



**Universidad
Norbert Wiener**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**PARÁMETROS ÓPTIMOS PARA ESTANDARIZAR UN ELISA TIPO
SÁNDWICH CON ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL
DIAGNÓSTICO DE NEUROCISTICERCOSIS HUMANA EN
MUESTRAS DE ORINA**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA
EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y
ANATOMIA PATOLÓGICA**

Presentado por:

AUTOR: SANTOS SALAZAR, YESICA

ASESOR: Dr. BENITES AZABACHE, JUAN CARLOS

LIMA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

Dedicado a mi hermosa familia, principalmente a mis padres Noimi y Victoriano, por su constante apoyo y comprensión, son mi principal soporte, gracias por su cariño y por darme las fuerzas para seguir adelante y así culminar con la realización del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecer infinitamente al Dr. Héctor Hugo García Lescano y al Dr. Javier Arturo Bustos Palomino.

Gracias a ellos se pudieron canalizar los fondos FONDECYT para el proyecto *“Desarrollo de un Biosensor en Base a Partículas Magnéticas para el Diagnóstico de Neurocisticercosis Humana.”*

Quiero agradecer en especial a la Blga. Yesenia Castillo Berrios, que me apoyo en procesamiento y asesoría en todo momento, gracias a su gran apoyo y su paciencia para realizar este trabajo.

Finalmente agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Inmunología Parasitaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – LID, en especial a Cindy Espinoza Guerrero, por su constante apoyo y consejos en la realización de distintos ensayos, no ha sido sencillo el proceso, pero gracias a las ganas y ser constante, he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo y redacción de la presente tesis.

ASESOR

Dr. Benites Azabache, Juan Carlos.

JURADO

Presidente

Dr. Javier Francisco Casimiro Urcos.

Secretario

Dr. Alfonso Martin Cabello Vílchez.

Vocal

Mg. César Alfonso Champa Guevara.

INDICE

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTO	4
ASESOR.....	5
JURADO.....	6
INDICE.....	7
INDICE DE TABLAS / GRAFICOS.....	8
RESUMEN.....	10
SUMARY	12
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	13
1.1 Planteamiento del problema	13
1.2 Formulación del problema	15
1.3 Justificación.....	15
1.4 Objetivos	17
1.4.1 Objetivos generales.....	17
1.4.2 Objetivos específicos	17
CAPITULO II: MARCO TEORICO.....	18
2.1 Antecedentes	18
2.2 Base teórica	21
2.3 Terminología básica.....	35
2.4 hipótesis	36
2.5 variables.....	36
CAPITULO III: DISEÑO METODOLOGICO.....	37
3.1 Tipo y nivel de investigación.....	37
3.2 Población y muestra	37
3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	38
3.4 Procesamiento de datos y análisis estadístico	39
3.5 Aspectos éticos.....	51
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION.....	52
4.1 Resultados	52
4.2 Discusión.....	75
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
5.1 Conclusiones	77
5.2 Recomendaciones	77
REFERENCIAS.....	78
ANEXOS.....	86

INDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO 1	53
GRÁFICO 2	57
GRÁFICO 3	60
GRÁFICO 4	61
GRÁFICO 5	62
GRÁFICO 6	63
GRÁFICO 7	65
GRÁFICO 8	65
GRÁFICO 9	68
GRÁFICO 10	69
GRÁFICO 11	70
GRÁFICO 12	71
GRÁFICO 13	74

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.....	47
TABLA 2.....	48
TABLA 3.....	49
TABLA 4.....	49
TABLA 5.....	50
TABLA 6.....	54
TABLA 7.....	55
TABLA 8.....	56
TABLA 9.....	72

RESUMEN

La neurocisticercosis humana (NCC) es una infección causada por el cisticerco de *T. solium*, afecta principalmente al cerebro, causando mayormente epilepsia en los países en desarrollo y siendo un problema de salud pública.

Se han implementado y adaptado una variedad de técnicas serológicas para el mejoramiento del diagnóstico y estudio de esta parasitosis; sin embargo, son pocos los estudios con manejo de anticuerpos monoclonales en el desarrollo de las mismas. El objetivo del presente estudio fue determinar parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich empleando anticuerpos monoclonales *anti T. solium* en muestras de orina.

Se realizó satisfactoriamente la biotinilación de los 4 mAbs (TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11), en la selección simultanea de placas se determinó la Immulón 4HBX y en solución bloqueante con leche Carnation al 2% obtuvieron el mejor ratio 23.6. En la evaluación de buffer de adherencia se seleccionó el buffer Phosphate buffered saline Dulbecco – PBS pH 7.2(Oxoid), determinando la concentración óptima para el mejor par de mAbs para la detección de antígeno, resultando como anticuerpo de captura el TsW8 (4ug/ml) y como anticuerpo de detección biotinilado el TsW5 (4ug/ml), en la selección de sustrato, presento mayor ratio 64 el O- Phenylene diamine dihydro – Chloride (OPD); con el tiempo de incubación de 15 min para finalmente agregar la solución de parada (H₂SO₄ 2N). Todas las evaluaciones se realizaron con muestras control de orina positivo y negativo y la reactividad se expresó en ratio (positivo OD / negativo OD).

Los parámetros óptimos para el ELISA tipo sándwich diseñado muestra la utilidad potencial para el diagnóstico y puede ser útil para la monitorización posterior al tratamiento de pacientes con infecciones viables de NCC.

Palabras clave: ELISA, anticuerpos monoclonales, neurocisticercosis.

SUMMARY

Human neurocysticercosis (NCC) is an infection caused by the cysticercus of *T. solium*, mainly affects the brain, mostly causing epilepsy in developing countries and being a public health problem.

A variety of serological techniques have been implemented and adapted for the improvement of the diagnosis and study of this parasitosis; however, there are few studies with monoclonal antibody management in their development.

The objective of this study was to determine optimal parameters to standardize a sandwich ELISA using monoclonal antibodies against *T. solium* in urine samples.

The biotinylation of the 4 mAbs (TsW5, TsW7, TsW8 and TsW11) was successfully carried out, in the simultaneous selection of plates the Immulon 4HBX was determined and in a blocking solution with 2% Carnation milk they obtained the best ratio 23.6. In the adhesion buffer evaluation, the Phosphate buffered saline Dulbecco buffer - PBS pH 7.2 (Oxoid) was selected, determining the optimal concentration for the best pair of mAbs for the detection of antigen, resulting TsW8 as capture antibody (4ug / ml) and as a biotinylated detection antibody to TsW5 (4ug / ml), in the substrate selection, the O-Phenylenediaminedihydro-Chloride (OPD) showed a higher ratio 64; the incubation time being 15 min to finally add the stop solution (H₂SO₄ 2N). All evaluations were performed with positive and negative urine control samples and the reactivity was expressed as a ratio (positive OD / negative OD).

The optimal parameters for the designed sandwich ELISA show the potential utility for diagnosis and may be useful for post-treatment monitoring of patients with viable NCC infections.

Keywords: ELISA, monoclonal antibodies, neurocysticercosis.

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La cisticercosis humana es una enfermedad parasitaria que constituye un problema de salud pública en los países en desarrollo de América Latina, África y Asia. Especialmente cuando el cisticerco o forma larvaria de *T. solium* se desarrolla en el sistema Nervioso Central SNC, causando neurocisticercosis (NCC), afectando principalmente el cerebro y causando cefaleas y cuadros de epilepsia o posibles efectos perjudiciales en la salud ^{(1) (2)}.

En el Perú, como en otros países del tercer mundo, la neurocisticercosis es la patología a considerar cuando enfrentamos un paciente con cualquier manifestación neurológica, principalmente epilepsia, siendo el 30% el causante en muchas zonas endémicas donde hay cerdos que viven en libertad y están cerca de donde viven las personas ⁽³⁾.

Esta infección es causada por el céstodo *Taenia solium* que pertenece a la familia *Taeniidae*, que incluye tres parásitos que afectan a los seres humanos: *Taenia solium* (tenia del cerdo), *Taenia saginata* (*Taenia bovina*) y *Taenia asiática*, una solitaria que es morfológicamente similar a *Taenia saginata*, pero biológicamente análoga a *Taenia solium*. De éstos, *Taenia solium* es el más relevante como patógeno en el ser humano ya que la infección del sistema nervioso se da por el estado larvario del cestodo causando NCC que es una de las principales causas de convulsiones y discapacidad neurológica en el mundo ⁽⁴⁾.

En la NCC los signos y síntomas son diversos considerándola una enfermedad pleomórfica y dependen de varios factores como la cantidad, la ubicación, el crecimiento, la fase de degeneración e inflamación, factores del huésped y el

genotipo del parásito ⁽⁵⁾.

Para el diagnóstico de NCC se basa en hallazgos clínicos, epidemiológicos, pruebas serológicas y estudio de imágenes donde generalmente se explora el cerebro haciendo uso de estos principales métodos de neuroimágenes como tomografía axial computarizada (TAC) o Resonancia Magnética Nuclear (RMN), esta última es considerada como la técnica de elección en la práctica clínica, ya que es más sensible que la TAC para diagnóstico de neurocisticercosis activa. Estos métodos de imagen cerebral muestran el número, localización y estadio evolutivo del cisticerco evidenciando la extensión de las lesiones; pero a veces no son de mucha utilidad cuando el número de cisticercos es bajo o las imágenes no son concluyentes, a esto se suma el costo y la accesibilidad del equipo en campo. También se hace uso de las pruebas inmunológicas como EITB (*Inmuno-electrotransferencia o Western Blot*) y ELISA (*Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas*) empleando muestras de suero, líquido cefalorraquídeo (LCR) y orina ^{(6 (7)(8))}.

La técnica de Western Blot detecta anticuerpos contra los antígenos de glicoproteína purificada del cisticerco de *T. solium*, que son absorbidos en una membrana, siendo específico al 100% y sensible de 94% a 98%, y por lo cual se considera la prueba de elección para el diagnóstico y es útil en suero como en LCR; pero es más sensible y específico en suero ⁽⁹⁾. La técnica de ELISA que emplea antígenos crudos o parcialmente purificados del cisticerco de *T. solium*, o de parásitos relacionados como *T. saginata*, *T. crassiceps* o proteínas recombinantes o sintéticas para la detección de anticuerpos (Ab) (ELISA – Ab) pero no diferencia entre las formas viables y no viables del parásito. ⁽¹⁰⁾ Mientras que el ELISA de captura para la detección de antígeno (Ag) circulante que utiliza anticuerpo monoclonal (mAb) de *T. saginata*, pero que reacciona de forma cruzada con *T. solium* (ELISA-Ag) con

85% de sensibilidad y 92% de especificidad ⁽¹¹⁾ detecta directamente la viabilidad del parásito, comprobando la presencia de cisticercosis activa a diferencia del uso de antígenos para detectar anticuerpos que presenta limitante porque puede dar una reacción cruzada con otros parásitos como el *Echinococcus granulosus* u otros métodos para identificar anticuerpos que puede ser positivos en cisticercosis inactiva. Existen otras pruebas alternas como PCR, pero son muy costosas ^{(12) (13) (14)}. Existen ensayos que detectan antígeno de *T. solium* en suero empleando anticuerpos contra *T. saginata* y no contra el cisticerco de *T. solium*; por ello este trabajo de investigación pretende desarrollar y establecer parámetros óptimos para estandarizar la técnica de ELISA tipo sándwich, empleando anticuerpos monoclonales anti- *T. solium* para la detección de antígeno en otra muestra biológica como la orina que es una alternativa a la muestra de suero o LCR.

1.2. Formulación del problema

¿Cuáles serán los parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de neurocisticercosis humana en muestras de orina?

1.3. Justificación

La neurocisticercosis, enfermedad cerebral parasitaria más común en todo el mundo, considerada un problema de salud pública, principalmente de zonas menos desarrolladas, como es el caso de América Latina, en donde existen más de 400.000 personas con NCC sintomática ⁽¹⁵⁾, donde la mayoría de los casos con NCC presentan crisis convulsivas y epilepsia, provocando deterioro de la memoria, la atención, el aprendizaje, y la conducta; por lo tanto discapacidad, y donde presentan factores comunes como la crianza del ganado porcino, mala eliminación de heces, malos hábitos de higiene y la manipulación de carne contaminada ⁽¹¹⁾⁽¹⁵⁾.

En el Perú, algunos estudios demostraron una seroprevalencia basal entre 10 y 20% en la población general, con valores de dos a tres veces más altos en individuos con epilepsia ⁽¹⁶⁾.

La NCC se caracteriza por su elevado costo para su diagnóstico, tratamiento médico (principalmente para las personas con escasos recursos económicos), y el daño que ocasiona en el cerebro (ya sea en su etapa viable o calcificada) ⁽¹⁷⁾.

Por ello este estudio desarrollará una plataforma de inmunoensayo para permitir un rápido diagnóstico de NCC, evaluando parámetros óptimos para estandarizar la técnica de ELISA tipo sándwich, empleando anticuerpos monoclonales anti- *T. solium* para la detección de antígeno excretado en orina, resaltando su importancia como reservorio de antígenos de enfermedades parasitarias. La muestra de orina tiene la facilidad para concentrar los antígenos, facilitando la detección por métodos inmunológicos. Los antígenos excretorios de orina de orina son generalmente de bajo peso molecular (menor a 70kDa); pero a pesar de ser pequeños son los suficientemente inmunorreactivos para ser detectados ⁽¹⁸⁾. Esta muestra biológica se utiliza cada vez más como una alternativa a la muestra de sangre y LCR, por no ser invasiva y de fácil obtención y su volumen ⁽¹⁹⁾.

1.4. Objetivo

1.4.1. General

- Establecer los parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de Neurocisticercosis humana en muestras de orina.

1.4.2. Específicos

- 1) Evaluar la biotilación de los anticuerpos monoclonales contra el antígeno somático de *T. solium*.
- 2) Evaluar tipos de placas, selección y concentración de la solución buffer bloqueante para la estandarización del ELISA tipo sándwich.
- 3) Determinar el tipo de solución buffer de adherencia del anticuerpo de captura al pocillo de la placa.
- 4) Determinar la concentración óptima de los anticuerpos monoclonales captura y detección contra los antígeno somático de *T. solium*.
- 5) Determinar la mejor pareja de anticuerpos monoclonales para la detección de antígeno somático de *T. solium* para la estandarización del ELISA tipo sándwich.
- 6) Determinar el tiempo de incubación y tipo de sustrato para la estandarización del ELISA tipo sándwich.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Paredes A. *et al.* El 2016, en Perú, generaron 21 anticuerpos monoclonales (mAbs) para la detección de diferentes componentes antigénicos (todo el cisticerco, fluido vesicular o producto secretorio/ excretorio) de *Taenia solium*; luego fueron caracterizados y evaluados en un ensayo de ELISA captura para la detección de antígeno circulante de *T. solium* en muestras de suero y orina, la reactividad de los anticuerpos contra las estructuras específicas de cisticerco fueron determinadas usando inmunofluorescencia e inmunohistoquímica. La generación fue exitosa de los 21 mAbs contra los cisticercos de *T. solium*, no mostraron reacción cruzada con parásitos relacionados, a excepción de *T. saginata* en algunos casos. 8 mAbs son capaces de detectar antígenos circulantes en muestras de suero y orina en humanos ⁽²⁰⁾.

Mwape K. *et al.* el 2011, en Ecuador, evaluó el rendimiento del ELISA-Ag en orina bajo condiciones de campo. Se trabajaron muestras pareadas de suero y orina de pacientes en áreas endémicas de Ecuador (n = 748) y Zambia (n = 690); se evaluaron al ELISA-Ag basado en anticuerpos monoclonales. Se obtuvieron sensibilidades similares para la detección de Ag en suero y orina, mientras que se determinó una especificidad disminuida para la orina, menor (78.6%) para muestras de Zambia que para muestras ecuatorianas (88.4%). Determinando mayor especificidad en suero en condiciones de campo ⁽²¹⁾.

García H. *et al.* el 2011, en Perú, realizaron un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de antígeno *T. solium* viables (Ag-ELISA), se evaluó 43 muestras de pre-tratamiento y 47 muestras de líquido cefalorraquídeo (CSF) de pacientes con NCC (TAC y EITB). La sensibilidad del ensayo fue del 86%.

Los pacientes con hidrocefalia tenían mayor nivel de antígeno circulante. Los niveles de antígeno se correlacionaron de manera significativa con el número de quistes vivos detectados por TAC y también fueron proporcionales al número y la intensidad de las reacciones de anticuerpos reconocidas por la prueba EITB. El uso de pruebas de detección de antígenos tiene utilidad inmediata en el contexto clínico, no solo brinda información importante sobre la viabilidad del parásito, sino que también ayuda a una mejor comprensión de la patogénesis de NCC antes y después del tratamiento ⁽²²⁾.

Castillo Y. *et al.* el 2009, en Perú, detectaron antígeno *T. solium* en muestras de orina para diagnosticar neurocisticercosis (NCC). Usaron ELISA basado en anticuerpos monoclonales para detectar antígenos de *T. solium* en orina de 87 pacientes con NCC (quistes viables, N = 34, cisticercosis subaracnoidea, N = 10, parásitos degenerados, N = 7, lesiones calcificadas, N = 36) y 32 voluntarios de un área no endémica de Perú. La sensibilidad de la detección de antígenos viables fue del 92%, que disminuyó al 62,5% en pacientes con un único quiste. La mayoría de los pacientes con cisticercosis calcificada fueron negativos (30/36, 83%). Concluyendo que los niveles de antígeno en muestras de suero - orina (19 pacientes) se correlacionaron fuertemente, siendo una alternativa útil para el diagnóstico de NCC ⁽²³⁾.

Parija M. *et al.* el 2004, en la India, desarrollaron y evaluaron la prueba de Co-aglutinación estafilocócica (Co-A) para la detección de antígeno cisticerco excretadas en la orina. Se usó para la prueba antisuero policlonal producido en conejos contra el cisticerco completo. Las muestras de orina fueron colectadas de 9 casos de sospecha clínica de NCC, 8 casos de CT / MRI casos de NCC, 11 de CNS controles de infección no presentan cisticercos, y 25 sujetos de control sanos. El Co-

A detectó cinco de nueve (55.5%) clínicamente diagnosticados con NCC y cinco de ocho (62.5%), CT / MRI de casos probados de NCC. Una falsa reacción positiva 1 de 11 (9%) de los controles de infección del CNS no cisticercos. Esto demuestra que la prueba Co-A puede emplearse como una prueba moderadamente sensible y específica para la detección de antígeno urinario en el diagnóstico de NCC en laboratorios mal equipados ⁽²⁴⁾.

Tinoco Y. et al. el 2004, en Perú, demostraron la utilidad de un ELISA captura de antígeno basado en anticuerpos monoclonales (ELISA-Ag) con el fin de monitorear la persistencia del antígeno en animales tratados con oxfendazol. Se trabajó con muestras de sueros que corresponden al seguimiento pre y post tratamiento de cerdos infectados con cisticercos y tratados con oxfendazol. También se utilizó el archivo de necropsias y fichas de evaginación, demostrando la utilidad del ELISA-Ag en el control cuantitativo del comportamiento y la persistencia de antígenos de secreción – excreción de *Cysticercus cellulosae* en animales infectados en el periodo post-tratamiento de la enfermedad. El estudio concluye que es necesario realizar monitoreo en mayor cantidad de cerdos infectados y tratados con cisticidas a fin de validar la utilidad del método ⁽²⁵⁾.

Brandt S. et al. el 1992, en Bélgica, desarrollaron un ELISA tipo sándwich (doble anticuerpo) basado en la producción de anticuerpos monoclonales (mAbs) para la detección de antígenos secretores y excretos (S/E) circulantes en la cisticercosis de *Taenia saginata*. Se obtuvieron 8 anticuerpos monoclonales de isotipo IgM; pero solo dos de los mAbs 12G5 (anticuerpo de captura) y 2H8 (anticuerpo biotinilado) mostraron ser altamente reactivos con el tegumento del cisticerco *T. Saginata* y fueron capaces de reconocer componentes antigénicos de 65,87 y 100 kDa en inmunotransferencia ⁽²⁶⁾.

