



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

“EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE  
ANTICUERPOS IgG EN CERDOS  
EXPERIMENTALMENTE  
INFECTADOS CON CISTICERCOSIS  
MEDIANTE UN ENSAYO MÚLTIPLE  
BASADO EN MICROESFERAS”

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

LUZ MILAGROS TORIBIO SALAZAR

LIMA-PERÚ

2023



**ASESOR**

PhD. Héctor Hugo García Lescano

**JURADO DE TESIS**

DRA. ROSA PATRICIA HERRERA VELIT

PRESIDENTE

DRA. PATRICIA SHEEN CORTAVARRÍA

VOCAL

DR. ARCADIO IVAN LOZADA REQUENA

SECRETARIO

## **DEDICATORIA**

A mí, por mi paciencia y dedicación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre, también llamado Rick, que me enseñó a tener perseverancia y determinación. A mi madre y hermanos, que fueron el mayor soporte que tuve en tiempos difíciles. A Iván, mi esposo, por ser siempre aquella persona capaz de motivarme, tranquilizarme y ayudarme a sacar lo mejor de mí. Por su compañía y apoyo constante en los momentos más difíciles.

A mi asesor y sobretodo mentor PhD. Héctor H. García Lescano por sus consejos académicos y de vida. Además de su apoyo y asesoría técnica en los ensayos realizados en este trabajo. De igual manera, al PhD. Javier Bustos, por confiar siempre en mi capacidad para la realización de trabajos y por brindarme muchas oportunidades de aprendizaje. Al PhD. Sukwan Handali, por la paciencia y constante capacitación en las técnicas de laboratorio aprendidas durante mi pasantía.

A mis amigas, que me siguen brindando su ayuda en todo momento, en especial Karen, Carolina, Jessica y Alessandra, por las palabras de aliento para finalizar este trabajo. A la unidad de cisticercosis del Instituto de Ciencias Neurológicas (INCN), en especial a Sarita, por ayudarme durante todo el trabajo de mi tesis y por brindarme la cafeína que necesitaba.

Finalmente, a todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

### **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Este estudio fue financiado por Fogarty International Center/NIH (training grant # D43TW001140) y el Peru-JHU TMRC Program (Improving Diagnostic and Management Tools for Neurocysticercosis) project #5U19AI129909

# EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE ANTICUERPOS IgG EN CERDOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON CISTICERCOSIS MEDIANTE UN ENSAYO MÚLTIPLE BASADO EN MICROESFERAS

## INFORME DE ORIGINALIDAD



## FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>theses.hal.science</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>2</b>	<b>www.tandfonline.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>3</b>	<b>assets.researchsquare.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>4</b>	<b>www.scielo.org.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>5</b>	<b>parasitesandvectors.biomedcentral.com</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>6</b>	<b>link.springer.com</b> Fuente de Internet	<b>&lt;1%</b>
<b>7</b>	<b>Francesco Pizzitutti, Gabrielle Bonnet, Eloy Gonzales-Gustavson, Sarah Gabriël et al. "Spatial transferability of an agent-based</b>	<b>&lt;1%</b>

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>7</b>
<b>IV.</b>	<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
<b>A.</b>	<b>Cisticercosis.....</b>	<b>10</b>
<b>B.</b>	<b>Biología y ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>C.</b>	<b>Cisticercosis porcina .....</b>	<b>12</b>
1.	Diagnóstico de la cisticercosis porcina .....	13
<b>D.</b>	<b>Respuesta inmune adaptativa humoral en hospedero.....</b>	<b>14</b>
1.	Herramientas para evaluar la presencia de anticuerpos IgG... 15	
2.	Antígenos recombinantes y péptidos sintéticos .....	17
<b>E.</b>	<b>Inmunoensayos multiplex basados en microesferas.....</b>	<b>20</b>
1.	Ventajas.....	22
<b>F.</b>	<b>El cerdo: hospedero intermediario y modelo animal para el estudio de la NCC.....</b>	<b>23</b>
1.	Inmunidad en el cerdo: Respuesta inmune adaptativa humoral en la infección por cisticercosis.....	24
<b>V.</b>	<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>A.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>27</b>
<b>B.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
<b>VII.</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
<b>A.</b>	<b>Diseño de estudio.....</b>	<b>28</b>
<b>B.</b>	<b>Población y muestras de estudio.....</b>	<b>28</b>
<b>C.</b>	<b>Procedimientos y técnicas.....</b>	<b>30</b>
1.	Obtención de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos..	30
2.	Optimización del ensayo basado en microesferas (MBA).....	32
3.	Electroinmunotransferencia blot (EITB).....	38
<b>D.</b>	<b>Recolección de datos.....</b>	<b>38</b>
<b>E.</b>	<b>Plan de análisis.....</b>	<b>38</b>
<b>F.</b>	<b>Consideraciones éticas.....</b>	<b>39</b>
<b>VIII.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>

