



## OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA EL CONTAMINANTE EMERGENTE, ESTREPTOMICINA

Ivonne Chaidés, Norma Angélica Chávez, Eva María Salinas Miralles, Juan Jáuregui Rincón, Ileana Ernestina Medina, Elizabeth Verónica Moreno, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Dpto. de ingeniería Bioquímica y Dpto. de Microbiología, Aguascalientes CP. 20131, ivonne.chaidés@gmail.com.

*Palabras clave: anticuerpos, estreptomicina, contaminante emergente.*

### Introducción.

La principal fuente de generación contaminantes emergentes, son las aguas residuales de origen hospitalario(1), debido a la nula o escasa eliminación de estos en las plantas tratadoras de agua, existe un peligro latente en la generación de cepas bacterianas, de diferentes microorganismos o/y virus resistentes a los antibióticos (2). Un antibiótico ampliamente utilizado es la estreptomicina (STR), la cual se tiene reportado que causa problemas de ototoxicidad y nefrotoxicidad entre otros, en el humano (3). Varios métodos para la detección de antibióticos residuales han sido establecidos, tales como microbiológicos, cromatográficos e inmunoquímicos (4), estos últimos son excelentes herramientas exploratorias debido a su alta sensibilidad, sencillez y portabilidad (5).

El objetivo de este trabajo de investigación fue el de obtener y purificar anticuerpos policlonales contra la estreptomicina, mismos que pueden ser empleados para el desarrollo de técnicas inmunoquímicas de detección de este contaminante emergente.

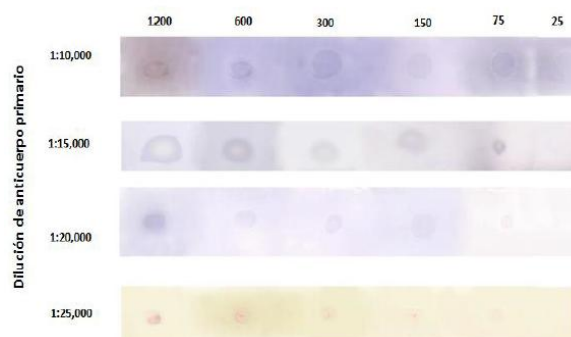
**Metodología.** Se inmunizaron conejos adultos de la cepa *Nueva Zelanda* con un compuesto de estreptomicina acoplada a KLH, concluidas las inmunizaciones se sacrificó a los animales y se obtuvo la mayor cantidad de suero posible, para la posterior purificación de los anticuerpos anti-estreptomicina (anti-STR).

Primera etapa. Purificación parcial, se realizó un precipitación con una solución saturada al 50% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (4.1 M) a 4°C durante toda la noche, seguida de una precipitación utilizando ácido caprílico, una vez recuperado el sobrenadante, se ultrafiltró en un equipo Amicon 8050, utilizando una membrana de celulosa regenerada de 10 kDa de corte.

Segunda etapa. Purificación total, esta etapa se realizó mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando una columna comercial Hi-Trap NHS-Activada HP (GE Healthcare), a la cual se acoplaron 20 mM de sulfato de estreptomicina, según indicaciones del proveedor. La pureza de los anticuerpos se verificó mediante Inmunoblot, mientras que la reactividad y especificidad de los mismos se comprobó por pruebas de Dot Blot.

**Resultados.** Al término del proceso de purificación, se obtuvieron anticuerpos capaces de reaccionar contra la

estreptomicina (anticuerpos anti-STR), lo cual quedó demostrado mediante pruebas de Dot Blot utilizando diferentes concentraciones de antígeno (STR) y de anticuerpo primario. En cuanto a especificidad, los anticuerpos no fueron específicos sólo contra la STR, sino que presentaron una reacción cruzada contra otros antibióticos aminoglucosidos (kanamicina, neomicina y paromomicina), pero no con antibióticos no aminoglucosidos.



**Fig. 1.** Obtención del título de anticuerpos VS antígeno. Se colocaron muestras de STR en diferentes concentraciones (1200, 600, 300, 150, 75 y 25 µg), las cuales se probaron con diferentes diluciones del anticuerpo anti-STR obtenido en el laboratorio (1:10,000, 1:15,000, 1:20,000 y 1:25,000).

**Conclusiones.** Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-STRP que fueron también reactivos contra otros antibióticos aminoglucósidos, pero no con otros tipos de antibióticos. Esto es importante porque con estos anticuerpos se pueden desarrollar inmunoensayos para detectar antibióticos aminoglucósidos en aguas residuales como control del tratamiento de estas.

**Agradecimiento.** Este proyecto fue realizado con el apoyo económico del consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT), así como el de la universidad autónoma de Aguascalientes (UAA).

### Bibliografía.

1. Lösch L., Merino L., Alonso J. (2005). UNNE. Comunicaciones científicas y tecnológicas. 1:4
2. Ramos C. (2009). Rev. Cubana Hig Epidemiol 47:2.
3. Rodríguez-Alvarez M. (2002). Enferm Infecc Microbiol 22 (1): 20-30.
4. Petrovic M., Gonzalez S., Barcelo D. (2003). Trends Anal. Chem., 22 (10): 685-696.
5. Bang-Ce Ye, Songyang Li, Peng Zuo y Xiao-Hong Li. (2008). Food Chemistry. 106: 797-803.