2.2. Base teórica

2.2.1. Cisticercosis humana

Es una zoonosis parasitaria causada por la forma larvaria del metacéstodo o cisticerco de *Taenia solium* y se aloja en diferentes tejidos del organismo como músculos, corazón y cerebro ⁽²⁷⁾.

El ser humano se infecta accidentalmente al ingerir alimentos contaminados con huevos *T. solium* que han sido eliminadas a través de las heces de una persona infectada, o por autoinfección fecal - oral cuando la persona portadora de *Taenia* se infecta a sí mismo con los huevos *T. solium* por la falta de higiene ⁽²⁸⁾.

2.2.2. Neurocisticercosis Humana

Enfermedad pleomórfica, causada por la invasión del cisticerco en el sistema nervioso central SNC, la cual se encuentra en un estado denominado vesicular, en las que son viables y desencadenan cambios mínimos como inflamación, estos pueden permanecer décadas en este estadio o entrar, como resultado de un ataque inmunológico del huésped, en un proceso degenerativo la cual termina con su destrucción. Los cisticercos atraviesan por una serie de estadios hasta su destrucción, comprendiendo: estadio coloidal, estadio granular y estadio calcificado. Cada uno de ellos se caracteriza por cambios específicos en el interior del parásito, por cambios en el tejido y por alteraciones específicas visualizadas por neuroimagen

^{(29) (30)}.

Los cisticercos se pueden alojar en el espacio subaracnoideo (meníngea), en los ventrículos cerebrales (ventricular) y en el parénquima (parenquimatosa) del encéfalo y médula espinal. Esta distribución variada también es un factor en determinar la forma y dimensión de los parásitos: los ventriculares y subaracnoideos tienden a ser más grandes y frecuentemente multilobulados (racemosa), mientras

que los de forma parenquimatosa generalmente son vesículas únicas, ovoides o esféricas, más o menos homogéneas, de 0.5 a 1 cm de diámetro ⁽³¹⁾.

2.2.3. Clasificación Taxonómica

Taenia solium es un helminto que pertenece:

- **Reino:** Animalia
- **Filo:** Platyhelminthes
- **Clase:** Cestoda
- **Orden:** Cyclophyllidea
- **Familia:** Taeniidae
- **Género:** *Taenia*
- **Especie:** *solium*

2.2.4. Agente etiológico

Taenia solium al igual que otras especies del género *Taenia* es un gusano plano segmentado de color amarillo blanquecino, sus diferentes etapas de desarrollo deben ser reconocidos, incluyendo la *Taenia* adulta, el huevo, el embrión (oncósfera), y la larva (cisticerco).

La *Taenia* adulta tiene una cabeza denominada escólex que consta de cuatro ventosas y un róstelo con dos filas de ganchos, estructuras esenciales para su fijación en el intestino delgado del humano, posee un cuello estrecho y un cuerpo compuesto de varios proglótides ⁽³²⁾, dado por el proceso de estrobilación (producción de proglótides) que ocurre en la región distal del cuello que son segmentos de proglótides independientes pero unidos entre sí, que aproximadamente mide entre 1.5 y 5 metros de longitud, los proglótides tienen

diferentes etapas de desarrollo: las proximales son los proglótidos más cercanas al cuello llamados inmaduros, seguido de los proglótidos maduros y los proglótidos distales son las grávidos, y son más largas que anchas, presentan un útero grande con una rama central a lo largo del anillo con 7 a 13 ramificaciones laterales principales y están repletas de huevos, entre 30.000 y 50.000 por anillo. Después de 2 ó 3 meses de la infección, 4 o 5 proglótidos grávidas se liberan cada día en las heces del huésped y la ingestión de un proglótido grávido o parte de éste puede dar lugar a varios cientos de cisticercos en el huésped intermediario (hombre o cerdo) ⁽⁹⁾

⁽³¹⁾ ⁽³³⁾ ⁽³⁴⁾. Las características sobresalientes de los cestodos es que carecen de boca y de vía digestiva, y en reemplazo de eso el tegumento que los rodea cumple la función de absorción, digestión, protección y tracción ⁽³³⁾.

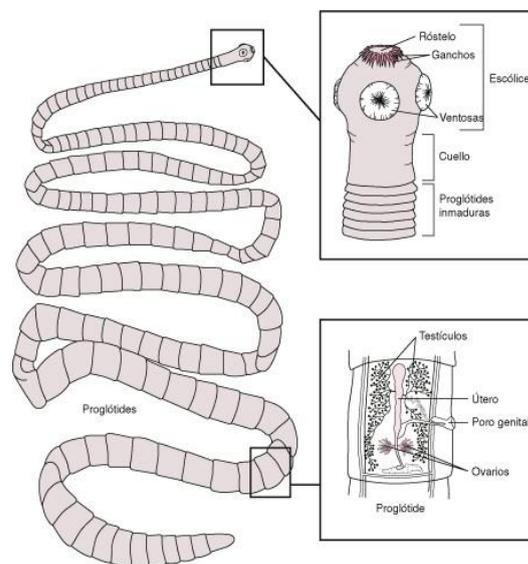


Imagen 1: Estructura de *Taenia solium*

Fuente: Manual de MSD

Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/cestodos-tenias/generalidades-sobre-las-infecciones-por-tenias#resourcesInArticle>

Los huevos *T. solium* son redondos o esféricos y miden entre 20 a 50 micras, de color amarillo - pardo marronacéo, presenta una cubierta irradiada de varias envolturas que le brindan supervivencia a la oncósfera, haciéndolos extremadamente resistentes a temperaturas ambientales y son la forma infectiva en la cisticercosis. Morfológicamente son idénticos a los huevos de *T. saginata*. La envoltura más externa es el vitelo o cápsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio, permite la obtención de nutrientes y solo se presenta en los huevos inmaduros. La siguiente envoltura es el embrióforo, formado por pequeños bloques proteicos unidos entre sí, es importante en la protección de la oncósfera y confiere a los huevos la apariencia física radiada la cual es su principal característica. Finalmente se encuentra la membrana oncosferal que rodea directamente al embrión hexacanto (3 pares de gancho) ^{(10) (31) (33)}.

Cuando los huevos son liberados al ambiente desde un hospedero definitivo, muchos se encuentran desarrollados e infectivos, sin embargo, otros pueden estar en proceso de desarrollo y madurar fuera del huésped. Si son ingeridos por un hospedero intermediario (humanos o porcinos), en su tracto intestinal, el embrióforo es sensible a la digestión enzimática y las oncosferas son liberadas para cruzar la pared intestinal y entrar al torrente sanguíneo, siendo llevadas a los tejidos hasta alcanzar y desarrollarse en el tejido subcutáneo, músculo esquelético, sistema nervioso central y ojos, convirtiéndose en la forma larvaria o cisticerco ^{(34) (35)}.

El cisticerco de *T. solium* son vesículas llenas de fluido vesicular transparente de a.5 a 2cm de diámetro y está compuesto principalmente de agua, pero también contiene calcio, glicoproteínas, colinesterasa y coproporfirina; esta composición le confiere propiedades fluorescentes y antigenicidad.

Constan de dos partes principales: la pared vesicular y escólex invaginado, esta presenta una estructura similar a la *T. solium* adulta. La pared vesicular es una estructura membranosa compuesta de tres capas: una capa externa o cuticular, una capa media o celular con estructura pseudoepitelial, y una capa interna o reticular, el escólex invaginado tiene una cabeza o róstelo armado con 4 ventosas y 2 coronas de ganchos. La forma del cisticercos depende de la localización ^{(32) (36) (37)}.



Imagen 2: Microscopia de huevos de *T. solium*

Fuente: Juan Jiménez, MD, (Grupo de trabajo sobre cisticercosis en Perú)



Imagen 3: Cisticercos extraídos de la carne de cerdo.

Fuente: Dra. I. de Haro Arteaga, Fac. Medicina, UNAM. Disponible:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/taeniosis.html>

2.2.5. Ciclo Biológico

En el ciclo de la *T. solium* intervienen dos hospederos: el cerdo es el principal como hospedero intermediario y el humano como hospedero definitivo, ambos se infectan por ingestión de huevos, proglótides grávidos y alimentos contaminados con heces (hetero infección) o por autoinfección en caso de los humanos que implica una infección fecal-oral con huevos de *T. solium*, por la falta de higiene, como el lavado de manos después de la defecación y antes de ingerir alimentos ^{(6) (38)}.

El ser humano al comer carne cruda o mal cocida de cerdo infectado con cisticercos desarrolla la enfermedad denominada teniasis causada por *T. solium*. Una vez

ingerido, el cisticerco es degradado por el jugo gástrico del huésped, permitiendo la evaginación del escólex y su fijación, mediante sus coronas de ganchos y ventosas, en el tercio superior del intestino delgado. El parásito adulto se desarrolla y empieza a expulsar mediante las heces del huésped proglótidos grávidos, cargados con miles de huevos de *T. solium* contaminando el agua y la tierra, particularmente en regiones rurales donde la defecación es al aire libre y en donde los cerdos tienen acceso a alimentarse con heces de humanos, presentando un alto riesgo de ingerir el agente infectante ⁽³⁹⁾ cuando los huevos liberados son ingeridos por los cerdos, o cualquier hospedero intermediario, las enzimas digestivas y la bilis degradan la membrana del embrióforo y la membrana oncosferal, liberando a la oncósferal a cual penetra la pared intestinal y luego es transportada por los vasos sanguíneos para alojarse principalmente en el músculo esquelético y cardiaco, tejido subcutáneo y cerebro del hospedero intermediario (cerdo u hombre), en estos órganos pueden permanecer muchos años viables. Es en esta etapa en el que hombre se convierte en el hospedero intermediario accidental, al ingerir huevos de *T. solium*. Si el hombre consume carne infectada con cisticercos viables, continua el ciclo del parásito

(10) (14) (34) (40).

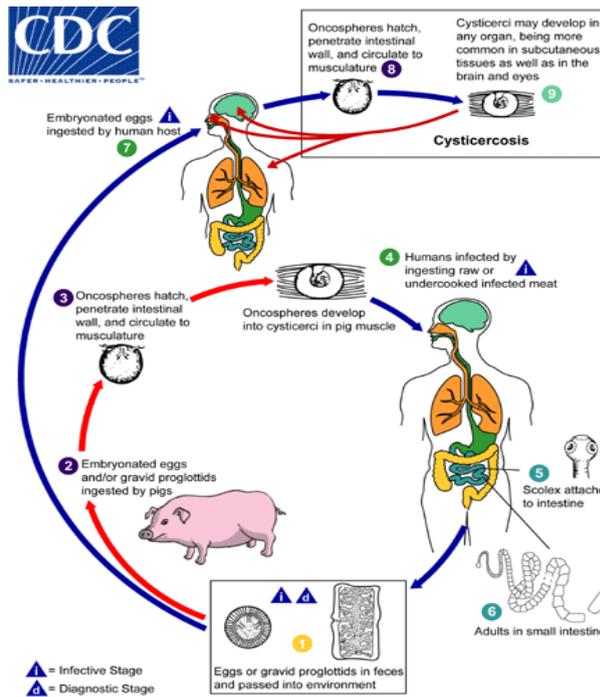


Imagen 4: Ciclo de vida de *Taenia solium*

Fuente: Centers for Disease Control and Prevention CDC

Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/biology.html>

La infección puede afectar cualquier órgano, pero se encuentra frecuentemente comprometido el sistema nervioso central (SNC) denominándose neurocisticercosis (NCC) (parénquima, espacios subaracnoideos, ventrículos y la médula espinal), su sintomatología es similar a otras enfermedades neurológicas y crisis epilépticas, causando severos daños e incluso la muerte del afectado, así como también cisticercosis ocular y muscular (39) (41).

2.2.6. Patología y manifestaciones clínicas

Los cisticercos dentro del SNC pueden invadir cualquiera de sus estructuras causando neurocisticercosis una enfermedad considerada pleomórfica debido a que su cuadro clínico depende del número de cisticercos, estadio de desarrollo del cisticercos (viable, degenerativo o calcificado), localización de las lesiones y la respuesta inmunitaria del huésped frente al parásito (30) (36) (42).

Hay casos de neurocisticercosis que permanecen asintomáticos, sin embargo, las convulsiones o epilepsias de tipo tónico - clónicas son las manifestaciones más comunes 60 – 90% de los pacientes, seguido de cefaleas, hipertensión intracraneana, déficit neurológico focal y alteración cognitiva ^{(11)(17) (43)}. Sin embargo estas deficiencias también pueden ser causadas por diferentes patologías del SNC, por lo tanto, no existen síntomas y signos propios que son diagnósticos de NCC ⁽³⁹⁾.

2.2.7. Diagnóstico

Para el diagnóstico de NCC es necesario realizar estudios de neuroimagen y las pruebas serológicas.

Las técnicas de neuroimagen incluyen en la actualidad tomografías axial computarizada (TAC) y resonancia magnética (RM), las cuales permiten evidenciar quistes vivos o calcificados, zona de la lesión y el grado de la reacción inflamatoria. En lesiones intra-ventriculares la TAC es limitada; en estos casos la RM puede ser más útil usando la fase FLAIR. Estos procedimientos son muy costosos y requieren de equipamiento especial por lo que son poco accesibles para zonas endémicas y rurales ^{(29) (44)}.

Las pruebas serológicas se realizan principalmente con las técnicas de inmunoelectrotransferencia ligada a enzimas (EITB) también llamada inmunoblot o Western Blot con antígenos glicoproteicos purificados y Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de antígenos o anticuerpos ⁽¹⁴⁾ pero también existen otras pruebas como Reacción en cadena de la polimerasa (PCR); pero son muy costosos.

Western Blot o el (EITB), combina la especificidad utilizando antígenos previamente purificados por cromatografía más la capacidad de resolución de poliacrilamida

electroforesis en gel con dodecil sulfato de sodio junto con la sensibilidad de la inmunodetección con enzimas por lo que esta está basado en la detección de anticuerpos específicos contra los siete antígenos glicoproteicos purificados (GP13, GP14, GP18, GP21, GP24, GP39-42, GP50) de cisticercos de *T. solium*, y han sido reconocidas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) como el método inmunológico de elección para el diagnóstico de neurocisticercosis ⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾, sin embargo, la detección de anticuerpos no discrimina entre infecciones activas e inactivas esto a que los anticuerpos pueden persistir después que el parásito ha sido eliminado a través de mecanismos inmunes y / o terapia farmacológica y por lo tanto su utilidad clínica está restringida a la confirmación etiológica ⁽⁴⁷⁾.

La sensibilidad de esta técnica en pacientes con más de un quiste viable es de alrededor de 98% y su especificidad es del 100% ⁽¹⁷⁾.

La prueba de ELISA, es un método simple, sensible específico y cuantitativa en la cual se puede evaluar varias muestras al mismo tiempo y detectar anticuerpos o antígenos presente en las muestras de sangre o líquido cefalorraquídeo LCR, pero también se está empleando las muestras de orina en la detección de antígenos de *T. solium*, sin embargo, aún está en investigación para mejorar su uso en esta plataforma, ya que este tipo de muestra se emplea además para otras infecciones parasitarias ^{(21) (23)(46)}.

2.2.8. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Los inmunoensayos, es un método analítico basado en la alta especificidad de la interacción antígeno – anticuerpo para la detección y cuantificación de un analito.

Es una técnica muy usada en inmunología que hace uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será revelada mediante la adición de un sustrato que al actuar con la enzima se desarrollará como producto final un color observable y cuantificable usando un espectrofotómetro ⁽⁴⁸⁾⁽⁴⁹⁾.

Su aplicación es universal para la determinación o cuantificación de anticuerpos, antígenos, proteínas y glicoproteínas y hormonas en diferentes muestras biológicas.

La especificidad de los ensayos ELISA en particular se debe al desarrollo de la tecnología mAb que ha proporcionado reactivos químicos únicos (anticuerpos monoclonales) de especificidad definida ⁽⁵⁰⁾.

Tres métodos principales forman la base de todos los ELISA:

- 1) **ELISA directo:** En este método se puede considerar la forma más simple de ELISA, en donde el antígeno está unido a la fase sólida por adsorción pasiva y es reconocido por un anticuerpo conjugado a una enzima. La unión específica antígeno-anticuerpo dará lugar a una reacción enzimática que dará como resultado un compuesto coloreado mensurable.
- 2) **ELISA indirecto:** Es similar al sistema directo en que el antígeno está directamente unido a la fase sólida y este es reconocido por un anticuerpo (anticuerpo primario) que carece de enzima conjugada; este complejo

antígeno-anticuerpo que luego es reconocido por un anticuerpo secundario (anti-anticuerpo conjugado a una enzima) el cual se une a dominios constantes del anticuerpo primario. Será la unión de este segundo anticuerpo conjugado a una enzima que desarrollará la reacción enzimática y la formación de un compuesto coloreado ⁽⁵¹⁾.

3) ELISA Sándwich doble anticuerpo: Se considera el formato más robusto de todos, debido a que el antígeno es detectado por dos anticuerpos diferentes, por ello este ensayo requiere un par de anticuerpos específicos que sean compatibles entre sí (captura y detección).

La optimización del ensayo de ELISA implica ajustar y probar sistemáticamente los diferentes componentes y variables para ayudar a garantizar que los resultados sean sólidos y precisos ⁽⁵²⁾.

2.2.9. Anticuerpos monoclonales

Son proteínas especializadas, producidas por un clon de linfocitos B, diseñadas específicamente con la capacidad de reconocer moléculas específicas (antígenos) y producirlas de forma ilimitada ⁽⁵³⁾.

La estructura básica de la mayoría de los anticuerpos de mamíferos es una glicoproteína (MW ~ 150,000 daltons), comprende cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, que están conectadas por enlaces disulfuro ⁽⁵⁴⁾.

George Köhler y César Milstein, describieron una técnica en 1975, donde desarrollaron la tecnología de fusionar un linfocito B procedente de un animal inmunizado, con una línea inmortal de célula tumoral mieloma, las células fusionadas resultantes que crecen se llaman hibridoma y cada una de ellas produce una sola inmunoglobulina. Se estudia la unión del antígeno de interés de los

anticuerpos secretados y se selecciona y se expande el clon con la especificidad deseada, los productos de estos clones individuales son los anticuerpos monoclonales mAbs, cada uno es específico frente a un solo epítipo del antígeno

(55) (56).

Los anticuerpos monoclonales tienen muchas aplicaciones en la investigación y han demostrado ser útiles en el diagnóstico y tratamiento médicos, así como también en el estudio de las interacciones patógeno-hospedero y la marcación, detección y cuantificación de diversas moléculas (53) (57).

El empleo de anticuerpos monoclonales en el inmuno diagnóstico es una herramienta útil para muchas enfermedades infecciosas y sistémicas donde se detecta antígenos o anticuerpos presentes en la sangre, la orina o tejidos. La especificidad de los anticuerpos por los antígenos, convierte a los anticuerpos en reactivos muy importantes para detectar, purificar y cuantificar antígenos. Pueden producirse anticuerpos contra casi cualquier tipo de macromolécula y sustancias químicas pequeñas (51) (53)(58).

Los anticuerpos monoclonales son de importante valor porque su método de obtención permite la producción de grandes cantidades ilimitadas de un solo anticuerpo frente a un antígeno que es seleccionado según el objetivo de interés, reduciendo al mínimo la probabilidad de reactividad cruzada y falsos positivos (57)(59).

Los anticuerpos son los reactivos importantes de los que depende el éxito de cualquier inmunoensayo (60).