A.	Optimización de MBA.....	40
B.	MBA para cisticercosis porcina: Detección de anticuerpos IgG por grupo de infección.....	41
C.	MBA para cisticercosis porcina: Comparación de la detección de anticuerpos IgG entre grupos de infección.....	44
D.	MBA para cisticercosis porcina: Detección de anticuerpos según tipo de infección.....	47
E.	Detección anticuerpos por LLGP-EITB.....	50
F.	Comparación de la presencia de anticuerpos de familias diagnósticas (GP50, T24 y 8kDa) medida por MBA y EITB.....	52
<i>IX.</i>	<i>DISCUSIÓN.....</i>	<i>56</i>
<i>X.</i>	<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>66</i>
<i>XI.</i>	<i>RECOMENDACIONES.....</i>	<i>68</i>
<i>XII.</i>	<i>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i>	<i>69</i>
<i>XIII.</i>	<i>ANEXOS</i>	

## RESUMEN

*Taenia solium* es el agente causal de la cisticercosis, que puede ocasionar una enfermedad neurológica (Neurocisticercosis, NCC) cuando el sistema nervioso central está infectado. Los cerdos son los huéspedes naturales y el modelo animal preferido para NCC. Las respuestas de anticuerpos generalmente se evalúan mediante el estándar de oro serológico, el ensayo de electroinmunotransferencia blot de Lentillectina (LLGP-EITB), pero este formato es técnicamente desafiante, no es cuantitativo y necesita un complejo proceso de purificación de antígenos para obtener las siete glicoproteínas de diagnóstico. Hemos caracterizado previamente 6 antígenos recombinantes que representan las familias de proteínas diagnósticas del LLGP-EITB. Se han identificado patrones de anticuerpos LLGP-EITB en tipos y estadios de NCC, pero aún no se ha cuantificado la concentración de anticuerpos en simultáneo. Este estudio desarrolló un inmunoensayo basado en microesferas magnéticas, conocido por sus siglas en inglés “MBA”, con los 6 antígenos recombinantes y evaluó su capacidad para cuantificar simultáneamente los niveles de anticuerpos IgG totales en 162 muestras de suero de 18 cerdos experimentalmente infectados a 1 (n=6), 3 (n=6) y 5 (n=6) meses de edad, y que fueron sangrados en 9 puntos de tiempo posteriores a la infección (PI) hasta el día 90PI. Los datos de la necropsia del estudio original demostraron más eficacia y quistes viables en cerdos jóvenes, y quistes degenerados en cerdos mayores. El MBA, fue capaz de describir la cinética de los niveles de anticuerpos IgG frente a los 6 antígenos evaluados, sin embargo, solo 3 de estos antígenos demostraron mayor capacidad para diferenciar cerdos con diferentes condiciones de viabilidad del quiste (rGP50, rT24H y sTs14). Asimismo, anticuerpos IgG producidos contra los antígenos rT24H y rGP50 fueron detectados en cerdos con

quistes viables o no viables y durante todo el curso de la infección; mientras que sTs14 generó una respuesta de anticuerpos más fuerte en infecciones viables. Además, se identificó un aumento progresivo de los niveles de fluorescencia emitidos por anticuerpos IgG contra rGP50 desde el día 21PI y desde el día 28PI para todos los demás anticuerpos. Los cerdos infectados a los 3 y 5 meses de edad mostraron una marcada disminución desde el día 57PI hasta la necropsia. Por lo tanto, el MBA utilizando 6 antígenos demostró ser una herramienta capaz de comparar la presencia simultánea de anticuerpos IgG contra antígenos recombinantes y péptidos sintéticos de *T. solium* durante el progreso de la infección por cisticercosis.

**Palabras clave:** *Taenia solium*, cisticercosis, neurocisticercosis, EITB, Ensayo de microesferas (MBA).

## ABSTRACT

*Taenia solium* is the cause of cysticercosis and can result in a neurologic disease (Neurocysticercosis, NCC) when the central nervous system is infected. Pigs are the natural hosts and the preferred animal model for NCC. Antibody responses are usually assessed by the serological gold standard, the Lentil-lectin enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (LLGP-EITB) assay, but this format is technically challenging, not quantitative and needs complex antigen purification process to obtain the seven diagnostic glycoproteins. Our group has characterized 6 recombinant antigens that represent the main protein families in LLGP-EITB diagnosis. LLGP-EITB antibody patterns in NCC types and stages have been identified, but the response of simultaneous recombinant proteins has not yet been quantified. In this study we evaluated the capacity of an immunoassay based on magnetic microspheres (commonly named as “MBA”) coupled with all 6 diagnostic recombinant antigens that allows a simultaneous quantification of IgG levels was developed to evaluate 162 serum samples from 18 pigs who were experimentally oral infected at 1 (n=6), 3 (n=6) and 5 (n=6) months-old, and that were bled at 9 time points post infection (PI) until day 90PI. Necropsy data from the original study demonstrated more efficacious infections and more viable cysts in younger pigs, and more degenerated cysts in older pigs. In this 6 antigens-MBA, the kinetic of all antibody responses against 6 antigens were detected; however, the antibody responses against three antigens showed differences in their ability to differentiate pigs with different cyst viability conditions (rGP50, rT24H and sTs14). Likewise, antibody responses against rT24H and rGP50 detected antibodies IgG in pigs either with viable or no viable cysts and during all the

course of infection, while sTs14 has a stronger response in viable infections. In addition, there was a progressive increase in the antibody response of rGP50 from day 21PI and from day 28PI for all the other antibodies. Pigs infected at 3 and 5 months-old showed a marked decrease from day 57PI until necropsy. Therefore, this new 6 antigens-MBA was capable of compare the simultaneous presence of IgG antibodies against *T solium* recombinant antigens and synthetic peptides during the progress of the cysticercosis infection.

