning. Número de catálogo 6765-HS.
- Microscopio de fluorescencia DM2500. Marca Leica. Número de serie 123456-062011
- Microscopio invertido Axiovert 25. Marca Zeiss. Número de serie 662377.
- Potenciómetro. Marca Hanna Instruments. Modelo HI 2211.
- Ultra congelador -70 °C Revco. Marca Thermo Scientific.

9.4 Soluciones

Medio DMEM 10% SFB (pH 6.8)	
1 sobre de medio DMEM	13.4 g
NaHCO ₃	2 g
HEPES	2 g
Antibiótico-antimicótico	16 ml
L-glutamina	16 ml
Aminoácidos no esenciales	10 ml

Piruvato de sodio	0.2 g
Suero fetal bovino descomplementado	100 ml
Agua inyectable	Cbp 1000ml
*Filtrar con membrana de 0.22 μ m y almacenar a 4 °C	

Solución crioprotectora 10ml	
SFB descomplementado	9 ml
DMSO	1 ml
*Almacenar a 4 °C	

Amortiguador de carbonatos pH 9.6 100 ml	
Na ₂ CO ₃	0.318 g
NaHCO ₃	0.586 g
Agua destilada	Cbp 1000 ml
*Almacenar a 4 °C	

Amortiguador salino de fosfatos Tween 20 (PBS-Tween) pH 7.4 1000 ml	
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.4 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Tween 20	0.5 ml
Agua destilada	Cbp 1000 ml

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) pH 7.4 1000 mL	
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.4 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Agua destilada	Cbp 1000 ml

Anticuerpo secundario ELISA 1:2000 10mL	
Anti H+L cadena μ específica	5 μ l

PBS-Tween 20	9.995 μ l
--------------	---------------

Solución reveladora ELISA 10 mL	
Ácido cítrico 0.1 M	5 ml
Citrato de sodio 0.1 M	5 ml
Peróxido de hidrógeno	4 μ l
OPD	4 mg

Anticuerpo secundario IFI 1:200 1mL	
Anticuerpo de burro Alexa 488	5 μ l
DAPI 100 μ g/mL	10 μ l
PBS-Tween 20	985 μ l

Glicerina fosfatada 10 mL	
Glicerina	5 ml
PBS	5 ml