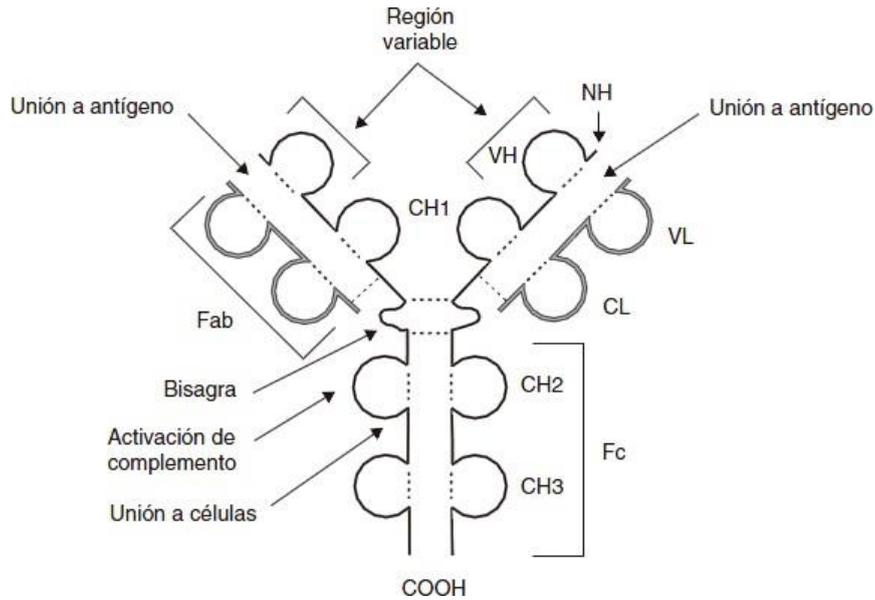


Imagen 5: Estructura de un anticuerpo

Fuente: Anticuerpos monoclonales: Aspectos básicos

Disponible en: <file:///C:/Users/Yesica%20Ss/Downloads/S0213485310002914.pdf>

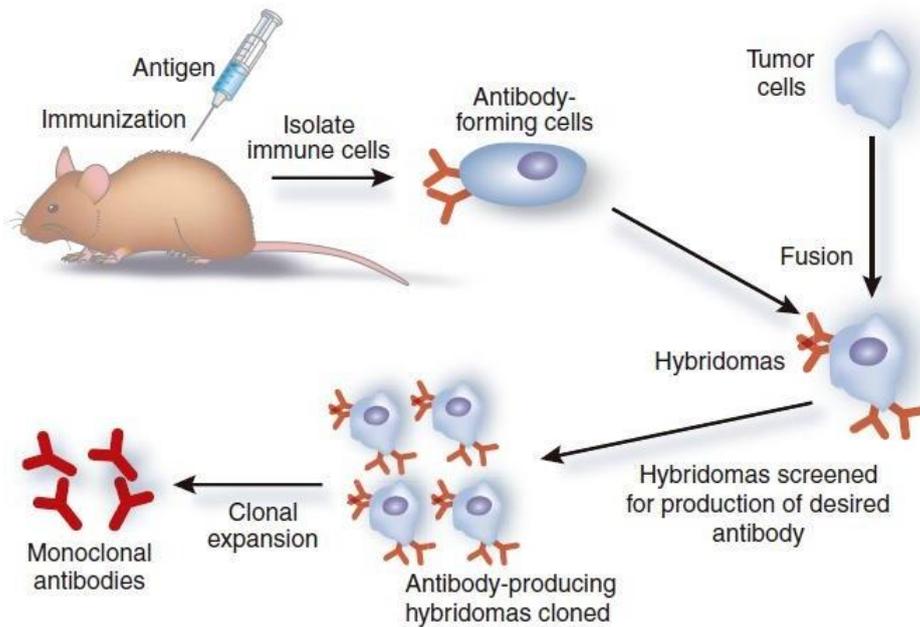


Imagen 6: Producción de anticuerpo monoclonal (mAb)

Fuente: Nature chemical biology, Submitting antibodies to binding arbitration. Michnick W and Sidhu S (2008)

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488004>

2.2.10. Biotinilación de anticuerpos

La biotinilación es el proceso de unión de la biotina a proteínas y otras macromoléculas. Los reactivos de biotinilación están preparados para unirse a grupos o residuos funcionales específicos, incluidas aminas primarias, sulfhidrilos, carboxilos y carbohidratos ⁽⁶¹⁾ ⁽⁶²⁾.

La biotina, también conocida vitamina B7, es una vitamina de 244 Dalton, natural que se encuentra en pequeñas cantidades en todas las células vivas relativamente pequeña por lo que puede ser conjugada a muchas proteínas sin alterar significativamente su actividad biológica, una de sus características es que se une con alta afinidad a la avidina (glicoproteína) y estreptavidina (proteína) ⁽⁶³⁾ ⁽⁶⁴⁾.

Los anticuerpos que están marcadas con biotina, es decir, biotiniladas se detectan con conjugados de avidina, estreptavidina en muchas aplicaciones de investigación de proteínas, como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), en Western Blot, en inmunohistoquímica (IHC), y otros Métodos de purificación por afinidad ⁽⁶³⁾.

El marcaje se emplea para detectar proteínas presentes en muy bajos niveles, la utilización de biotina / estreptavidina permite una mayor amplificación de la señal. El anticuerpo secundario suele ir marcado con biotina, una molécula de pequeño tamaño que permitirá la unión de varias de ellas a un mismo anticuerpo. Además, la biotina presenta una muy alta afinidad por la estreptavidina, lo que, unido a lo anterior, posibilitará que la señal resultante se amplifique considerablemente ⁽⁶⁵⁾.

La estreptavidina, es la proteína tetramérica de 60 kD a más utilizada, no es glicosilada y presenta niveles bajos de unión no específica. El enlace estreptavidina – biotina es la interacción biológica no covalente más fuerte conocida, que exhibe alta afinidad de unión con la biotina ⁽⁶⁶⁾.

2.3. Terminología básica

- **Enfermedad parasitaria**, cuando el huésped presenta alteraciones patológicas y sintomatología a causa del parásito ⁽³⁶⁾.
- **Zoonosis parasitaria**, enfermedad que puede transmitirse de otros animales vertebrados a seres humanos en donde los animales son la parte esencial en el ciclo biológico del parásito ⁽³⁶⁾.
- **ELISA**, Enzyme – linked Immunosorbent Assay, es una técnica muy utilizada para la detección de diversas moléculas biológicas, basándose en la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo y en la sensibilidad de las pruebas enzimáticas ⁽⁴⁸⁾.
- **Adsorción**: Proceso en la cual átomos o moléculas de una sustancia son retenidas en la superficie de otra sustancia ⁽⁴⁸⁾.
- **Antígeno**: Sustancia que provoca una respuesta de anticuerpos como resultado de ser inyectado en un animal o como resultado de una infección ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁴⁹⁾.
- **Anticuerpo**: proteínas que hacen parte del sistema inmune, sintetizadas por los linfocitos B, actúan como receptores para el antígeno cuando se encuentran unidos en la superficie de la membrana de los linfocitos B y los anticuerpos secretados que actúan como neutralizantes de toxinas, eliminando patógenos. Existen cinco isotipos, IgG (monómero), IgD (monómero), IgA (Dímero), IgE (monómero), e IgM (pentámero) ⁽⁵¹⁾.

2.4. Hipótesis

Los parámetros óptimos establecidos para la estandarización del ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales permiten la identificación del antígeno de *T. solium* en muestras de orina humana.

2.5. Variable

Variable: uni variable – Parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales.

CAPÍTULO III: DISEÑO Y MÉTODO

3.1 Tipo y diseño de investigación

La presente investigación es de tipo cuantitativa, prospectivo una medición para cada variable en diferentes experimentos. Asimismo, es una investigación cuasi experimental, porque los sujetos no se asignaron aleatoriamente y hay intervención sobre las variables ⁽⁶⁷⁾.

3.2 Ámbito de Investigación

El presente estudio se ejecutó en el Laboratorio de Inmunología Parasitaria de la Facultad de Ciencias y Filosofía de la Universidad Peruana Cayetano Heredia; Lima, Perú 2017.

3.3 Población

Muestra de orina de pacientes que asistieron al Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas (INCN) por presunto caso de neurocisticercosis, periodo enero 2013 - diciembre 2018.

3.4 Muestra

Estuvo conformada por muestras de orina control positivo (conservadas a - 70°C) de pacientes con diagnóstico de neurocisticercosis. Mediante Western Blot e imágenes y muestras de orina control negativo a neurocisticercosis, confirmados por ELISA y Western Blot.

Criterios de selección

- **Criterios de inclusión:**

- ✓ Muestras de orina de pacientes con resultados de Imagen (TAC, Resonancia) positivos a neurocisticercosis (NCC).
- ✓ Muestras de orina con resultados positivos de Western Blot. (WB) a neurocisticercosis.

- **Criterios de exclusión:**

- ✓ Muestra de orina con volumen inadecuado.
- ✓ Muestras mal conservadas, que no estén en refrigeración o que presenten hongos u otro resto.

3.5 Muestreo

Se utilizó el muestreo no probabilístico y por conveniencia.

3.6 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para este estudio de investigación se realizaron varios ensayos experimentales, donde se emplearon muestras de orina control (positivo y negativo) a neurocisticercosis, la recolección de datos fue mediante la observación experimental de resultados de valores de densidades ópticas (OD) obtenidas a través de lecturas haciendo uso de un espectrofotómetro. Se usó como instrumento una ficha de registro de datos.

3.7 Plan de procesamiento y análisis de datos.

Técnica y métodos empleados

3.7.1 Procedimiento experimental

A. Cuantificación de Proteínas

Este es un ensayo colorimétrico para la cuantificación de proteínas las cuales tiene una reacción similar al método de Lowry, que se basa en la reacción de la proteína con un tartrato de cobre alcalino y reactivo de Folin.

En este primer ensayo se determinó la concentración en microgramos (ug) de cada uno de los 4 anticuerpos monoclonales (mAbs) TsW5 (IgM), TsW7 (IgG), TsW8 (IgM), TsW11 (IgM), previamente purificados con Beads de proteína L (*Thermo scientific*), utilizando un protocolo según el Kit Quick start Bovine Gamma Globulin BGG (Bio - Rad) y DC Protein Assay Reagent A y B (Bio Rad).

B. Reactividad de los anticuerpos monoclonales ELISA indirecto – screening

Este ensayo fue una prueba inicial de viabilidad de los 4 mAbs purificados, empleando un ensayo de ELISA indirecto para evaluar la reactividad de cada uno de ellos.

Se sensibilizo la placa INMULON 1B con 100 ul/ pozo de antígeno somático de cisticerco a la concentración 3 ug/ml. Se preparó la dilución con buffer Carbonato – Bicarbonato y se llevó a incubar 2 horas en shaker a temperatura ambiente. Luego se lavó la placa 5 veces con 180 ul de PBS 1X + Tween 20 a 0.1% a cada pozo y se secó la placa sobre

papel toalla. (El PBS 10X será diluido a 1X en agua MilliQ). Luego se agregó la solución bloqueante 200ul de PBS 1X + Tween 20 a 0.1% + leche 5% a cada pozo de la placa y se incubó a 30 min. En shaker a 37°C. Nuevamente se lavó la placa 5 veces (repetir paso 2). Luego se agregó 100ul/ pozo de muestra (dilución 1/5 o curva de diluciones) y control positivo y negativo e incubó 45 min. En shaker a 37°C. Luego se lavó la placa 5 veces (repetir paso 2). 5 minutos antes se preparó el conjugado Biotin Labeled anti-Mouse IgG o IgM a una dilución 1/5000 en PBS 1X + Tween 20 a 0.1% y se dispuso 100ul a cada pozo de la placa, luego se llevó a incubó a 30 min en shaker a 37°C. Lavar la placa 5 veces (repetir paso 2). Luego se agregó estreptavidina – HRP dilución 1/10000 en PBS 1X + Tween 0.1% e incubó 15 min. En shaker a 37°C. Se lavó la placa 5 veces (repetir paso 2). Para finalizar se agregó el substrato TMB Sure Blue (KPL) 1 componente, 100ul a cada pozo y se colocó la placa en oscuridad y se incubó 5 min en shaker a T° ambiente. Para realizar la lectura se empleó un espectrofotómetro a 650nm de longitud de onda.

C. Biotinilación de anticuerpos monoclonales TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11.

En este ensayo se ha trabajado con los 4 mAbs que fueron previamente purificados 3 mAbs son isotipo IgM y 1 mAbs Isotipo IgG, específicos para el antígeno de cisticerco de *T. solium*. Luego se realizó la cuantificación y se obtuvo la concentración en microgramos y con esto se procedió a la biotinilación.

Con el propósito de evaluar los 4 anticuerpos monoclonales en un sistema de ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas - ELISA tipo sándwich, se procedió al marcaje de los 4 anticuerpos con biotina, usando el Kit de Biotinilación EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation (Thermo Scientific) que se basa en la formación de enlaces amida que se establece entre la biotina y las regiones amino terminal del anticuerpo.

Para la Biotinilación de los anticuerpos de isotipo IgM se mezcló 1ml de suspensión de 250ug/ml del anticuerpo (250ug/ml de anticuerpo en 1ml de PBS-Kit pH7.2 – 8.0) con 2.7ul de solución sulfo-NHS- Biotin 10mM y para el Isotipo IgG se mezcló 1ml de suspensión de 250ug/ml del anticuerpo (250ug/ml de anticuerpo en 1ml de PBS-Kit pH7.2 – 8.0) con 3.3ul de solución Biotina 10mM. (Esto se realizó bajo las indicaciones del inserto del kit.) En ambos casos se llevó a incubación durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se preparó una columna de desalación (Thermo Scientific Zeba Spin Desalting), para remover el exceso de biotina , para esto se rompió el tapón de fondo de la columna y se colocó la columna

dentro de un tubo cónico de 15ml, luego se centrifugo a 1000g X 2min y se decantó el buffer almacenado para luego pasarlo a otro tubo cónico de 15ml. Posteriormente se equilibró la columna agregando 2.5ml de PBS (solución del kit), en la resina y se centrifugo a 1000g X 2min, luego se decantó el sobrenadante y se repite este paso por 3 veces.

Después se colocó la columna en otro tubo de 15ml y se agregó la muestra (anticuerpo biotinilado) directamente sobre la resina, con este paso se permite que el anticuerpo biotinilado sea absorbido dentro de la resina. Nuevamente se centrifugo la columna a 1000g X 2 min y seguidamente se colecto la solución (anticuerpo puro y biotinilado), se guardó la solución en condiciones apropiadas.

Para determinar el nivel de Biotina incorporado a cada anticuerpo se realizó el ensayo HABA (descrito en el inserto), este se basa en las propiedades de unión que tiene frente a la avidina como resultado dará un color con absorbancia, cuando le añadimos el anticuerpo biotinilado, este se unirá fuertemente a la avidina y desplazara al HABA que esta débilmente unido, obteniendo como resultado la disminución de su absorbancia inicial permitiendo de esta manera la cuantificación de biotina unida al anticuerpo monoclonal.

Los valores de absorbancia fueron ingresados al calculador automático que nos ofrece el kit.

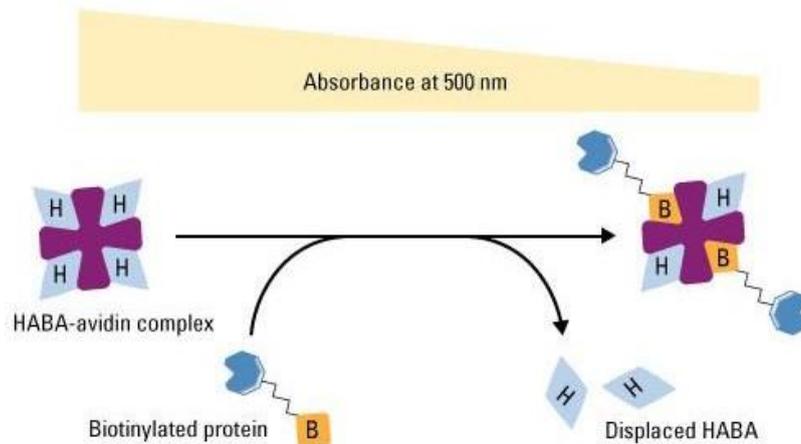


Imagen 7: Reacción HABA - Avidina

Fuente: *Thermo scientific Pierce*

Disponible en: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/protein-biology/protein-labeling-crosslinking/protein-labeling/biotinylation/biotin-quantitation-kits/haba-calculator.html>

Una vez terminado el proceso de Biotinilación se procedió a realizar un ELISA Indirecto como control de calidad para determinar la reactividad de cada uno de los anticuerpos monoclonales biotinilados. Donde se sensibilizo una placa con 100ul/pozo del antígeno somático de cisticerco (3ug/ml) este se preparó en buffer Carbonato – Bicarbonato 5M y se incubo por 2 horas en agitación y a temperatura ambiente. Luego se lavó 5 veces la placa agregando 180ul/pozo de PBS-Tween 0.1%. (Lavado no incluye intervalos de tiempo). Después se bloqueó la placa con 200ul de PBS-Tween 0.1%. + leche 5% y se incubo 30 min. En shaker a 37°C. Nuevamente se lavó 5 veces la placa agregando 180ul/pozo de PBS-Tween 0.1%, luego se agregó 50ul/pozo del anticuerpo biotinilado (se probó concentraciones seriadas; 1ug, 2ug y 4ug y se incluyó control que fue un anticuerpo no biotinilado. Se incubo 45 min. En shaker a 37°C.

Nuevamente se lavó 5 veces la placa agregando 180ul/pozo de PBS-Tween 0.1%, luego se agregó 100ul/pozo de estreptavidina – HRP, en una dilución 1/10000 y se incubó 15 min. En shaker a 37°C. Por última vez se lavó 5 veces la placa agregando 180ul/pozo de PBS-Tween 0.1%, para finalmente añadir 100ul/pozo del substrato TMB e incubar 5 min. En shaker a temperatura ambiente y en oscuridad. Se realizó la lectura en el lector de ELISA a 650nm de longitud de onda.

D. DESARROLLO DE UN ENSAYO DE ELISA tipo sándwich (Screening de mAbs - Homólogos)

En este ensayo se evaluaron los 4 anticuerpos monoclonales (mAbs) con sus respectivos homólogos, usando anticuerpo de captura y anticuerpo biotinilado para la detección de antígenos *T. solium* utilizando muestras de orina control positivo y negativo.

En el Elisa tipo sándwich (monoclonal / monoclonal) se usó como soporte placas de fondo plano (Immulon 1BX) que fueron sensibilizadas con 100ul de cada anticuerpo purificado TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11 a una dilución de 1:200 en buffer Carbonato - Bicarbonato pH9.6 y se incubó 2 horas en agitación a T° ambiente y luego se dejó durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, para continuar con el ensayo las placas fueron lavadas 5 veces con PBS- Tween20 0.1% e inmediatamente fueron bloqueadas con leche (Carnation) 5% e incubadas en agitación a 37°C 30min. Transcurrido este tiempo se lavó 5 veces (nuevamente) con PBS-T 0.1% y se agregó 100ul de la muestra problema (pool orina) para luego ser incubadas en agitación a 37°C por 45min. Después de este tiempo se volvió a lavar 5 veces y se añadió 100ul del anticuerpo biotinilado a cada

uno de sus homólogos a una dilución de 1:3000 llevándolo a una incubación en agitación a 37°C por 30min. Se lavó 5 veces y se dispuso 100ul de Estreptavidina – HRP a 1:10000 e incubo en agitación a 37°C por 15min. Finalmente se volvió a lavar 5 veces y se adicionó 100ul del sustrato TMB Sure Blue (KPL), dejándolo en agitación a T° ambiente y oscuridad por 5min. Dicha placa fue leída en espectrofotómetro a 650nm.