**Key words:** *Taenia solium*, cysticercosis, neurocysticercosis, EITB, Microspheres-based assay (MBA).

## I. INTRODUCCION

La cisticercosis es una infección parasitaria ocasionada por la larva del cestodo *Taenia solium* que se desarrolla en cerdos y también puede infectar accidentalmente a humanos. Cuando la larva o cisticerco se aloja en el sistema nervioso central (SNC) se le conoce como neurocisticercosis (NCC) y esta es la principal causa de epilepsia adquirida a nivel mundial (1, 2). Actualmente, tanto la cisticercosis porcina como la NCC representan un gran problema de salud pública, ya que ocasiona pérdidas económicas significativas por la carne de cerdo infectada, mientras que la NCC ocasiona pérdidas en el sistema de salud debido a los ratios de morbilidad y costos del tratamiento (3, 4).

El diagnóstico de la cisticercosis es complejo debido a que la enfermedad no presenta sintomatología específica. El diagnóstico definitivo está basado en la confirmación de la presencia del parásito mediante la necropsia de cerdos (cisticercosis) o neuroimágenes cuando infecta el cerebro (NCC) (5). Sin embargo, estos métodos de diagnóstico son logísticamente costosos o no están disponibles en las zonas de endemidad que son a la vez zonas de pobreza; por ello se ha propuesto también el uso de pruebas de inmunodiagnóstico capaces de detectar anticuerpos específicos y antígenos parasitarios en los hospederos (6). En este sentido diversas técnicas, principalmente serológicas, se han desarrollado. El ensayo acoplado a enzimas de inmunoelectrotransferencia blot de glicoproteínas afines a la lentil lectina (conocido por sus siglas en inglés: “LLGP-EITB”) es una técnica de western blot que detecta la presencia de anticuerpos IgG contra 7 glicoproteínas de *T*

*solium* con una performance excepcional cercana al 100% en infecciones activas (7, 8). No obstante, esta prueba está limitada a ciertos grupos de investigación, necesita de grandes cantidades de material parasitario, es técnicamente desafiante, costosa y proporciona solo resultados cualitativos.

En la búsqueda de una alternativa para el diagnóstico de cisticercosis, se han desarrollado nuevas tecnologías como el diseño de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos que representan a las tres principales familias glicoproteínas utilizadas en el ensayo del LLGP-EITB. Estas proteínas recombinantes han sido caracterizadas y ampliamente estudiadas en inmunoensayos individuales obteniendo performances muy similares a las de su forma nativa (9-11). Además en el LLGP-EITB se han identificado patrones de respuestas de anticuerpos en determinados tipos de NCC y/o estadios de la infección (12), sin embargo, no se ha estudiado detalladamente la respuesta de las proteínas recombinantes en simultáneo. En este sentido, la implementación de un inmunoensayo basado en microesferas magnéticas (conocido por sus siglas en inglés “MBA”) permitiría evaluar cuantitativamente de una manera novedosa, menos costosa y precisa las respuestas de varios anticuerpos IgG en simultáneo.

El cerdo, además de ser el hospedero intermediario en el ciclo de vida de *T solium*, cumple un rol importante como modelo animal por excelencia para el estudio de la NCC; debido a la similitud en la patología de la infección cerebral con el humano (13). El estudio sistemático del desarrollo de la

cisticercosis en modelos animales de infecciones controladas, ha permitido conocer mejor las características relacionadas al desarrollo, establecimiento y muerte del parásito en el sistema nervioso central (SNC) (14-16). Con el objetivo de comprobar el potencial uso de la novedosa técnica del MBA para evaluar la respuesta simultánea de anticuerpos específicos IgG contra *T solium*, se planteó el uso de un panel de sueros de cerdos experimentalmente infectados con cisticercosis. El ensayo de MBA basado en el uso de microesferas conjugadas a las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos equivalentes a las utilizados en el LLGP-EITB utilizando el panel de sueros de cerdos escogidos para este estudio permitió conocer la cinética de las respuestas específicas de anticuerpos IgG durante el curso de la infección con cisticercosis en un entorno controlado, llevando a un mejor entendimiento de la relación hospedero-parásito desde el modelo animal porcino.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La cisticercosis es una infección parasitaria de relevancia en la salud pública. En el humano, la NCC es la causa más común de epilepsia adquirida a nivel mundial y en el cerdo la cisticercosis porcina ocasiona grandes pérdidas económicas, además de ser un reservorio y potencial riesgo de infecciones con teniasis (infección por *T solium* del estadio adulto). La falta de sintomatología específica para una infección por cisticercosis hace que su diagnóstico sea un reto, siendo la identificación del parásito el diagnóstico definitivo. Ya sea mediante necropsia para cisticercosis porcina o neuroimagen para NCC, estos métodos son costosos y no accesibles en muchas partes del mundo donde la enfermedad es endémica. Por estos motivos, los métodos de diagnóstico serológicos se han propuesto como herramientas para apoyar el diagnóstico en entornos hospitalarios o como pruebas de tamizaje. Asimismo para la cisticercosis porcina, el diagnóstico serológico ha permitido diversos estudios epidemiológicos que han ayudado a identificar focos de infección y evaluar la eficacia de intervenciones masivas.

Como se conoce, la prueba serológica de oro para el diagnóstico de cisticercosis es la detección de anticuerpos IgG mediante el ensayo de western blot conocido como “LLGP-EITB”, que utiliza 7 glicoproteínas afines a lenti lectina que representan a 3 familias proteicas de importancia en el inmunodiagnóstico (familia GP50, familia T24 y familia 8kDa). Aunque esta técnica es altamente sensible y específica para diagnosticar infecciones por cisticercosis, es una prueba compleja, laboriosa y limitada a la disponibilidad de material parasitario para producir los antígenos de

diagnóstico. En este sentido, la producción de antígenos recombinantes y sintéticos homólogos a los antígenos de diagnóstico del EITB ha sido un gran aporte para desarrollar técnicas más accesibles para todos los laboratorios. Sin embargo, no se ha estudiado a profundidad la respuesta simultánea de anticuerpos IgG que producen estos antígenos recombinantes y sintéticos.

Una forma de mejorar el diagnóstico es a través de una mejor interpretación de la presencia de anticuerpos específicos y esto podría ser posible mediante el uso de una técnica que permita cuantificar simultáneamente los anticuerpos IgG frente a antígenos de importancia diagnóstica. Desafortunadamente, el inmunoensayo por excelencia LLGP-EITB no es adecuado para este análisis, debido a que la interpretación de resultados se realiza cualitativamente mediante una inspección visual. Por otro lado, los ensayos clásicos de ELISA indirecto aunque evalúan cuantitativamente la concentración de anticuerpos frente a un determinado antígeno (ensayo uniplex), no son adecuados para estudios de comparación de respuestas en simultáneo, debido a que se tendrían que realizar varios ELISAs uniplex, consumiendo así mayor cantidad de material biológico, reactivos y demandaría mucho tiempo. Por estos motivos, las tecnologías que analizan varios analitos en simultáneo (tecnologías de ensayos multiplex) como los inmunoensayos de microesferas (MBA) son capaces de detectar diferentes reacciones de manera cuantitativa al mismo tiempo y en la misma muestra biológica.

En este sentido, la implementación de un método para la comparación de la presencia simultánea de anticuerpos contra *T solium* representa una herramienta

valiosa para comprender la respuesta de inmune adaptativa humoral porcina contra antígenos recombinantes y sintéticos de importancia diagnóstica durante el progreso de la infección por cisticercosis.

### III. JUSTIFICACIÓN

*T. solium* está presente en casi todos los países del mundo donde se consume carne de cerdo contaminada o donde el control sanitario es precario. La infección ocasionada por el estadio larval de este parásito, llamada cisticercosis, constituye un problema mayor en la salud pública y genera cuantiosas pérdidas económicas debido a la carne de cerdo infectada. El difícil diagnóstico definitivo en entornos endémicos, ha motivado el desarrollo de técnicas basadas en inmunoensayos para para un diagnóstico oportuno, sencillo y accesible.

En este sentido, los clásicos ensayos de inmunodiagnóstico de western blot (LLGP-EITB) y ELISA han sido evaluados también utilizando antígenos recombinantes y péptidos sintéticos de las proteínas LLGP (lentil lectin glycoproteins) utilizadas en el inmunoensayo de referencia para cisticercosis (LLGP-EITB). Esto ha representado un gran avance para eliminar la dependencia del material parasitario para producir antígenos nativos, permitiendo su uso estandarizado en ensayos en cualquier laboratorio. Aunque se ha demostrado la performance individual de estos antígenos recombinantes, algunos estudios han propuesto evaluar el uso combinado de varios de estos antígenos en simultáneo para un mejor diagnóstico de la cisticercosis. El primer paso para crear esta combinación de antígenos de diagnóstico sería conocer la cinética de los niveles de anticuerpos específicos IgG que se generan en simultáneo y en diversos estadios de la enfermedad.