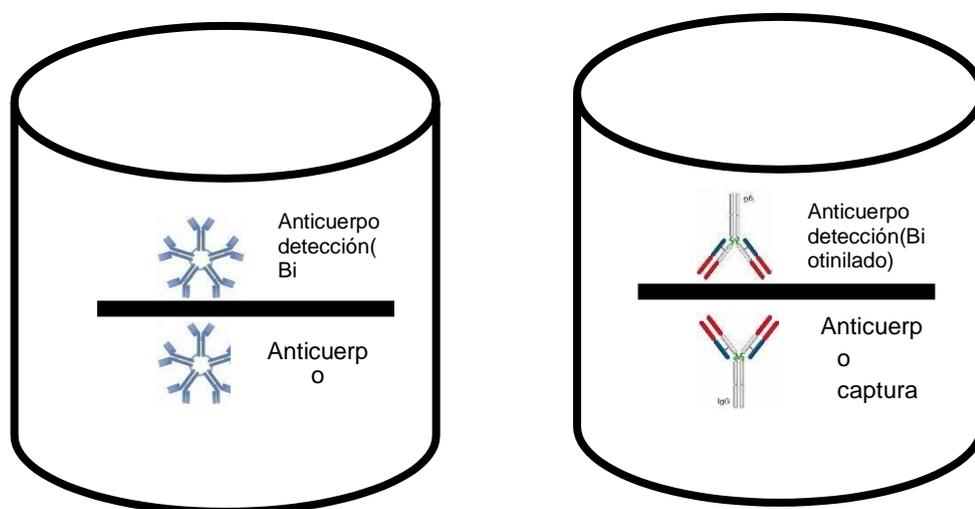


Imagen 8: Modelo de ELISA doble mAbs

Esquema que se trabajó con los mAbs cada uno con sus homólogos

E. Evaluación de placas y soluciones de bloqueos

En este ensayo se diseñó un ELISA tipo sándwich que nos permitió evaluar los diferentes tipos de placas de ELISA que existen comercialmente, como Immulon 1B, Immulon 2HB, Immulon 4HBX y Nunc Maxisorp, las cuales fueron sensibilizadas con los mAbs TsW5, TsW8 y TsW11 a una dilución de 1:200 en buffer Carbonato - Bicarbonato pH9.6 y se incubó 2 horas en agitación a T° ambiente y luego se dejó durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, para continuar con el ensayo todas placas fueron lavadas 5 veces con PBS- Tween20 0.1% e inmediatamente fueron bloqueadas con diferentes soluciones de bloqueo como la Albumina 2% (Calbiochem), Leche descremada (Carnation) 2%, y Suero fetal bovino SFB 1%(Gibco) y el Suero de Ternero recién nacido NCBS 1% (Gibco), las soluciones de bloqueo cubrirán los sitios de unión inespecíficos de las placas. Transcurrido este tiempo se decanta el contenido de las placas e inmediatamente se le agregó 100ul de las muestras de orina entre positivas y negativas, para luego ser incubadas en agitación a 37°C por 45min. Después de este tiempo se volvieron a lavar 5 veces y se añadió 100ul del anticuerpo biotinilado a cada uno de sus homólogos a una dilución de 1:3000 llevándolo a una incubación en agitación a 37°C por 30min. Se lavó 5 veces y se dispuso 100ul de Estreptavidina – HRP a 1:10000 e incubó en agitación a 37°C por 15min. Finalmente se volvió a lavar 5 veces y se adicionó 100ul del sustrato TMB Sure Blue (KPL),

dejándolo en agitación a T° ambiente y oscuridad por 5min. La placa fue leída en espectrofotómetro a 650nm.

Tipos de bloqueantes	mAb TsW5		mAb TsW8		mAb TsW11	
Albumina 2%	+	-	+	-	+	-
Leche descremada 2%	+	-	+	-	+	-
Suero fetal bovino SFB 1%	+	-	+	-	+	-
Suero de ternero recién nacido NCBS 1%	+	-	+	-	+	-

Tabla 1: Evaluación de placas y soluciones de bloqueo

Esquema que se empleó con los mAbs cada uno con sus homólogos en cada placa, usando muestras de orina control negativo y positivo.

F. Evaluación de Buffers de adherencia del anticuerpo de captura

Se evaluaron cuatro tipos de soluciones buffers de revestimiento o adherencia del anticuerpo al pocillo de las placas, como el Buffer Carbonato–Bicarbonato Ph9.6, 0.05M (sigma), Buffer de sensibilización Ph8, Buffer Phosphate Buffered Saline Dulbecco Ph 7.2 (Oxoid) y el buffer Phosphate Buffered Saline Ph 7.4 (Sigma). Todos estos fueron usados en los mAbs captura (TsW5, TsW8 y TsW11) a una dilución de 1:200 las cuales fueron añadidos a las dos mejores opciones de placas resultantes del ensayo anterior (Immulon 4HBX y Nunc Maxisorp), las cuales fueron evaluadas en muestras de orina control positivo y negativo. El esquema que se usó en este ensayo se muestra a continuación:

Tipos de buffer de adherencia	mAb TsW5		mAb TsW8		mAb TsW11	
	+	-	+	-	+	-
Carbonato – Bicarbonato pH9.6	+	-	+	-	+	-
Sensibilización pH8	+	-	+	-	+	-
Phosphate buffered saline (oxid) pH7.2	+	-	+	-	+	-
Phosphate buffered saline (sigma) pH7.4	+	-	+	-	+	-

Tabla 2: Evaluación de Buffers de adherencia del anticuerpo de captura

Esquema que se trabajó con los mAbs cada uno con sus homólogos

G. Determinar la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección.

Este ensayo nos permitió conocer la concentración óptima para cada uno de los mAbs de captura y mAbs biotinilados (detección).

La titulación fue realizada mediante el método checkerboard conocido como tablero de ajedrez, que consiste en diluciones seriadas.

Para este ensayo se utilizó la placa Immulón 4HBX para cada anticuerpo monoclonal (TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11) y como buffer de adherencia PBS (Oxoid) cada una de ellas tuvieron las siguientes concentraciones:

- **Anticuerpo de captura:** 8 ug/ml, 4 ug/ml, 2ug/ml, 1 ug/ml y 0.5 ug/ml
- **Anticuerpo biotinilado:** 6 ug/ml, 4 ug/ml, 2 ug/ml, 1 ug/ml y 0.5 ug/ml

		Orina positivo					Orina negativo				
		6ug	4ug	2ug	1ug	0.5ug	6ug	4ug	2ug	1ug	0.5ug
Ac. Biotinilado											
Ac. Captura	8ug										
	4ug										
	2ug										
	1ug										
	0.5ug										

Tabla 3: Evaluación de concentración óptima del anticuerpo de captura y detección.

Esquema que se trabajó con los mAbs cada uno con sus homólogos

H. Evaluación de las combinaciones de mAbs y determinar la mejor pareja de mAbs en la detección de antígeno *T. solium*.

Este ensayo se realizó empleando los tres mejores anticuerpos reactivos TsW5, TsW8 y TsW11 que fueron capaces de detectar antígenos en muestras de orina control positivo y negativo, bajo las mejores condiciones obtenidas como producto de todos los ensayos anteriores. Estas combinaciones fueron diseñadas con la finalidad elegir el mejor par de mAbs de captura y detección.

Isotipo Captura - Detección	Ac. captura	Ac. Detección
IgM - IgM	TsW5	TsW5
IgM - IgM	TsW5	TsW8
IgM - IgM	TsW5	TsW11
IgM - IgM	TsW8	TsW5
IgM - IgM	TsW8	TsW8
IgM - IgM	TsW8	TsW11
IgM - IgM	TsW11	TsW5
IgM - IgM	TsW11	TsW8
IgM -	TsW11	TsW11

IgM		
-----	--	--

Tabla 4: Representación de los isotipos de mAbs para las combinaciones

Esquema que se realizó con los mAbs cada uno con diferente mAbs – isotipo.

	mAb TsW5 captura 2ug/ml		mAb TsW8 captura 4ug/ml		mAb TsW11 captura 4ug/ml	
TsW5 biotinilado 4ug/ml	+	-	+	-	+	-
TsW8 biotinilado 4ug/ml	+	-	+	-	+	-
TsW11 biotinilado 4ug/ml	+	-	+	-	+	-

Tabla 5: Evaluación combinaciones de mAbs y elección del mejor par

Esquema que se trabajó con los mAbs cada uno con diferente mAbs – isotipo y las concentraciones para los mAbs de captura y detección.

I. Evaluación de tiempos de incubación y tipos de sustrato

Con la finalidad de seguir optimizando cada parámetro en la performance del ELISA tipo sándwich para la detección de antígeno somático *T. solium* en orina, se continuó realizando ensayos, pero para este en especial se empleó el mejor par de mAbs seleccionado en el ensayo anterior.

Para ello se diseñó dos plataformas de ELISA tipo sándwich- doble mAbs/ heterólogo TsW8 como captura – TsW5 biotinilado como detección.

En este ELISA tipo sándwich monoclonal – monoclonal se usó la placa de fondo plano Immulon 4HBX que fue sensibilizado con 100ul de anticuerpo de captura TsW8 a una concentración de 4ug/ml, diluido el buffer de adherencia PBS (Oxoid), durante 1 hora en agitación a 37°C. Luego fueron lavadas 5 veces con PBS-Tween 0.05%, para luego agregar la solución bloqueante leche descremada (Carnation)2% e incubadas en agitación a 37°C por 30min. Luego se decantó el contenido y sin lavar se agregó 100ul de muestra de orina control positivo y negativo a una dilución 1:4 que luego fueron incubadas en agitación a 37°C por 30min. Transcurrido este tiempo se lavó 5 veces y se añadió 100ul de anticuerpo biotinilado TsW5 a una concentración de 4ug/mL y se incubó a 37°C en agitación por 30min. Seguido de esto se lavó 5 veces y

se adiciono 100ul de Estreptavidina – HRP a dilución 1:10000 incubando en agitación a 37°C por 30min.

Luego ambas placas se lavaron 5 veces y a la primera placa se le agrego como sustrato 100ul de TMB Sure Blue (KPL) 1 componente, se incubo en agitación a 37°C por 30min y en oscuridad, para finalmente ser leída a 650nm. A la segunda placa se le agrego como sustrato O – Phenylene diamine dihydro – chloride (OPD) 10ul, esta se incubo en agitación a 37°C por 15min y en oscuridad, para luego añadirle inmediatamente 50ul de la solución de parada H₂SO₄ 2N y finalmente fue leída a 490/650nm.

3.8 Aspectos éticos

El presente trabajo cumplió con las normas éticas de la declaración de Helsinki, por lo tanto, se mantuvo la confidencialidad de los datos e identidad de las personas participantes del estudio. Los pacientes previamente fueron debidamente informados del estudio a realizarse, y de la importancia de conocer su estado de salud en relación con la neurocisticercosis. La participación fue voluntaria y sin ningún tipo de condicionamiento.

Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al convenio: N° 115-2015-FONDECYT-DE titulado —Desarrollo de un Biosensor en base a partículas magnéticas para el diagnóstico de neurocisticercosis humanal del cual mi tesis fue parte, este estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, fortaleciendo esto se llevó un curso de bioética en la investigación, brindado por *The collaborative institutional training initiative (CITI PROGRAM) – University of Miami Miller School of Medicine.*

Los resultados de este trabajo de Investigación serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se mencionará ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Resultados.

4.1.1 Determinación de la cuantificación de Proteínas

Inicialmente se trabajó con 4 mAbs (3 isotipo IgM y 1 Isotipo IgG) que fueron previamente purificados (protocolo establecido en el laboratorio) con **Beads de proteína L** (*Thermo scientific*). Paso seguido se realizó la cuantificación (con protocolo de los Kit comerciales) de proteínas para cada anticuerpo previamente purificado.

En el **Gráfico 1** se puede observar la concentración de cada uno de los 4 mAbs purificados, y en donde el anticuerpo TsW11 de isotipo M tiene mayor concentración 673ug/ml, pero todos presentan la concentración adecuada para el proceso de biotilación.

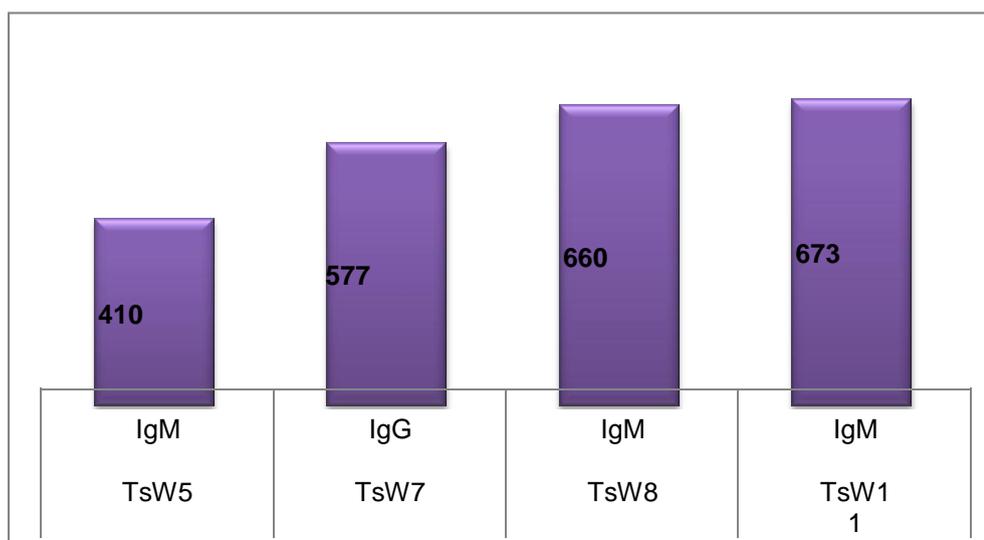


Grafico 1: cuantificación de los 4 anticuerpos monoclonales purificados.

4.1.2 Reactividad de los anticuerpos monoclonales, ELISA indirecto – screening.

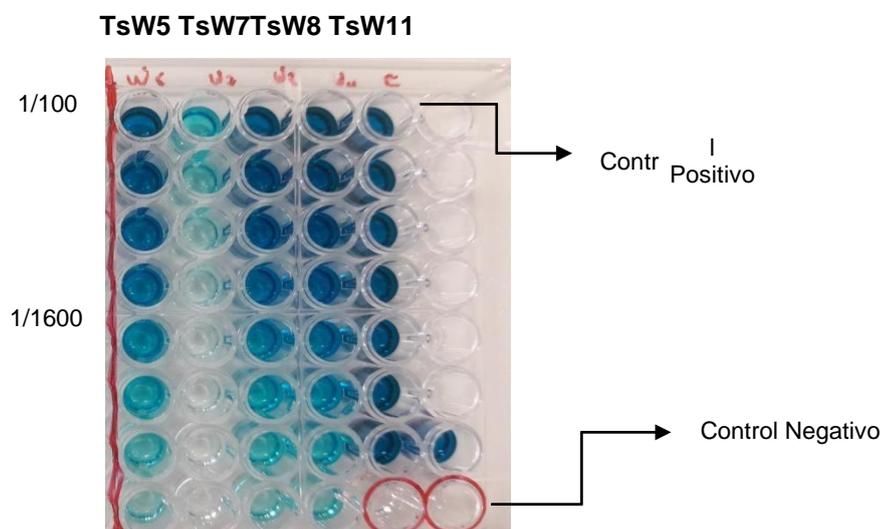
Esto se realizó como prueba inicial para verificar la viabilidad de los mAbs purificados, empleando un ensayo de ELISA indirecto donde se evaluó la reactividad de cada uno de los 4 mAbs en una serie de diluciones dobles.

En la **tabla 6** se puede observar el valor de las densidades ópticas (OD) obtenidas para cada uno de las mAbs evaluados y en donde se puede apreciar que el TsW7 tiene una baja o casi nada de reactividad con un OD menor a 1, a diferencia de los otros 3 mAbs TsW5, TsW8 y Tsw11 que muestran reactividad con un valor OD mayor a 1.

mAbs	DILUCION	OD
TsW5	1/100	3.14 1
	1/1600	1.26 3
TsW7	1/100	0.63 6
	1/1600	0.05 6
TsW8	1/100	2.79 2
	1/1600	1.23 2
TsW11	1/100	2.85 5
	1/1600	1.44 9

Tabla 6: Reactividad de los mAbs purificados (cuantitativamente)

En la **imagen 9** se puede apreciar visualmente la reactividad de los mAbs evaluados, en donde estos son comparados con un control negativo que no evidencia color y un control positivo que se evidencia dando un color azul fuerte para así definir también de forma cualitativa la reactividad de los mAbs en evaluación.



**Imagen 9: Reactividad de los mAbs de purificados
(cualitativamente)**

4.1.3 Biotinilación de los anticuerpos monoclonales TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11

Se biotinilaron 3 mAbs de isotipo IgM y 1 mAbs de Isotipo IgG, todos específicos para el antígeno de cisticerco de *T. solium*.

Después se procedió a colocar las absorbancias (OD) obtenidas a la calculadora HABA (*kit Thermo scientific*) de la solución de HABA- avidina antes y después de la adición de la muestra de biotina, así como la información de la proteína biotinilada (peso molecular y concentración en miligramos por mililitro). Para finalizar se evaluó la reactividad de los mAbs biotinilados empleando un ELISA indirecto.

En la **tabla 7** se puede observar los valores de la cantidad de biomolécula de biotina unida a cada uno de los anticuerpos después de realizarle el proceso de biotinilación.

En la **tabla 8** se puede observar el valor de los OD para cada uno de los mAbs Biotinilado, en donde la IgG TsW7 presenta una baja reactividad en comparación a los otros mAbs y esto también puede apreciarse de forma visual de acuerdo a la intensidad de color.

Anticuerpo	Nivel de biotina incorporado
Tsw5 (IgM)	2.77mmol/ml
Tsw7 (IgG)	0.00000166mmol/ml
Tsw8 (IgM)	2.77mmol/ml
Tsw11 (IgM)	2.77mmol/ml

Tabla 7: Biotinilación

mAb Biotinilado (1ug/ml)	OD	
Tsw5 (IgM)	0.574	
Tsw7 (IgG)	0.11	
Tsw8 (IgM)	0.247	
Tsw11 (IgM)	0.484	

Tabla 8: Reactividad de los mAbs Biotinilados

4.1.4 Desarrollo de un ELISA tipo sándwich (Screening mAbs-Homólogos)

Se evaluó la reactividad de los 4 mAbs con sus respectivos homólogos como anticuerpo de captura y anticuerpo de detección (Biotinilado) en muestra de orina control positivo y negativo.

En el **grafico 2**, se puede observar el valor de los ratio (OD positivo / OD negativo) de los 4 mAbs, en donde el TsW7 es el único que presenta una reactividad con un ratio de 1.7.

En la **imagen 10**, se puede apreciar visualmente la intensidad de los colores que van en relación con el ratio de cada uno de los 4 mAbs, en donde el TsW7 no presenta color lo que nos indicaría una poca reacción y esto se ve relacionado con su valor de su ratio obtenido.

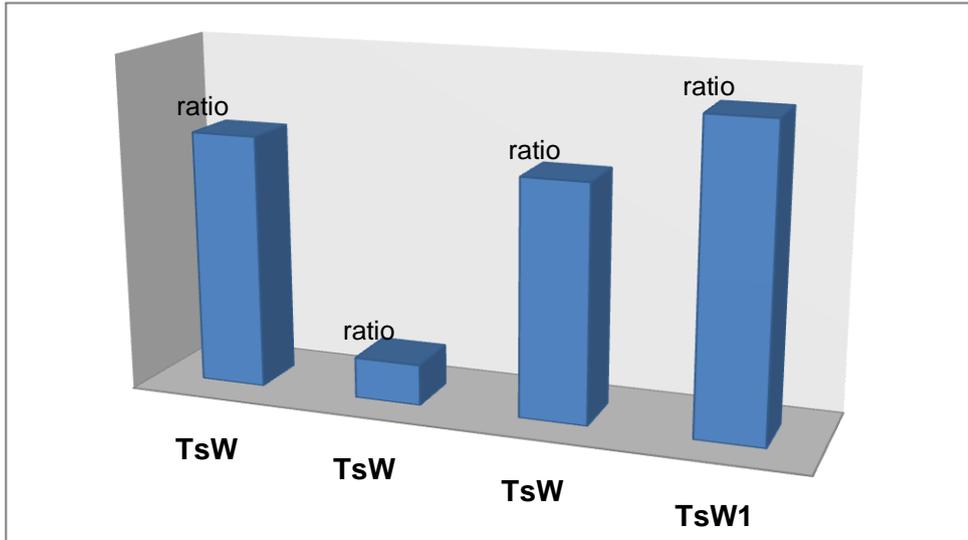


Gráfico 2: ELISA Sándwich de mAbs Homólogos.