Este trabajo propone el uso de una tecnología múltiple para evaluar la respuesta de los anticuerpos IgG porcinos producida contra cada uno de los antígenos

recombinantes y péptidos sintéticos diagnósticos del EITB-LLGP. En este sentido, los ensayos basados en tecnologías múltiplex que son ampliamente utilizados son los similares a ensayos de citometría de flujo, como el MBA, donde se utiliza microesferas magnéticas identificadas por un código único interno determinado por la intensidad de fluorescencia que emite, lo que brinda la capacidad codificar internamente hasta 100 microesferas diferentes que pueden ser acopladas a diferentes antígenos y así evaluar reacciones individuales en simultáneo. Cada microesfera conjugada a un antígeno desarrollará un ensayo de inmunoadsorción que se asemejará a un ELISA, donde cada antígeno conjugado a la superficie de las microesferas se unirá a los anticuerpos IgG de la muestra de suero y esta unión será detectada por un anticuerpo secundario policlonal conjugado con biotina que a su vez será detectado por las moléculas de estreptavidina marcadas con un fluoróforo (ficoeritrina, conocida por sus siglas en inglés “PE”), el cual permitirá detectar la reacción basada en la intensidad de la fluorescencia detectada por el equipo BioPlex 100 © (Luminex corp), fabricado especialmente para este tipo de inmunoensayos múltiplex.

De esta manera, el diseño y evaluación de este ensayo múltiple basado en microesferas (MBA) permitirá evaluar de manera cuantitativa y en simultáneo la cinética de los niveles de fluorescencia de los anticuerpos IgG durante el curso de la infección por cisticercosis en un panel de suero de nuestra seroteca que pertenecían a un estudio previo (39), donde se determinó que los cerdos infectados a diferentes edades (1,3 y 5 meses) desarrollaban infecciones viables y no-viables en relación a la edad a la cual fueron infectados. Este panel de sueros permitió

evaluar específicamente la cinética de anticuerpos IgG durante el curso de infecciones viables y no-viables. Además, el desarrollo del MBA permitió evaluar simultáneamente la intensidad de fluorescencia emitida en cada reacción de antígeno-anticuerpo en diferentes estadios de la infección desde el establecimiento, viabilidad y muerte del parásito, con la finalidad de identificar patrones en la respuesta inmune adaptativa humoral del hospedero frente a 6 antígenos (recombinantes y sintéticos) de importancia diagnóstica. Asimismo, el MBA podría contribuir en el desarrollo de una potencial herramienta diagnóstica basada en antígenos recombinantes o péptidos sintéticos.

## IV. MARCO TEÓRICO

### A. Cisticercosis

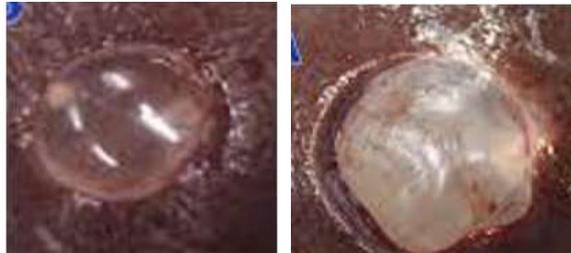
La cisticercosis es una enfermedad tropical desatendida causada por la ingestión de huevos de *Taenia solium*. Se desarrolla típicamente en cerdos debido a la falta de medidas de saneamiento para su crianza, lo que provoca que estos ingieran heces humanas infectadas con huevos microscópicos del parásito y así se infecten con cisticercosis (2, 17). De igual manera, el ser humano puede infectarse con cisticercosis de manera accidental por contaminación oral-fecal. Una presentación crítica de la cisticercosis es la neurocisticercosis (NCC), causada por la infección parasitaria en el sistema nervioso central (SNC); y esta es la principal causa de epilepsia adquirida en el mundo (18).

### B. Biología y ciclo de vida de *Taenia solium*

*Taenia solium* es un parásito cestodo que pertenece a la familia Taeniidae que tiene aproximadamente 3 metros de longitud y se caracteriza por poseer un escólex con 4 ventosas y un róstelo con doble corona de ganchos. Posee un estróbilo con proglótides que contienen la oncosferas infectiva (solo las proglótides grávidas) (19, 20). El estadio larval es denominado cisticerco que es un quiste de forma oval con fluido y un escólex invaginado.

Los estudios anatomopatológicos han permitido caracterizar los estadios del cisticerco desde su ingreso hasta su calcificación, siendo estos: fase vesicular (parásito viable con líquido vesicular transparente), fase coloidal (pared engrosada,