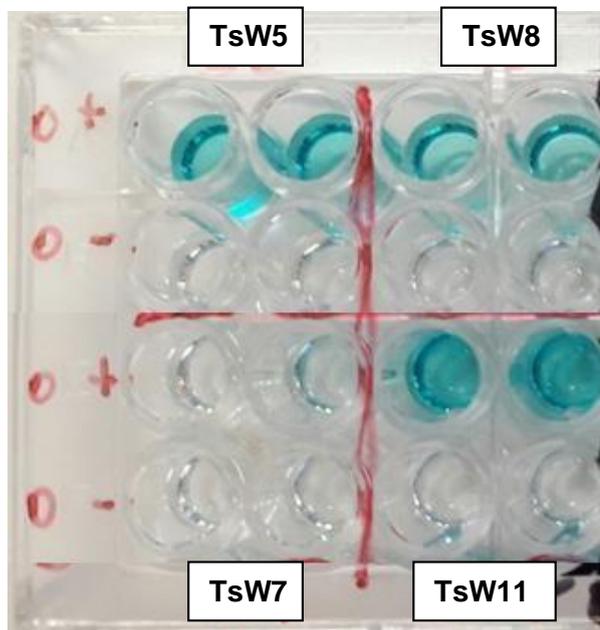


Imagen 10: ELISA Sándwich de mAbs Homólogos.

4.1.5 Evaluación de placas y soluciones de bloqueos

Este ensayo se evaluó los diferentes tipos de placas y soluciones de bloqueo con los 3 mAbs TsW5, TsW8 y TsW11 en una plataforma de ELISA tipo sándwich homólogo. Seleccionando como mejor opción la placa Immulón 4HBX y como bloqueador la leche Carnation a la concentración del 2%.

En la **gráfica 3**, se evaluó la placa immulon 1B y los 4 tipos de bloqueantes en donde el mAb TsW8, presenta ratio por debajo de 2, baja reactividad frente a los otros 2 mAbs.

En la **imagen 11**, podemos observar que los 3 mAbs presentaron reactividad para las muestras control positivo, pero el mAbs TsW8, presenta cierta coloración en sus controles negativos (background) lo que hace que el valor que su ratio cuando se cuantifique baje, esto se debe a una reacción inespecífica de la placa, la immulon 1B es de material poliestireno y es de unión media.

En la **gráfica 4**, se evaluó la placa immulon 2HB y los 4 tipos de bloqueantes, en donde los 3 mAbs presentaron ratio mayor de 3 y menor a 8, en donde se observa reactividad para los 3 mAbs.

En la **imagen 12**, se observa reacción en las muestras control positivo y negativo, una coloración más fuerte que en la placa anterior. La immulón 2HB es de material Poliestireno y de unión fuerte, es una placa irradiada que proporciona mayor afinidad de unión y es recomendada para ensayos de antígeno adherido a la superficie; por ello en este caso las proteínas que presenta el bloqueante se deben

haber adherido al pocillo y reaccionado inespecíficamente (background).

En la **gráfica 5**, se evaluó la placa immulon 4HBX y los 4 tipos de bloqueantes en donde se obtuvo mayor ratio 23.6 con el TsW11 empleando leche Carnation a la concentración del 2%.

En la **imagen 13**, visualmente se aprecia mayor coloración para las muestras positivas con el TsW11, y casi nada de coloración para las muestras negativas empleando como bloqueante leche Carnation a la concentración del 2%, la placa immulón 4HBX también es de material Poliestireno ultra alta unión, adsorción y es hidrofílica.

En la **gráfica 6**, se evaluó la placa Maxisorp y los 4 tipos de bloqueantes en donde se obtuvo mayor ratio 25.5 para el TsW11 empleando leche Carnation a la concentración del 2%.

En la **imagen 14**, visualmente se aprecia mayor coloración para las muestras positivas con elTsW11, y nada de coloración para sus muestras negativas empleando como bloqueante leche Carnation a la concentración del 2%, la superficie de la placa Maxisorp presenta una combinación hidrofílico – hidrofóbico que se une a una amplia variedad de biomoléculas.

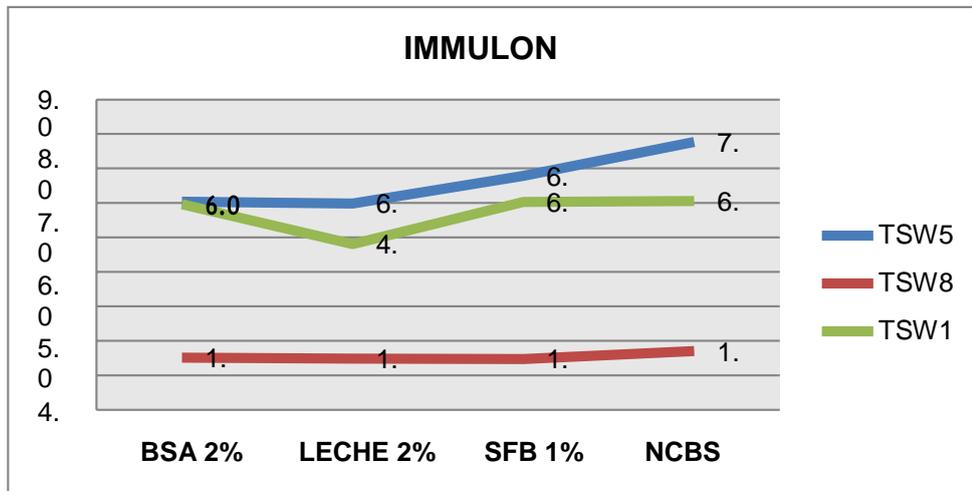


Gráfico 3: Evaluación de la placa Immulón 1B con diferentes soluciones de bloqueo.

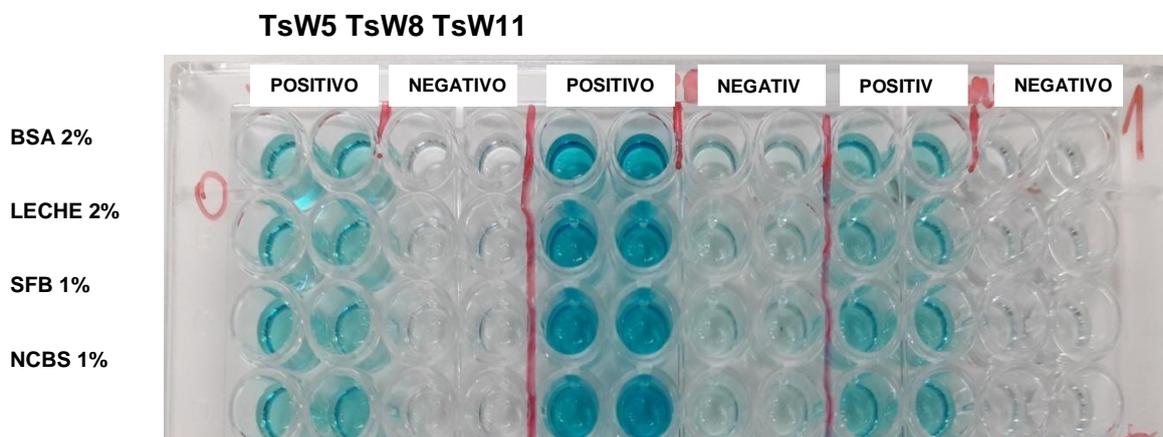


Imagen 11: Evaluación de la placa Immulón 1B con diferentes soluciones de bloqueo.

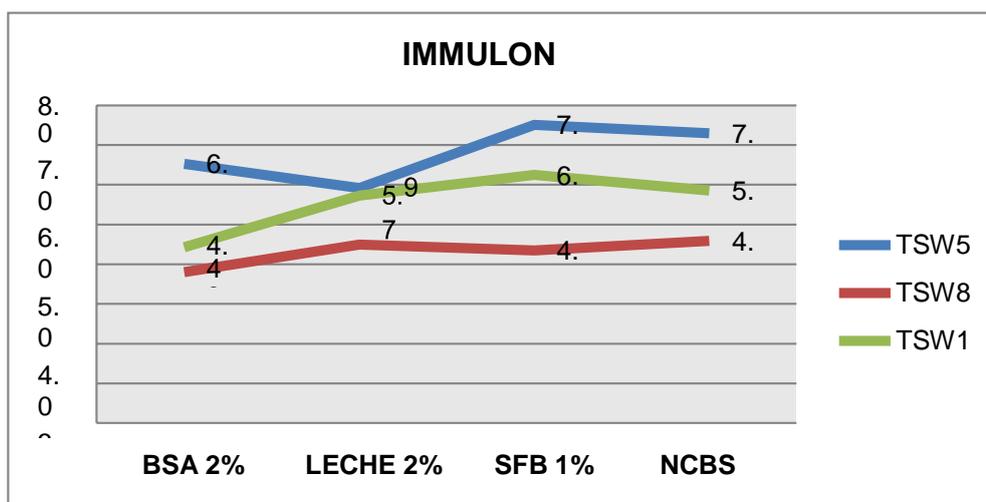


Gráfico 4: Evaluación de la placa Immulón 2HB con diferentes soluciones de bloqueo.

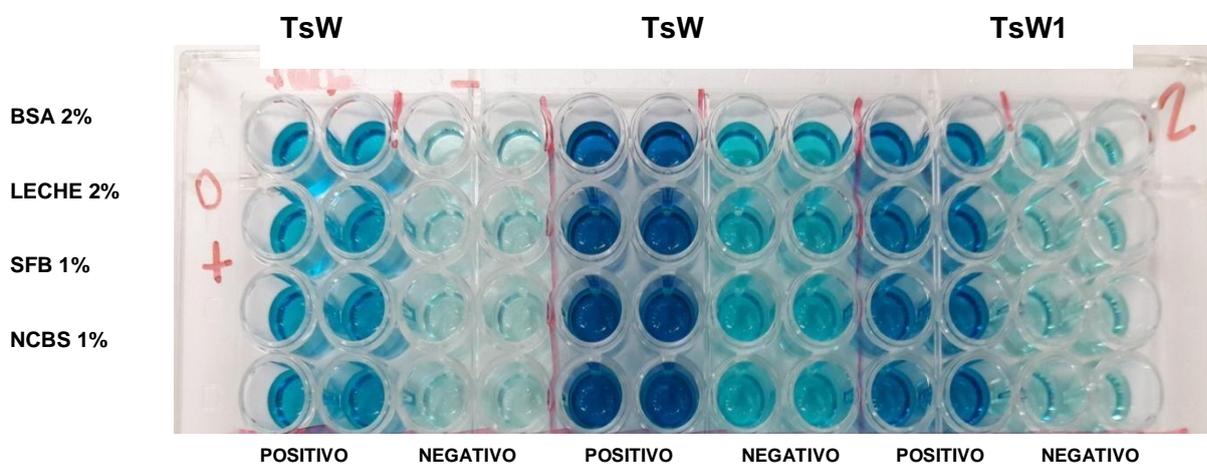


Imagen 12: Evaluación de la placa Immulón 2HB con diferentes soluciones de bloqueo.

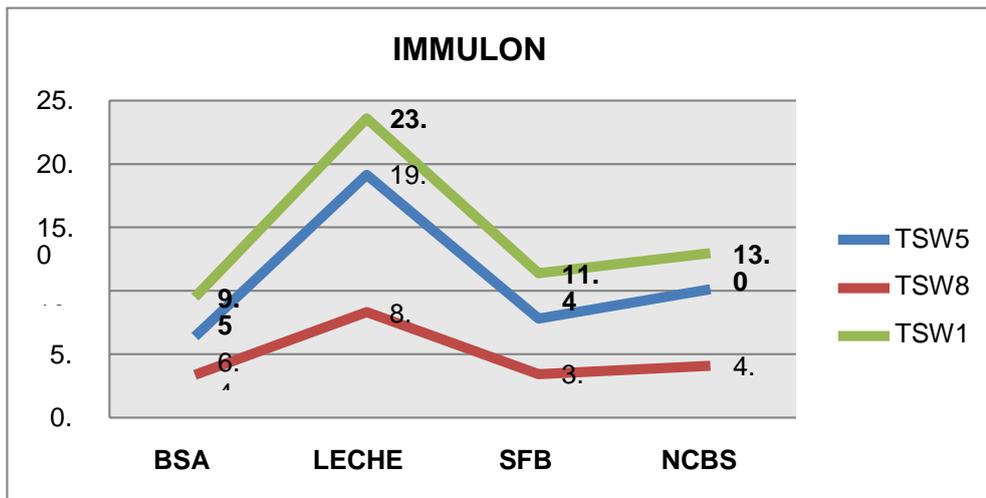


Gráfico 5: Evaluación de la placa Immulón 4HBX con diferentes soluciones de bloqueo.

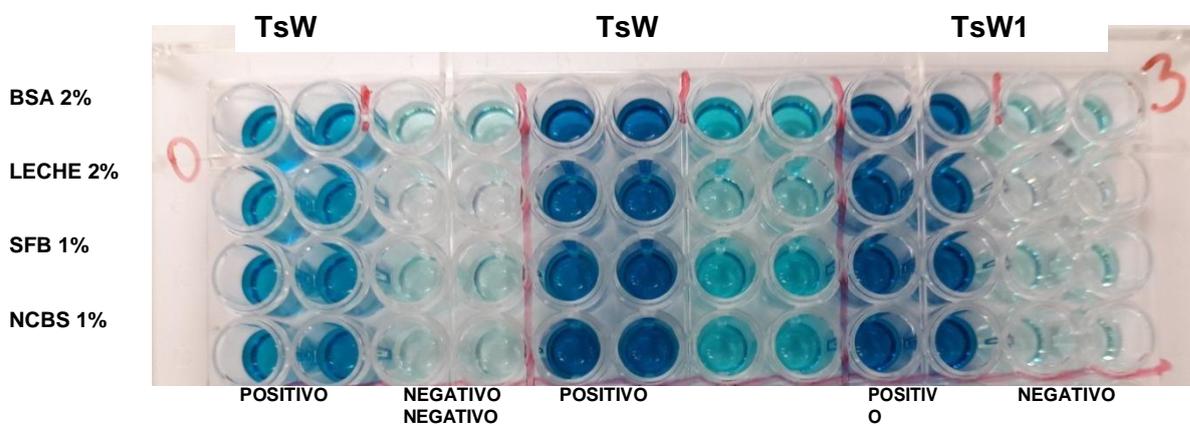


Imagen 13: Evaluación de la placa Immulón 4HBX con diferentes soluciones de bloqueo.

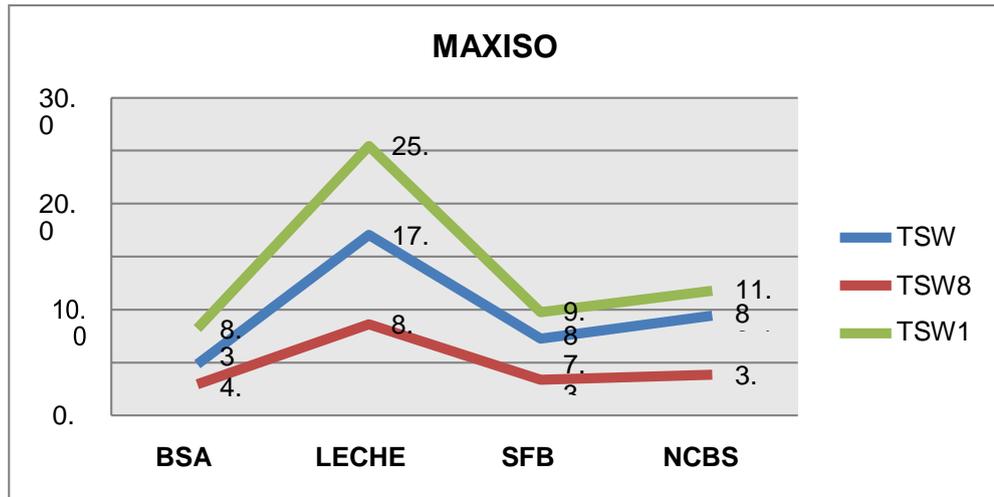


Gráfico 6: Evaluación de la placa Maxisorp con diferentes soluciones de bloqueo.

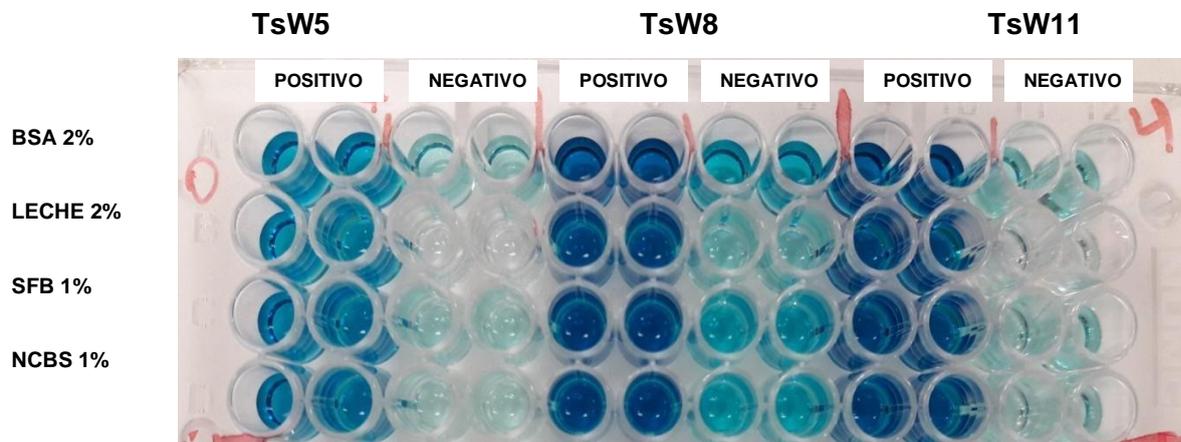


Imagen 14: Evaluación de la placa Maxisorp con diferentes soluciones de bloqueo.

4.1.6 Evaluación de los buffers de adherencia para el anticuerpo de captura.

Se diseñó este ensayo con la finalidad de seleccionar el mejor buffer de adherencia o revestimiento para ello se emplearon 4 tipos de buffers en las dos mejores opciones de placas todos fueron usados con los 3 mAbs captura.

En el **gráfico 7**, se obtuvo mayor ratio para los 3 mAbs empleando la solución de adherencia el buffer Phosphate Buffered Saline Dulbecco Ph 7.2 (Oxoid) usando la placa immulón 4HBX, y en donde resalta con un ratio de 36.9 con el mAb TSW11.

En el **gráfico 8**, se obtuvo mayor ratio 32.4 en el mAbs TSW11 empleando la solución de adherencia el buffer Phosphate Buffered Saline Dulbecco Ph 7.2 (Oxoid) usando la placa Maxisorp.

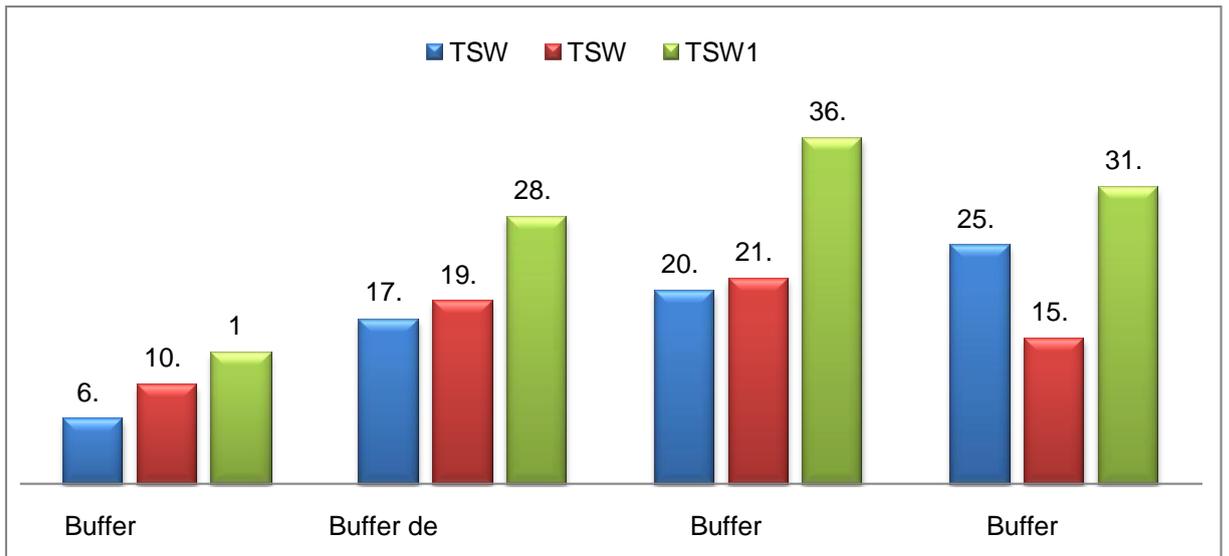


Gráfico 7: Evaluación de la placa Immulón 4HBX con diferentes soluciones de buffer de adherencia.