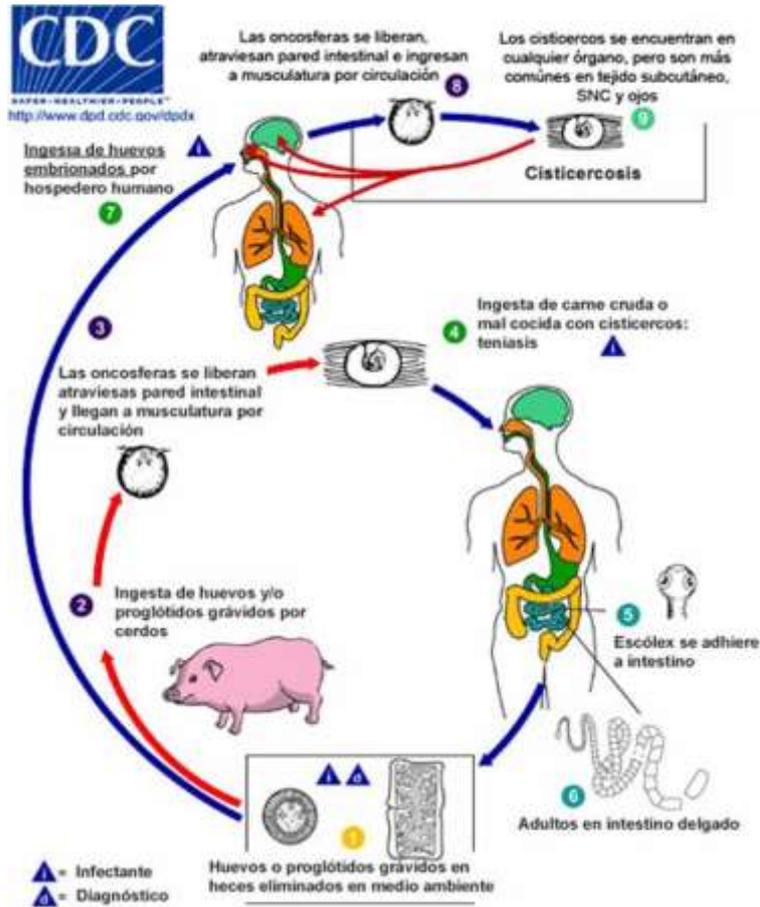
contenido turbio, escólex ligeramente degenerado y tejido circundante con infiltrado inflamatorio), fase granular (parásito no viable) y fase calcificada (el cisticercos se convierte en un nódulo calcificado inerte) (21-23).



**Figura 1.** Quiste de *T solium* en carne de cerdo. A la izquierda se observa un quiste viable y a la derecha un quiste en estado de degeneración o no-viable.

El ciclo de vida de *T solium* incluye la interacción entre el parásito y dos hospederos. El parásito adulto se desarrolla en el intestino delgado del humano, donde se adhiere a la mucosa intestinal a través de su escólex. El hospedero intermediario, es el cerdo, quien se infecta por la ingestión de huevos de *T solium* liberados en las heces de humanos portadores de *Tenia* adulta (24, 25). Si el humano ingiere carne de cerdo infectada mal cocida, los cisticercos viables son activados para el desarrollo del parásito adulto en el intestino, y los proglótides grávidos son liberados en las heces, completando así el ciclo.

El humano también puede ser hospedero intermediario al ingerir alimentos contaminados con huevos *T solium* y puede alojarse en el SNC ocasionando el cuadro clínico de la NCC.



**Figura 2.** Esquema del ciclo de vida de *T solium*

### C. Cisticercosis porcina

Los cisticercos generalmente se localizan en el tejido interfibrilar de músculos esqueléticos, tejido subcutáneo, corazón y lengua del cerdo; y suele ser una infección asintomática. Los nódulos causados por el establecimiento del cisticercos son blandos, indoloros y no inflamados, llegando a desaparecer espontáneamente (8).

## 1. Diagnóstico de la cisticercosis porcina

Aunque el diagnóstico definitivo de la cisticercosis es la demostración histológica del parásito en la necropsia, este no es posible en todos los casos y por ello se utilizan métodos de diagnóstico complementarios.

Diagnóstico inmunológico: Dos herramientas inmunológicas se utilizan principalmente para complementar el diagnóstico (27):

- Para la detección de anticuerpos circulantes, el ensayo de western blot también conocido como inmunoelectrotransferencia blot o por sus siglas “LLGP-EITB” utiliza 7 glicoproteínas purificadas del parásito (proteínas LLGP de las familias GP50, T24/42 y 8kDa) en una membrana de nitrocelulosa que es sometida a un inmunoensayo clásico (28). Esta prueba tiene una sensibilidad del 94-98% y una especificidad del 85-100% para más de un quiste viable (29). Sin embargo, esta prueba depende de un complejo proceso de purificación de proteínas nativas del material parasitario, requiere un alto presupuesto, alto nivel de experticia y es laboriosa.

- Para la detección de antígenos circulantes, se utiliza el ensayo de ELISA tipo sandwich basado en anticuerpos monoclonales. Estos antígenos son biomarcadores para la detección de quistes vivos y es de utilidad para monitorear la eficacia del tratamiento (30, 31). Sin embargo, los niveles de especificidad decaen en cerdos debido a la reacción cruzada de los anticuerpos monoclonales con otras tenias (por ejemplo, con *Taenia hydatigena*) (32).

#### D. Respuesta inmune adaptativa humoral en hospedero

La comprensión del progreso de la infección y la respuesta inmune que genera la cisticercosis porcina permite una mejor comprensión del progreso de la infección en la NCC humana y permite realizar estudios controlados que son éticamente imposibles de realizar en humanos. Asimismo, el estudio de la respuesta inmune adaptativa humoral permite describir eventos importantes del hospedero; como la susceptibilidad a la infección y reinfección, la viabilidad y muerte de los metacestodos en el tejido huésped (13, 20). En este sentido, la respuesta inmune adaptativa humoral ocasionada por helmintos como *T solium* se caracteriza por ser prolongada y crónica, a diferencia de las ocasionadas por virus y bacterias; utilizando vías metabólicas o de control del hospedero para sobrevivir. Por este motivo, la respuesta inmune humoral se evalúa mediante la producción de anticuerpos IgG específicos contra antígenos parasitarios. .

Diversos estudios han demostrado que durante la respuesta inmune adaptativa humoral, la presencia de anticuerpos IgG está influenciada por la etapa del desarrollo del parásito, pudiendo estar asociada a niveles de anticuerpos más altos con la degeneración del quiste o a niveles bajos de anticuerpos que se relacionan más con la viabilidad de los quistes; incluso la presencia de anticuerpos no es necesariamente indicativo de infección (27, 39). Para poder determinar qué anticuerpos IgG específicos reaccionan en estos escenarios, es necesaria la implementación de ensayos que evalúen la respuesta inmune adaptativa humoral de diversos tipos anticuerpos en simultáneo y su adecuada cuantificación para una mejor comprensión de la relación hospedero-parásito. A continuación se describirá

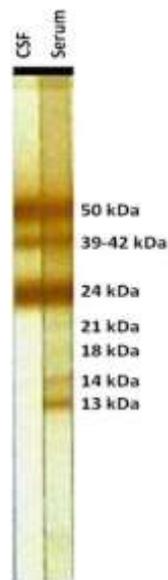
la principal técnica existente para evaluar anticuerpos y se listarán otras herramientas para desarrollar nuevas técnicas de inmunodiagnóstico de anticuerpos.

### 1. Herramientas para evaluar la presencia de anticuerpos IgG

Como se mencionó anteriormente, la evaluación de la respuesta inmune adaptativa se centra en la detección de anticuerpos IgG, debido a la infección crónica que produce la cisticercosis. En este sentido, el ensayo inmunológico preferido para la detección de anticuerpos IgG en la cisticercosis es el western blot que utiliza siete antígenos de quistes larvales purificados en una columna de lectina de lentejas (LLGP-EITB) (28, 40). Aunque el LLGP-EITB es muy confiable debido a sus altos valores de sensibilidad y especificidad, la implementación de este ensayo es costosa y se encuentra limitada a ciertos grupos de investigación (CDC-Cysticercosis working group of Peru) que poseen el antígeno purificado. Además de estar patentado, la purificación de antígenos para este ensayo es un proceso complicado que requiere equipos costosos, experiencia técnica y sobretodo grandes cantidades de material parasitario disponible. Existen también otros inmunoensayos comerciales para medir anticuerpos totales IgG; sin embargo, tienen valores subóptimos de sensibilidad y especificidad (31).

La principal ventaja del LLGP-EITB es su excepcional performance detectando casos de infecciones viables (valores cercanos al 100%) (6) y su capacidad para detectar la presencia de anticuepros IgG en simultáneo frente a las 7 glicoproteínas diagnósticas en una sola muestra. Muchos estudios han caracterizado y clasificado las 7 glicoproteínas diagnósticas en tres familias: GP50, T24 y 8Kda. Además se ha demostrado que la presencia de anticuerpos IgG frente a cada glicoproteína esta

asociada al tipo o estadio de la infección; lográndose identificar patrones marcados de expresión basados en las funciones de cada familia de proteínas diagnósticas (12). Por otro lado, el valor predictivo de esta prueba para determinar infecciones activas por cisticercosis es menor que las pruebas de inmunodiagnóstico para detección de antígeno, debido a que la detección de anticuerpos IgG no necesariamente es indicativo de una infección viable y también puede ser generada por el hospedero luego de una exposición al parásito. Otra limitante de esta técnica es que es de carácter cualitativo ya que solo indica presencia o ausencia de determinados anticuerpos (31).



**Figura 3.** Detección de anticuerpos IgG mediante el ensayo de western blot LLGP-EITB para el diagnóstico de cisticercosis. La presencia de anticuerpos IgG frente a cada glicoproteína diagnóstica está representada mediante una banda correspondiente al peso molecular de cada glicoproteína.

-Antígenos recombinantes y péptidos sintéticos:

Otra herramienta para la detección de anticuerpos es el desarrollo de los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos. Durante muchos años, las glicoproteínas LLGP se han estudiado a detalle, lo que ha permitido clonar los genes y diseñar péptidos sintéticos que representen a las tres familias diagnósticas del inmunoensayo LLGP-EITB. Varias de estas proteínas recombinantes (rGP50 y rT24H) y péptidos sintéticos (sTsRS1, sTs18, sTsRS2 y sTs14) han sido evaluados en ensayos individuales de inmunodiagnóstico, demostrando un desempeño comparable a sus homólogos nativos del LLGP-EITB, y teniendo la ventaja de que son reproducibles y se pueden transferir fácilmente a cualquier laboratorio. A continuación se detalla una breve descripción de las familias diagnósticas del LLGP-EITB y los antígenos recombinantes o péptidos sintéticos homólogos.