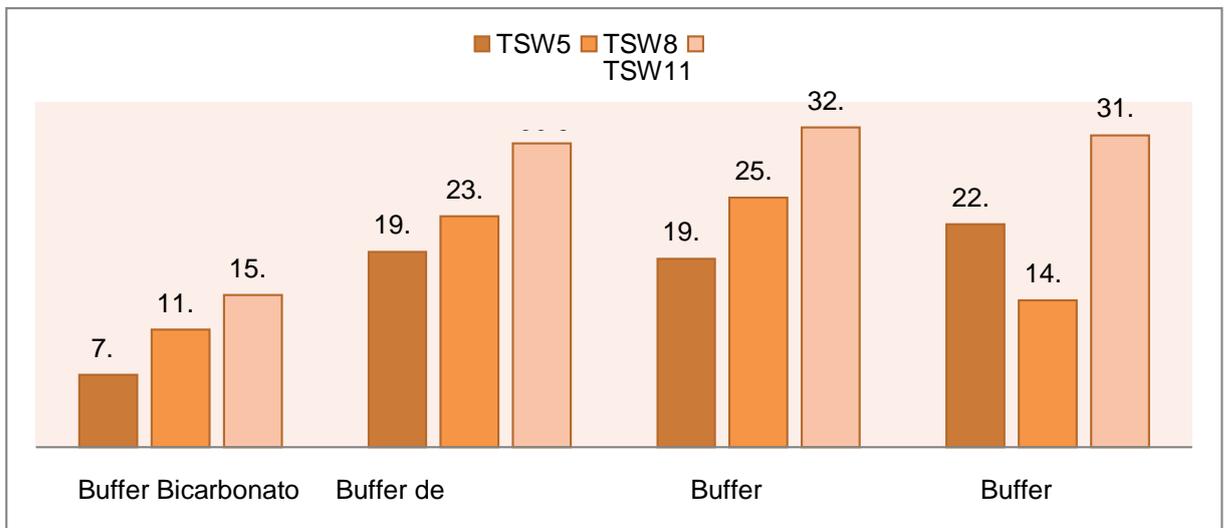


Gráfico 8: Evaluación de la placa Maxisorp con diferentes soluciones de buffer de adherencia.

4.1.7 Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección (checkerboard)

Este ensayo nos permitió conocer la mejor concentración para cada uno de los mAbs de captura y biotinilados (detección). Para ello se utilizó placa Immulón 4HBX sensibilizando cada anticuerpo monoclonal de captura (TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11) y como diluyente de adherencia se empleó el buffer Phosphate Buffered Saline Dulbecco Ph 7.2 (Oxoid). En el **gráfico 9**, se observa los puntos obtenidos de las diferentes concentraciones en donde se considera como mejor u óptimo a la concentración 4ug/ml del anticuerpo de captura y 2ug/ml para el anticuerpo de detección del TsW5 (homólogo) con un ratio de 44.30 en donde el control positivo tiene un OD de 3.728 y el control negativo tiene un OD de 0.074.

En la **imagen 15**, visualmente se aprecia coloración para las muestras control positivas con el TsW5, y nada de coloración para sus muestras control negativas a diferencia de las otras que a mayor concentración del anticuerpo de captura y detección el negativo presenta color y podría resultar un falso positivo.

En el **gráfico 10**, se observa los puntos obtenidos de las diferentes concentraciones en donde podemos apreciar una baja o casi nula de reactividad con ratios que no pasan de 2 para el TsW7.

En la **imagen 16**, visualmente se aprecia una baja o casi nada de coloración para las muestras positivas al igual que para las muestras

negativas dificultando las diferencias entre una y otra, resultando así un falso negativo con el TsW7.

En el **gráfico 11**, se observa los puntos obtenidos de las diferentes concentraciones en donde se considera como mejor u óptimo a la concentración 4ug/ml del anticuerpo de captura y 2ug/ml para el anticuerpo de detección del TsW8 (homólogo) con un ratio de 53.78 en donde el positivo tiene un OD de 2.63 y el negativo tiene un OD de 0.049.

En la **imagen 17**, visualmente se aprecia coloración para las muestras positivas con el TsW8, y nada de coloración para sus muestras negativas a diferencia de las otras que a mayor concentración del anticuerpo de captura y detección el negativo presenta color y podría resultar un falso positivo.

En el **gráfico 12**, se observa los puntos obtenidos de las diferentes concentraciones en donde se considera como mejor u óptimo a la concentración 4ug/ml del anticuerpo de captura y 2ug/ml para el anticuerpo de detección del TsW11 (homólogo) con un ratio de 52.65 en donde el control positivo tiene un OD de 3.15 y el control negativo tiene un OD de 0.060.

En la **imagen 18**, visualmente se aprecia coloración para las muestras control positivas con el TsW11, y nada de coloración para sus muestras control negativas a diferencia de las otras que a mayor concentración del anticuerpo de captura y detección el negativo presenta un ligero color y podría resultar un falso positivo.

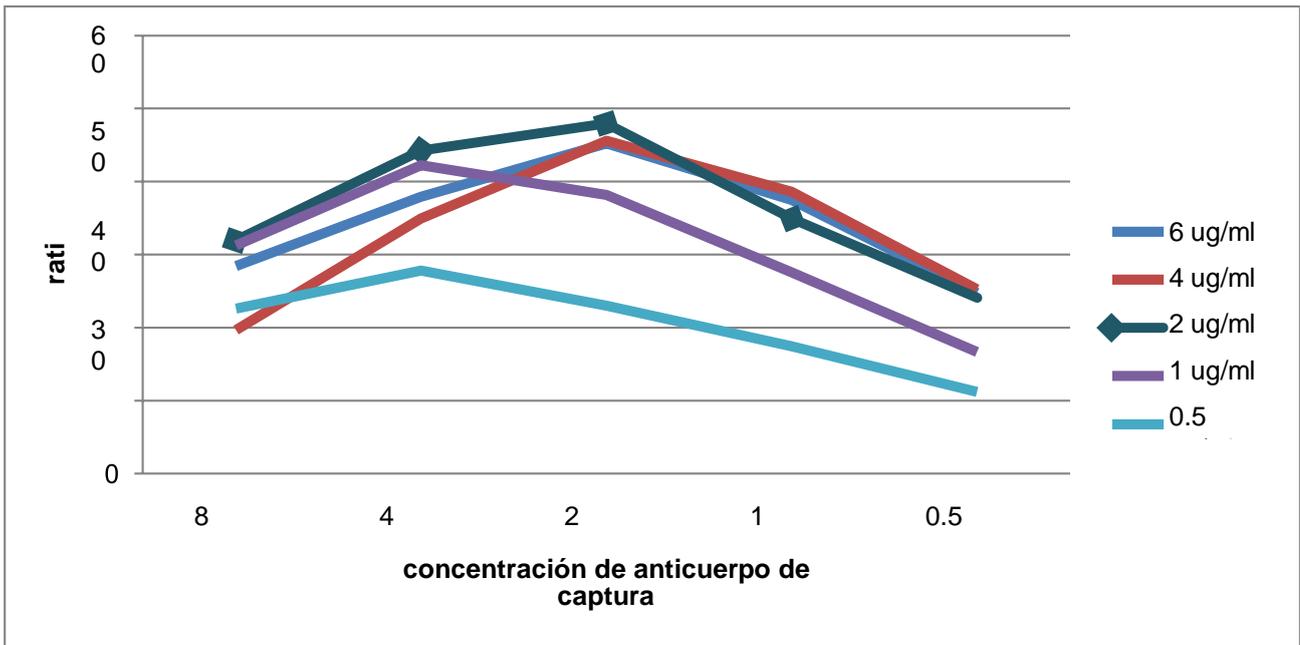


Gráfico 9: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección del mAbs TsW5 (checkerboard).

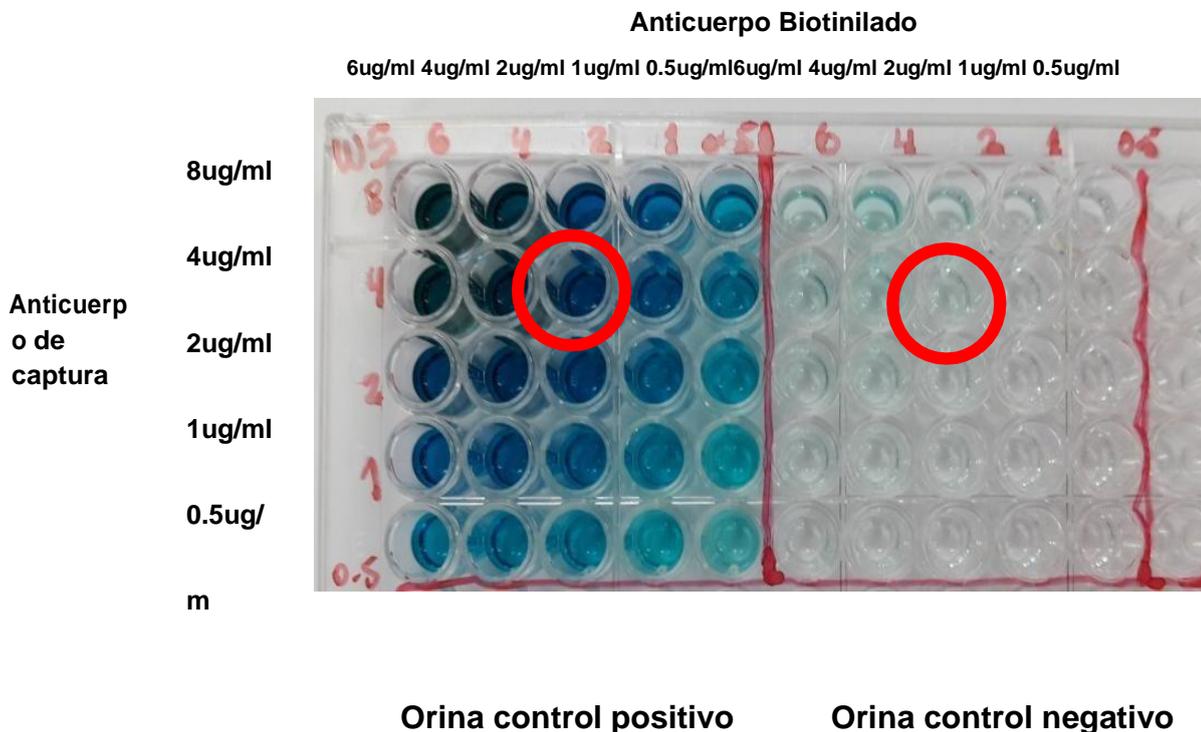


Imagen 15: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección con el mAbs TsW5.

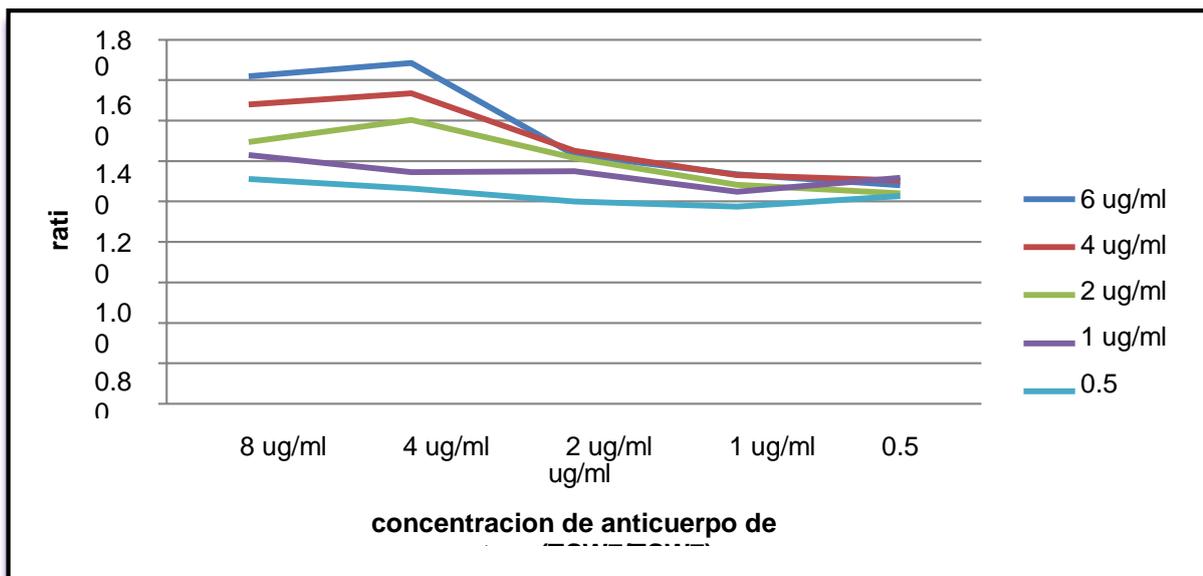


Gráfico 10: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección del mAbs TsW7 (checkerboard).

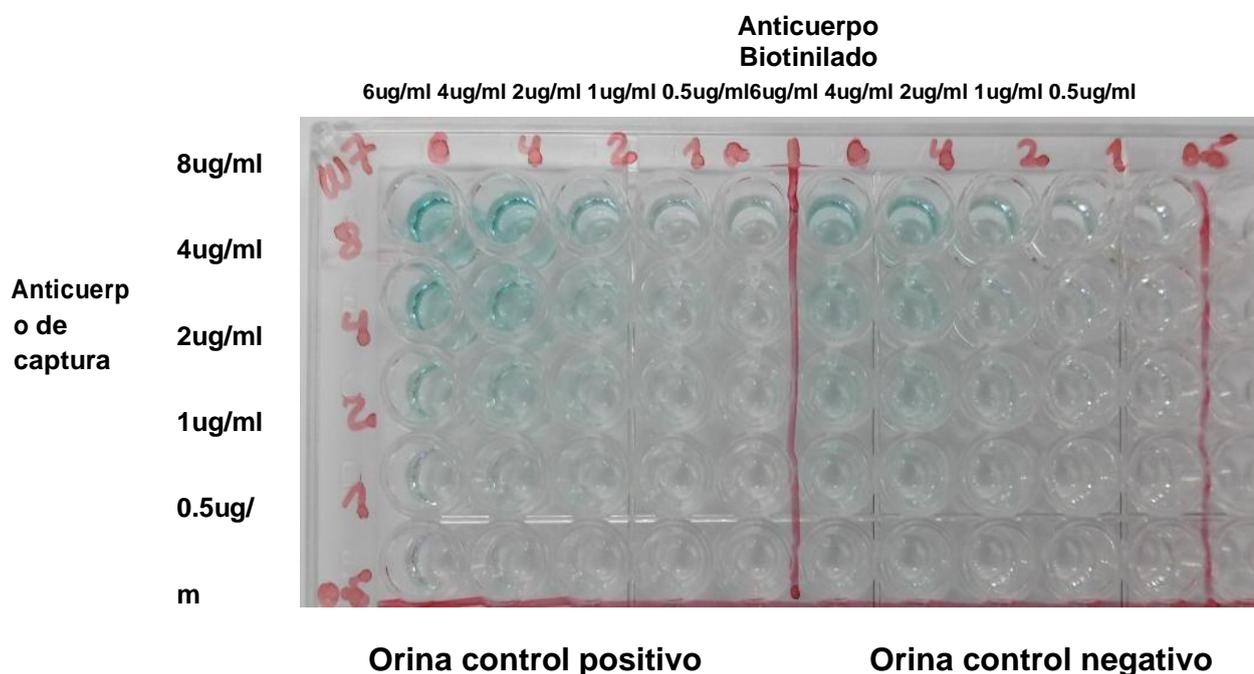


Imagen 16: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección con el mAbs TsW7.

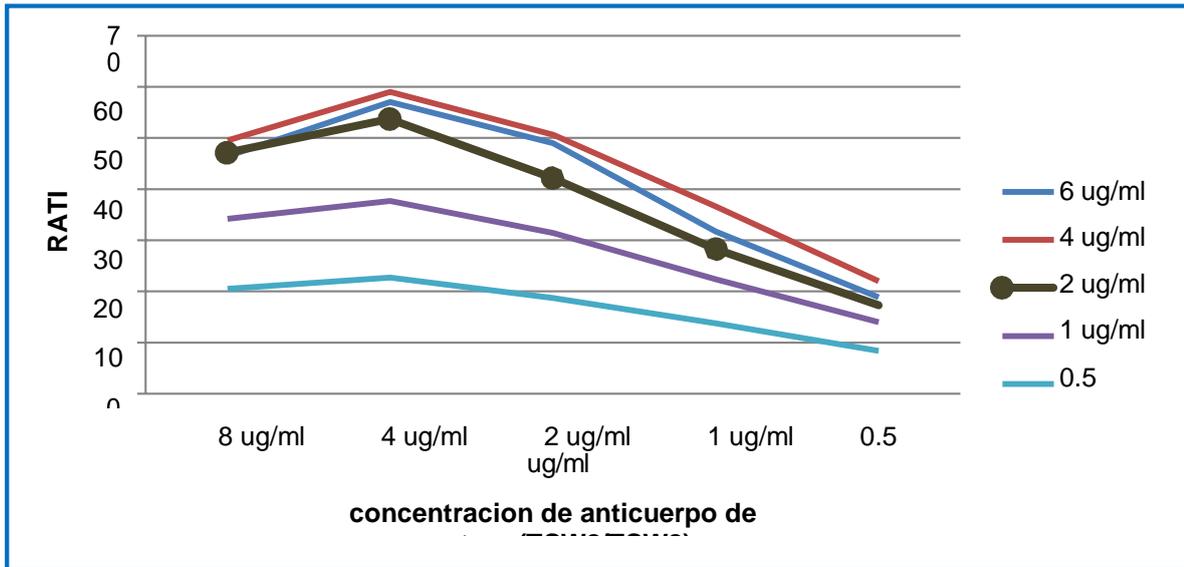


Gráfico 11: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección del mAbs TsW8 (checkerboard).

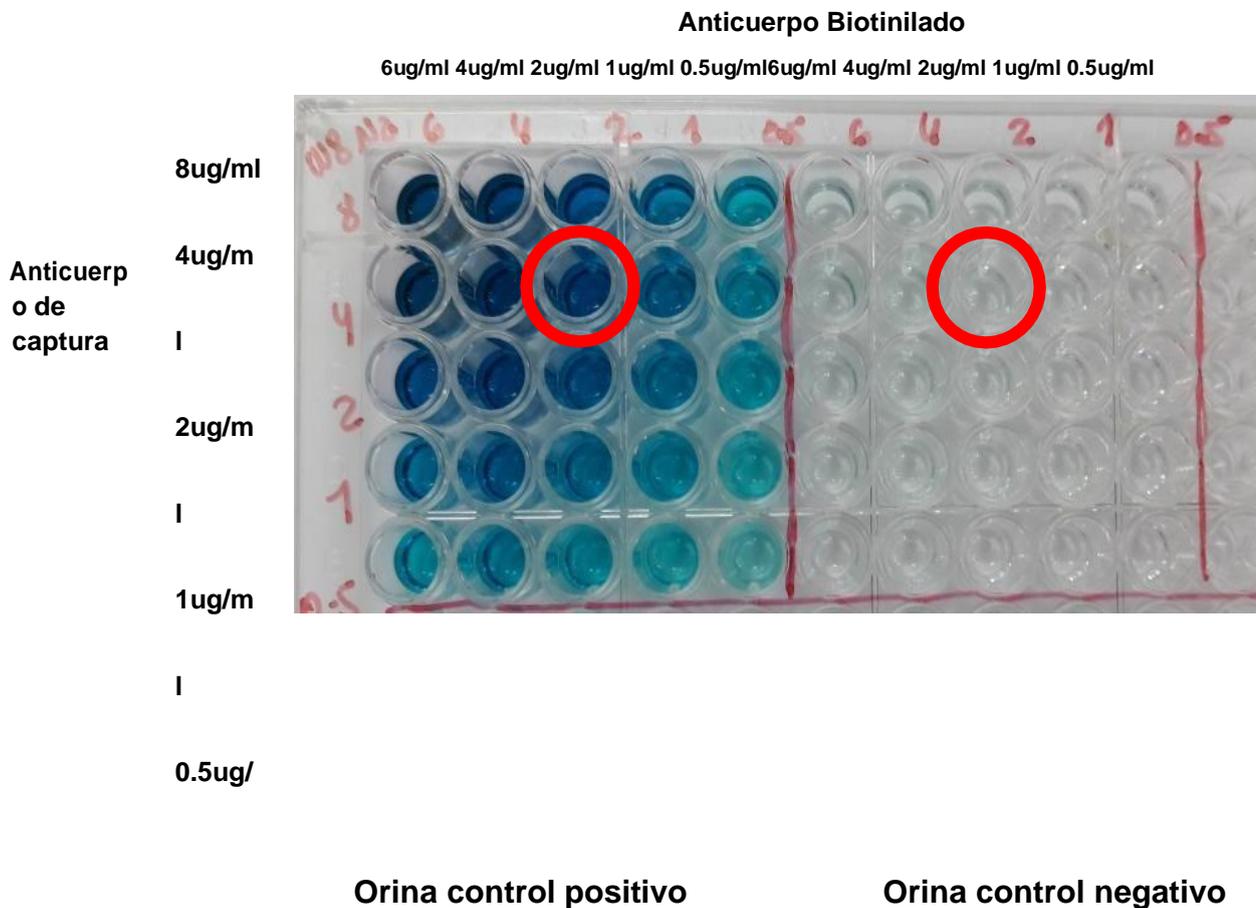


Imagen 17: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de

captura y detección con el mAbs TsW8.

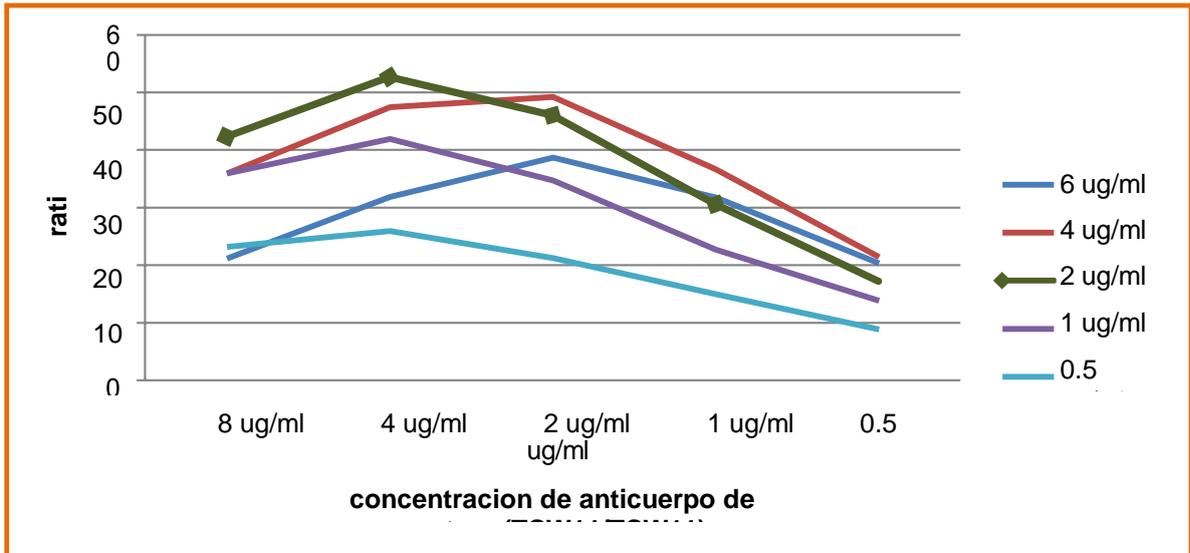


Gráfico 12: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de captura y detección del mAbs TsW11 (checkerboard).

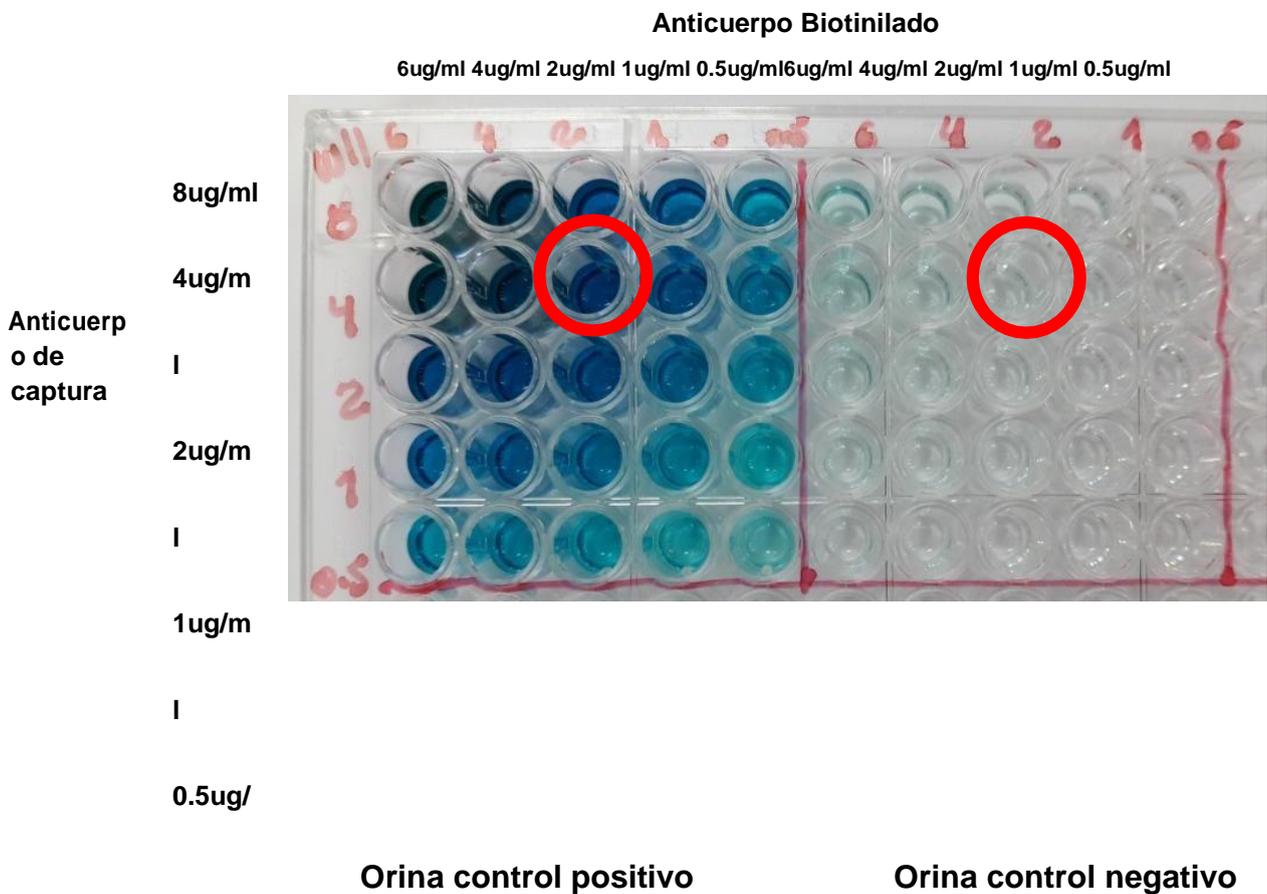


Imagen 18: Evaluación de la concentración óptima del anticuerpo de

captura y detección con el mAbs TsW11.

4.1.8 Determinar la mejor pareja de anticuerpos monoclonales en ELISA tipo sándwich para la detección de antígeno somático de *T. solium* en muestras de orina.

Se realizó todas las combinaciones posibles con los tres mejores mAbs que fueron capaces de detectar antígenos en muestras de orina control positivo lo que significa que son reactivos, todos bajo los parámetros óptimos obtenidos en los ensayos anteriores. Resultando la mejor pareja de combinación el TsW8 y TsW5.

En la **tabla 9** se puede visualizar el valor de los OD para cada par de mAbs con sus concentraciones correspondientes, en donde el par TsW8 (4ug/ml) como captura y el TsW5 (4ug/ml) como detección dan un ratio de 41, se selecciona este par como mejor opción por ser un par heterólogo y presentar una buena reactividad frente a los otros pares.

Isotipo Captura-Detección	Ac. captura	Ac. Detección	CONTROL (+) OD	CONTROL (-) OD	RATIO (OD+/OD-)
IgM - IgM	TsW5 (2ug)	TsW5 (4ug)	2.35 2	0.05 7	41
IgM - IgM	TsW5 (2ug)	TsW8 (4ug)	1.79 3	0.05 6	32
IgM - IgM	TsW5 (2ug)	TsW11 (4ug)	2.32 2	0.06 4	36
IgM - IgM	TsW8 (4ug)	TsW5 (4ug)	2.50 8	0.06 1	41
IgM - IgM	TsW8 (4ug)	TsW8 (4ug)	1.90 3	0.05 6	34
IgM - IgM	TsW8 (4ug)	TsW11 (4ug)	2.49 0	0.06 3	40
IgM - IgM	TsW11 (4ug)	TsW5 (4ug)	2.00 7	0.06 1	33
IgM - IgM	TsW11 (4ug)	TsW8 (4ug)	1.52 1	0.06 3	24
IgM - IgM	TsW11 (4ug)	TsW11 (4ug)	1.98 7	0.07 0	29

Tabla 9: Evaluación de los pares de mAbs capaz de detectar antígeno.

4.1.9 Evaluación de tiempos de incubación y tipos de sustrato.

Se trabajó con el mejor par de mAbs, TsW8 4ug/ml (captura) y TsW5 4ug/ml (Biotinilado/detección) y se continuó modificando algunos parámetros para obtener la mejor performance del ELISA tipo sándwich.

En el **gráfico 13**, se observa un ratio de 64 para la plataforma de ELISA Sándwich donde se emplea como sustrato al O – Phenylene diamine dihydro–chloride (OPD) a diferencia del ratio 28 obtenido empleando el sustrato Sure Blue TMB 1- Component Microwell Peroxidase Substrate.

En la **imagen 19**, visualmente se aprecia una coloración amarilla para las muestras positivas con el sustrato O – Phenylene diamine dihydro – chloride (OPD) y nada de coloración para muestras negativas. De la misma forma se aprecia coloración azul para las muestras positivas con el sustrato Sure Blue TMB 1- Component Microwell Peroxidase Substrate y nada de coloración para muestras negativas.

En la **imagen 20**, se puede observar el esquema final de la plataforma de ELISA tipo sándwich en donde se emplea un anticuerpo IgM de captura y un anticuerpo IgM Biotinilado como detección.

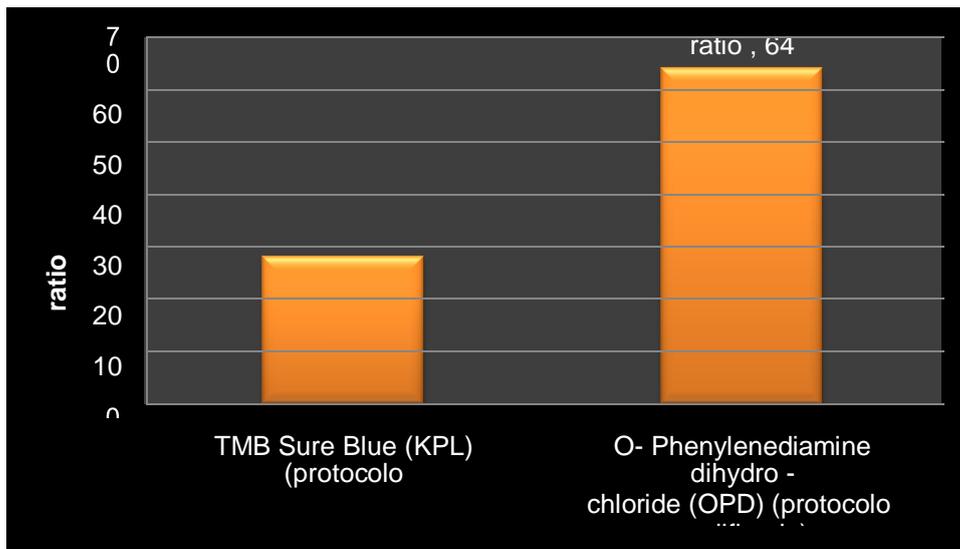


Gráfico 13: Evaluación de tiempo de incubación y sustrato

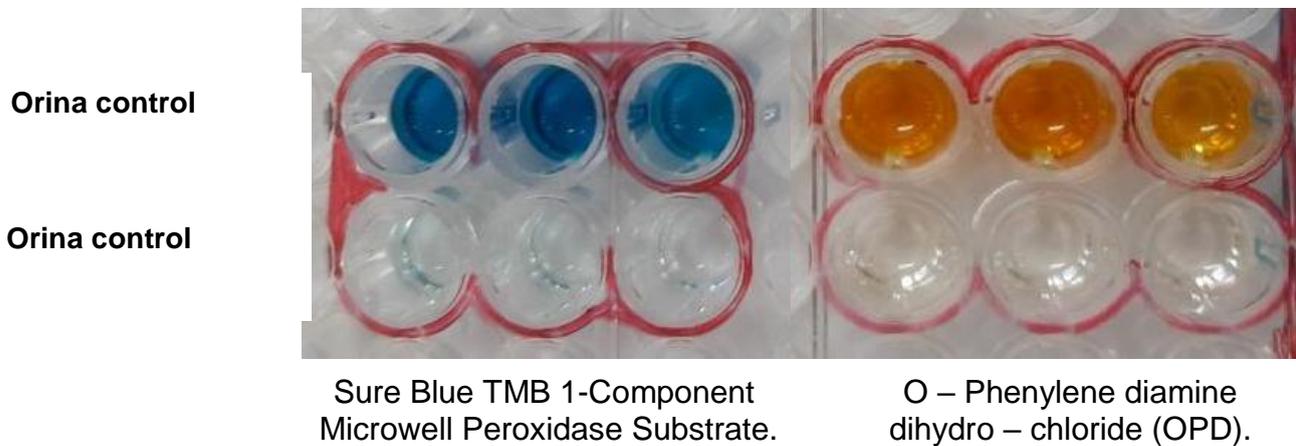


Imagen 19: Evaluación de los tipos de sustrato

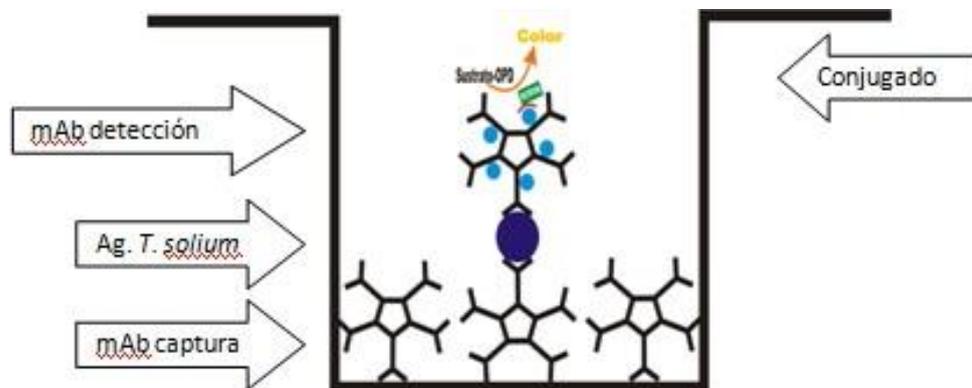


Imagen 20: Esquema final del ensayo ELISA tipo sándwich doble mAbs heterólogo isotipo IgM.

4.2 Discusión.

Neurocisticercosis infección causada por el cisticerco de *T. solium*, es la parasitosis que con frecuencia afecta al sistema nervioso central, invadiendo cualquiera de sus estructuras, principalmente parénquima cerebral, ventrículos, meninges y médula, causa más común de epilepsia en adultos, en los países en desarrollo, es endémico en la mayor parte del mundo y considerada importante en el problema de salud pública, más del 80% de los 50 millones de personas afectadas en el mundo por epilepsia viven en países de escasos recursos ⁽²⁾. Su diagnóstico por imágenes es muy costoso, y no pueden estar disponibles en muchas áreas endémicas.

La mayoría de las pruebas serológicas principalmente en diversos métodos detectan anticuerpos en fluidos corporales y recientemente, ensayos basados en la detección de antígeno (Ag) para identificar individuos o animales con parásitos viables.

La importancia que representa el estudio reside en determinar parámetros óptimos para la estandarización de un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales

del cisticerco de *T. solium* para la detección del antígeno de cisticercosis es una opción interesante, de la cual podríamos saber si la infección se encuentra activa empleando muestras de orina y podría ser importante cuando se deben tomar decisiones con respecto al tratamiento.

Los ensayos de antígeno actualmente emplean anticuerpos monoclonales (mAbs) producidos contra *T. saginata*, y tienen reacción cruzada conocida con los céstodos de animales pero son altamente específicos en muestras humanas.

Se han desarrollado plataformas de ELISA sándwich empleando dos anticuerpos monoclonales contra un epítipo de glucoproteína repetitivo de *T. saginata* ⁽²⁶⁾, para ser utilizados en el diagnóstico de NCC. Nuestro enfoque fue emplear 4 anticuerpos monoclonales contra el cisticerco de *T. solium*. de los cuales 3 de ellos mostraron ser altamente reactivos en el desarrollo y optimización del ensayo de ELISA para la detección de antígeno, y para mejorar el rendimiento se realizaron combinaciones entre los mAbs. De los cuales el mAb TsW8 actúa como captura y el mAb TsW5 biotinilado actúa como conjugado o mAb de detección, este par heterólogo es el que mejor complementariedad mostró, obteniendo un ratio de 41, mayor frente a los otros pares de mAbs.

Estos mAbs presentan buena reactividad en un ELISA directo en donde se les emplea solo como anticuerpo de captura y como conjugado emplean anticuerpo policlonal de conejo ⁽²⁰⁾.

También se exploró la utilidad de la muestra de orina y en donde se puede encontrar de forma confiable antígeno de cisticerco en personas infectadas, es un enfoque no invasivo y en donde se puede obtener mayor volumen de muestra para el ensayo, la excreción y reacción del antígeno en orina ya ha sido demostrada por otros investigadores ⁽²¹⁾. Hasta ahora los estudios han obtenido resultados alentadores y

nuestro estudio empleando muestras de orina ha sido favorable y permite seguir evaluando para otras pruebas y ser una opción interesante y tener una herramienta más y que esta sea útil para estudios subsecuentes.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se logro realizar la biotinilación de los 4 anticuerpos monoclonales TsW5, TsW7, TsW8 y TsW11.
- Se selecciono como mejor placa, la IMMULON 4HBX.
- Se selecciono como mejor bloqueante la leche Carnation a la concentración del 2%.
- Se selecciono como buffer de adherencia al Phosphate Buffered Saline Dulbecco pH7.2 - Oxoid.
- Se determino como la concentración óptima para el anticuerpo de captura y detección 4ug/ml.
- Se selecciono como sustrato O- Phenylenediamine Dihydro - Chloride (OPD), disuelto en buffer citrato, con el tiempo de incubación de 15min.
- Se selecciono el mejor par de mAbs para el ELISA tipo sándwich TsW8 como captura y el TsW5 y como detección.

5.2 Recomendaciones

- Evaluar la plataforma de ELISA tipo sándwich con muestras orina de pacientes con diferentes tipos de lesiones de neurocisticercosis.
- Determinar sensibilidad y especificidad del ensayo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bautista Rojas I. Neurocisticercosis una realidad y sus limitantes en el diagnóstico. [Revisión bibliográfica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Facultad de medicina veterinaria; 2009.
2. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2018. Teniasis y cisticercosis. [Citado 3 de agosto 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
3. García HH, Gonzales AE, Martínez SM, Gilman RH. Teniasis/Cisticercosispor *Taenia Solium*, un serio problema de salud pública en el Perú. Oficina General de Epidemiología. Perú. Lima; 2001.
4. Del Brutto OH, García HH. *Taenia solium* Cysticercosis - The lessons of history. Journal of the Neurological Sciences. 2015; (359). 392–395
5. Nash TE, Garcia HH. Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis. Europe PMC Funders Group. 2012; 7 (10): 584–94.
6. Centro para el control y la prevención de enfermedades (CDC). [Internet]. Enfermedades tropicales desatendidas y afecciones del sistema nervioso – Cisticercosis. [Citado 10 de agosto del 2017]. Recuperado a partir de: http://www.cdc.gov/parasites/cysticercosis/health_professionals/index.html#
7. Garcia HH, Rodriguez S, Gilman RH. *et al.* Neurocysticercosis: Neurocysticercosis: is serology useful in the absence of brain imaging. TropMedIntHeal. 2012; 17(8):1014–8.
8. Davelois K., Escalante H., Jara C. Rendimiento diagnóstico del Western Blot para detectar simultáneamente anticuerpos en pacientes con cisticercosis, hidatidosis y fascioliasis humana. Revista peruana de medicina experimental y salud pública.

- [internet] 2016. [citado 20 de junio del 2018] vol.33 (4). Disponible en: <http://www.rpmesp.ins.gob.pe/index.php/rpmesp/article/view/2543/2571>
9. Del Brutto OH, Rajshekhar V, White Jr AC, Del Brutto O, White Jr A, Tsang V, *et al.* Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 2001; 57:177–183.
 10. Carpio A, Fleury A. Neurocysticercosis: Neurology and Neurobiology. *Neglected Tropical Diseases and Conditions of the Nervous System*. 2014; 127–46.
 11. García HH, González A., Gilman R., Bernal T., Rodríguez S., Pretell E., *et al.* Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to Neurocysticercosis. *The*
 12. Huete F. Durán O. Soto C. Neurocisticercosis. *Neurología - Infectología. Revista médica de costa rica y centroamerica* LXX 2013; (607):467–73.
 13. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 2002. 66(4):427–430.
 14. Velasquez R., Rojas S., Briceño A., Prieto M. Neurocisticercosis: Enfermedad infecciosa desatendida, olvidada y emergente. *Comunidad y Salud* Año 2016; 14 (2), Jul-Dic. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375749517003>
 15. Del Brutto O. Neurocysticercosis. *American Academy of Neurology*. 2012; 18 (6): 1392-1416.
 16. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la salud. Informe Primera Reunión Regional sobre control de *Taeniasolium* en América Latina. Colombia, 2015. [Internet]. 2018 [citado 21 de noviembre del 2018]; Recuperado a partir de: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2016/primera-reunion-regional-control-tena-solium-americas-2015.pdf>
 17. García H., *et al.* Epidemiología y Control de la Cisticercosis en el Perú. *RevPeruMedExp Salud Pública*. 2010; 27(4): 592-97.
 18. Coonrod J. Urine as an antigen reservoir for diagnosis of infectious diseases. *Am J Med*. 1983 Jul 28;75 (1B):85-92. [citado 4 de junio del 2019]; Recuperado a partir de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6309001>

19. Duran J. Neurocisticercosis: problemas comunes. *Revistade Neurología*. [Internet]. 2018 [citado 5 de diciembre del 2018]; Recuperado apartir de: https://www2.bago.com.bo/sbn/publicacion/vol2_1_04/9%20Neurocisticercosis.pdf
20. Paredes A., Sáenz P., Marzal M., *et al.* Anti-Taeniasolium monoclonal antibodies for the detection of parasite antigens in body fluids from patients with Neurocysticercosis. *Exp Parasitol.* 2016 July; 166: 37–43.
21. Mwapea K., Praetb N., Benitez W. *et al.* Field evaluation of urine antigen detection for diagnosis of *Taeniasolium* cysticercosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 105 (2011) 574– 578.
22. Garcia HH, Harrison L., Parkhouse R., Montenegro T., Martinez S., Sang T., Gilman R. and the Cysticercosis Working Group in Peru. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 92(4): 411-414.
23. Castillo Y., Rodriguez S., García H., Brandt J. and Dorny Pierre, for the Cysticercosis Working Group in Perú. Urine Antigen Detection for the Diagnosis of Human Neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 80(3), 2009, pp. 379–383
24. Parija M., Biswas R., Harish B., Parija S.. Detection of specific cysticercus antigen in the urine for diagnosis of neurocysticercosis. *Acta Tropica* 92 (2004) 253–260.
25. Tinoco Y., González A., López T., Silva M.. Uso de ELISA- captura de antígeno en el monitoreo de porcinos infectados naturalmente con *cysticercus cellulosae* y tratados con oxfendazol. *Rev Inv Vet Perú* 2004; 15 (2):132-140.
26. Brandt J., Geerts, Dedeken R., Kumar V., Eulemans F., Brijsl., Falla N.. A monoclonal antibody-based Elisa for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *International Journal for Parasitology* 1992; 22(4):471–7.
27. Torres J. Cysticercosis Disease Burden in Latin America. *America and the Caribbean, Neglected Tropical Diseases*, 2015.
28. Yanagida T., Sako Y., Nakao M., Nakaya K., Ito A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taeniasolium* in Japan. *Parasites & vectors* 2012, 5; 18.

29. Cure G. , Roldán N., Quiñones G., Acosta A. *et al.* Neurocysticercosis. *Acta Neurol Colomb* 2008; 25:42-53).
30. Del Brutto O. Neurocisticercosis: Actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología* 2005; 20(8): 412 – 418.
31. Larralde C., De Aluja A. Cisticercosis guía de profesionales de la salud, México. Biblioteca de la salud. [Internet]. 2006 [citado el 10 de mayo del 2018]. Recuperado a partir de:
<http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s1/CistiBook.pdf>
32. Del Brutto O., García HH. Cysticercosis of the human nervous system. 1ra ed. Berlín. Springer- Verlag Berlin Heidelberg; 2014.
33. Murrell KD., Dorny P., Flisser A., Nash T., Pawlowski Z. Guidelines for the surveillance, prevention and control of taeniosis / cysticercosis. WHO/FAO/OIE; 2005. 2006 [citado el 30 de mayo del 2018]. Recuperado a partir de: <https://www.oie.int/doc/ged/d11245.pdf>
34. Mira N., Serrano M., Sáenz J. y Cardona C. Diagnóstico de las teniasis intestinales. *Control calidad SEIMC*, 2011.
35. Flisser A., Vargas L., Parada y Laclette J. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia*, mayo, 2006.
36. Botero D. Parasitosis Humana. 5ta ed. Medellín, Colombia; 2012.
37. Garcia HH., Del Brutto O. *Taenia solium* cysticercosis. *Infectious Disease Clinics Of North America*. Vol. 14 – N° 1 - March 2000.
38. Seddighi A., Nikouei A., Sedighi A., *et al.* Neurocysticercosis: Manifestations, Diagnosis and Treatment. *International Clinical Neuroscience Journal*. Vol 2, No 4, Autumn 2015.
39. Sarria S., Frasccheri L., Siurana S., Auger C. y Rovira A. Neurocisticercosis: Hallazgos radiológicos. *Radiología*. 2013;55(2):130 – 141.

40. León N., Padilla C., Pajuelo M., Sheen P., Zimic M. Cisteínoproteasas Catepsinas L de *Taenia Solium*: Rol Biológico en la infección y potencial uso para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2013; 30(3): 446-54.
41. Flisser A.. Cisticercosis: enfermedad desatendida. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2011;68(2):138-145
42. Carabin H., Ndimubanzi P., Budke C., *et al*. Clinical Manifestations Associated with Neurocysticercosis: A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2011. 5(5): e1152.
43. Takayanagui O. Neurocysticercosis. *Arq Neuropsiquiatria* 2013; 71(9-B):710-713.
44. Saavedra H., Gonzales I., Alvarado M., Porras M., Vargas V., Cjuno R. *et al*. Diagnóstico y manejo de la neurocisticercosis en el Perú. *RevPeruMedExp Salud Pública*. 2010; 27(4): 586-91.
45. Ferrer E., Teniasis/Cisticercosis: del diagnóstico convencional al diagnóstico molecular. *Revista de la facultad de ciencias de la salud. Universidad de carabobo*. Diciembre 2007 - vol. 11, Supl. N° 1.
46. Rodriguez S., Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathogens and Global Health* 2012 VOL. 106 N° 5.
47. Garcia H., HarrisonL., ParkhouseR., Montenegro T., Martinez S., Tsang W., *et al*.A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocisticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1998; 92(4): 411–414.
48. Crowther J. The ELISA Guidebook. Methods in molecular biology [internet], vol. 149. Humana Press. Totowa, New Jersey, 2001. [citado el 5 de diciembre del 2018].
Disponibile en:
[file:///C:/Users/Yesica%20Ss/Downloads/ELISAGuidebook2009%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Yesica%20Ss/Downloads/ELISAGuidebook2009%20(1).pdf)
49. Prieto J. Yuste J. L clínica y el laboratorio. Ed. 21. Barcelona: Elseiver; 2010.
50. Abul K., Abbas A., Lichtman S. Inmunología celular y molecular. 8va ed. Elsevier, España; 2015.

51. Abcam. Protocolos book [internet]. 2017.[citado el 5 de diciembre del 2018].
Recuperado a partir de: <https://docs.abcam.com/pdf/misc/abcam-protocols-book-2010.pdf>
52. Guzmán E. Las pruebas de ELISA [internet] Vol. 140,GacMédMéz , 2004. [citado el 10 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>
53. Machado N., Tellez G., Castaño J. Anticuerpos monoclonales: desarrollo físico y perspectivas terapéuticas. *Asociación colombiana de infectología*. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia, vol. 10 - 3, 2006.
54. Villaescusa L. Producción de anticuerpos monoclonales. [internet] Vol. 41. Nº. 409, 2017, págs. 1022-1028. Universidad de Alcalá. . [Citado el 10 de diciembre del 2018].
Recuperado a partir de: <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2017/12/13/120423.pdf>
55. Aguillon J., Contreras J., Dotte A., Cruzat A., Catalán D., Salazar L. *et al.* Nuevas armas inmunológicas para La medicina Del siglo XXI: Terapia biológica basada en el uso de anticuerpos monoclonales de última generación. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1445-1453.
56. García A. Anticuerpos monoclonales: Aspectos básicos. *Neurología*. 2011;26(5):301—306.
57. Sikora K., Howard M., Anticuerpos Monoclonales. [internet] Barcelona: Reverete; 1986. [citado el 1 de abril del 2019]. Disponible en: <https://books.google.com.pe/books?id=Qy7uawCEfw4C&printsec=frontcover&dq=ANTICUERPOS+MONOCLONALES&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewi-zqLEhN7hAhXKuFkKHY-IBfAQ6AEILjAB#v=onepage&q&f=false>
58. Álvarez I. Tamayo E. (dir.) Inmunoterapia en la artritis reumatoide. [trabajo de fin de grado en internet]. Universidad de Cantabria, 2016. [citado el 1 de abril del 2019].
Recuperado a partir de: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/9557>

59. Michnick S., Sidhu S. Submitting antibodies to binding arbitration. NatChem Biol. [Internet] 2008 [citado el 2 de abril del 2019]; Jun Vol.4. (6): 326-9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18488004>
60. Arce C. Anticuerpos Monoclonales específicos de inmunoglobulina G canina: Caracterización y aplicación en inmunoensayos. [tesis doctoral en internet]. [Córdoba]: Universidad de Córdoba; 2001. [citado el 2 de abril del 2019]. Recuperado a partir de: <https://helvia.uco.es/xmlui/bitstream/handle/10396/305/13076334.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
61. Thermo Scientific. Biotinilación [internet]. [citado el 2 de abril del 2019]. Recuperado a partir de: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/biotinylation.html>
62. Gutiérrez L., Ferro G. (dir) Ureña F. (dir). Desarrollo de una formulación para la preparación del complejo ^{99m}Tc -IDA-b/sBiotina. [tesis final de grado en internet]. [Toluca]: Universidad autónoma del estado de México, 2000. [citado el 3 de abril del 2019]. Recuperado a partir de: https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/33/007/33007080.pdf?r=1&r=1
63. Thermo Fisher Scientific. Avidin – Biotin Technical handbook [internet]. [citado el 12 de abril del 2019]. Recuperado a partir de: https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Images/integration/1601675_AvB_i_H_B_INTL.pdf
64. Fernández D. Complejo de Avidina – Biotina y su uso en la Biología molecular. Interferon y Biotecnología. 1985; Vol. 2, N°.2, 137 -141.
65. Abyntek. [Internet]. Guía sobre la conjugación de anticuerpos; 2016. [citado el 13 de

abril del 2019]. Recuperado a partir de:<http://www.abYTEK.com/guia-sobre-la-conjugacion-de-anticuerpos/>

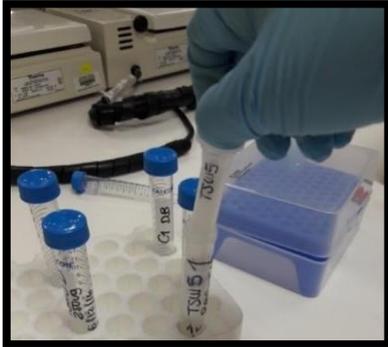
66. Thermo Fisher Scientific. Biotin Binding Protein Conjugates. [Internet]. [citado el 18 de abril del 2019]. Recuperado a partir de: <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/antibodies/biotin-binding-protein-conjugates.html>
67. Hernández R., Fernández C., Baptista P. Metodología de la investigación. 3ra ed. México DF: McGraw-Hill Interamericana; 2003.

ANEXOS

ANEXO 01

FORMULACION DE LA PREGUNTA	OBJETIVOS	VARIABLE	METODOLOGIA
<p>¿Cuáles son los parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de Neurocisticercosis humana en muestras de orina?</p>	<p>General:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Establecer los parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales para el diagnóstico de Neurocisticercosis humana en muestras de orina. <p>Específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Evaluar la biotilación de los anticuerpos monoclonales contra el antígeno somático de <i>T. solium</i>. • Evaluar tipos de placas, selección y concentración de la solución buffer bloqueante para la estandarización del ELISA tipo sándwich. • Determinar el tipo de solución buffer de adherencia del anticuerpo de captura al pocillo de la placa. • Determinar la concentración óptima de los anticuerpos monoclonales captura y detección contra los antígeno somático de <i>T. solium</i>. • Determinar la mejor pareja de anticuerpos monoclonales para la detección de antígeno somático de <i>T. solium</i> para la estandarización del ELISA tipo sándwich. • Determinar el tiempo de incubación y tipo de sustrato para la estandarización del ELISA tipo sándwich. 	<p>Uni-variable: Parámetros óptimos para estandarizar un ELISA tipo sándwich con anticuerpos monoclonales.</p>	<p>La presente investigación es de tipo cuantitativa, prospectivo una medición para cada variable en diferentes experimentos. Asimismo, es una investigación cuasi experimental, porque los sujetos no se asignaron aleatoriamente y hay intervención sobre las variables</p>

ANEXO 02

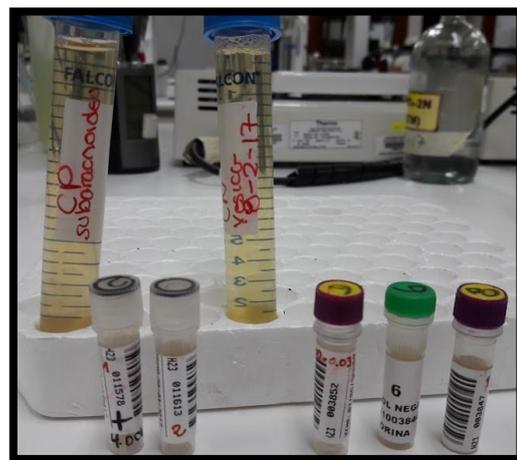


Biotinilación de los anticuerpos usando el Kit EZ- Link Sulfo – NHS

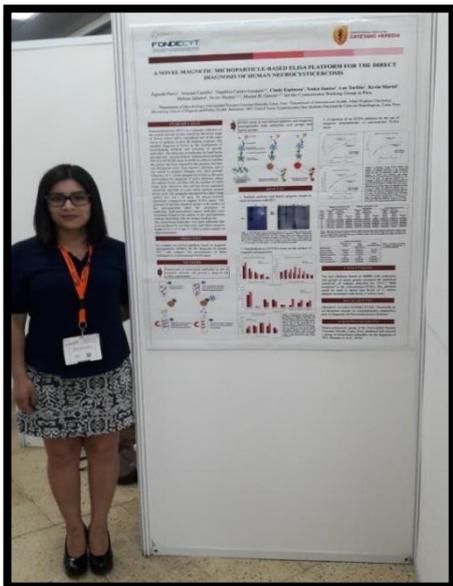
23/10/17

Lista de colecta de sueros Negativos

1) Nombres y apellidos: ROSARIO ANTONIO VITA Edad: 35 Procedencia: LIMA Dirección: C/ CANTARERO 355, San Martín D.N.I.5	3) Nombres y apellidos: KATHERINE VALDES SANCHEZ Edad: 30 7460920 Procedencia: DEL PERU/PERU/PERU/PERU Dirección: CALLE LOS CAMARONES 010 SANTA ROSA
2) Nombres y apellidos: ANGELINA MARIANE IBARRA Edad: 22 Procedencia: LIMA Dirección: AV. TIXON, 1608/A 12° 720 31505 2000	4) Nombres y apellidos: NORMA JESUS QUATRAM DERRIGA Edad: 22 Procedencia: LIMA Dirección: CALLE ANTONIO COSTA 2541, BARR. PAMPAS SUR
5) Nombres y apellidos: GUILERMO ZHARRE SELVA Edad: 16 Procedencia: LIMA Dirección: PU. SANTA ZOH, 21 AGUSTINO	6) Nombres y apellidos: SUNIA ESPINOSA PASTOR MARQUEZ Edad: 58 Procedencia: LIMA Dirección: AV. ALVARO M. VIAL BARRIO B, 1115 LOS OLIVOS BARRIO SANTA
7) Nombres y apellidos: ROBERTO PARRALINO ESTEVE Edad: 28 74700185 Procedencia: LIMA Dirección: CALLE EMILIO TERNER 432 MIRAFLORES	8) Nombres y apellidos: ESTEFANY GUANOCA SANCHEZ Edad: 27 7453724 Procedencia: LIMA Dirección: LOS PASADOS DEL SUR 277 C. URB. SAN MARCELIN
9) Nombres y apellidos: EMILY TOYAMA SWEET Edad: 31 43849619 Procedencia: LIMA Dirección: 31 DALLAPOLLE 312, URB. MIRAFLORES, 20160	10) Nombres y apellidos: RODRIGO ALVARADO DEL VALLE LAMARTE Edad: 22 Procedencia: LIMA Dirección: CARRERA BULLOCK 380 SURCO
11) Nombres y apellidos: CERONDA SEGUNDO VALDES Edad: 35 72340787 Procedencia: LIMA Dirección: URB. SEQUA ELITE/PAPE 412 F. LOTE 11	12) Nombres y apellidos: OSCAR F. MONTAÑA GUILLEN Edad: 31 43347512 Procedencia: LIMA Dirección: SR. LOS AGUAS 271 BARR. MIRAFLORES



Lista y colecta de muestras de orina



Exposición del trabajo de investigación en Chile



Cierre del proyecto de investigación