La familia GP50 y su forma nativa GP50 del LLGP-EITB, es un glicofosfatidilinositol (GPI) de anclaje a la membrana y su forma recombinante (rGP50) ha sido expresada en un sistema de baculovirus y *E coli*, obteniendo una performance similar (9). En western blot esta proteína recombinante alcanza valores de sensibilidad del 90% y especificidad cercana al 100%. Asimismo, en ELISA indirecto rGP50 obtuvo una sensibilidad de 94% y especificidad de 93% en muestras de suero (41-43). Cabe resaltar que, aunque no ha sido evaluado en su forma recombinante, existen reportes que mencionan que el antígeno nativo GP50 presenta una reacción cruzada con anticuerpos circulantes contra *T hydatigena*, un parásito del cerdo que naturalmente es co-endémico de *T solium* y suele estar presente en cerdos de campo (32, 44, 45).

La familia T24 y sus formas nativas GP39-42 y GP24 del LLGP-EITB, son proteínas transmembrana con 13 residuos de cisteína importantes para el reconocimiento antigénico y pertenecen a la familia de las tetraspaninas. La forma recombinante rT24H perteneciente a la región hidrofílica de la forma nativa, se ha logrado clonar y expresar también en sistemas de baculovirus y *E coli*, obteniendo proteínas recombinantes con performance similar y comparable a la nativa GP24 (46). Ensayos con el antígeno rT24H en el formato de EITB y ELISA, mostraron una sensibilidad del 94 % en casos con dos o más quistes viables y especificidad del 98% (11, 47, 48).

Asimismo, los antígenos LLGP de la familia de 8kDa (GP13, GP14, GP18, GP21) están conformados por proteínas hidrofílicas que carecen de regiones transmembranas y sitios de anclaje; lo que sugiere que son proteínas secretadas extracelularmente. Diversas variantes de esta familia se sintetizaron químicamente y se evaluaron en muestras de suero, obteniendo 4 péptidos con buena performance en ensayos individuales: sTs18, sTs14, sTsRS1 y sTsRS2 (49).

Los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos anteriormente mencionados se han evaluado en inmunoensayos cuantitativos individuales como el uso de tres formatos de QuickELISA para cada uno de los antígenos rGP50, rT24H y el péptido sTs18, los cuales obtuvieron una sensibilidad de 94%, 97% y 89% y especificidad de 96%, 89% y 74%, respectivamente (43). Adicionalmente, en otro ensayo de ELISA indirecto, se determinó que las respuestas individuales de anticuerpos

producidos contra rGP50 y sTs18 se correlacionan cuantitativamente con la infección por quistes viables, siendo la actividad anti-sTs18 la más sensible al estado de infección (41). También se ha realizado un ensayo semi cuantitativo con un sensor fluorescente en un formato de flujo lateral con el antígeno rT24H, obteniendo una sensibilidad del 89% y especificidad del 99% (50, 51)

En cuanto al uso de los antígenos recombinantes en formatos múltiples, se ha realizado un inmunoblot basado en los antígenos recombinantes rGP50, rT24H y el péptido sTsRS1 (48). Donde rT24H obtuvo valores de sensibilidad y especificidad cercanos al 100% para pacientes con más de un quiste viable, y cuando se consideraron los datos de la combinación de los tres antígenos no demostró ser más sensible que cualquier antígeno solo para detectar casos de NCC. Asimismo, un ensayo de impresión multiantigénica (MAPIA) comparó el desempeño de todas las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos (rGP50, rT24H, sTsRS1, sTs18, sTsRS2 y sTs14). Esta prueba obtuvo una sensibilidad del 97% y especificidad del 99%, sin embargo el uso de la combinación de todos los antígenos tampoco mejoró la sensibilidad de la prueba (52). Aunque se conoce que la intensidad de respuesta está relacionada con la carga de infección o estadio de la enfermedad, estos dos inmunoensayos que evaluaron la presencia de anticuerpos en simultáneo tienen la desventaja de solo obtener resultados cualitativos de presencia o ausencia de anticuerpos.

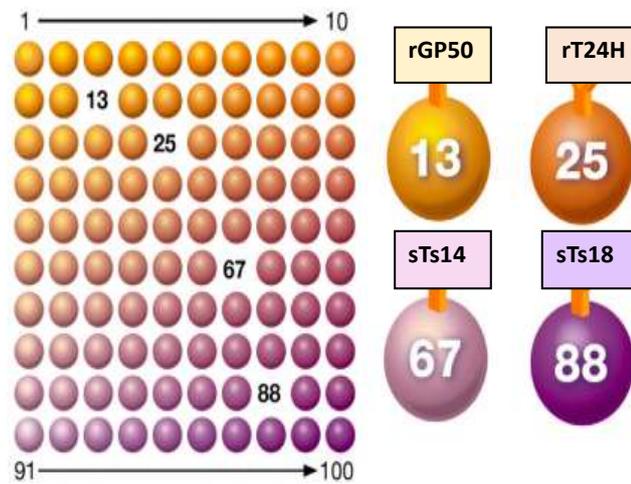
### E. Inmunoensayos multiplex basados en microesferas

El inmunoensayo cuantitativo más común es el ELISA para un solo analito o formato uniplex, el cual ha permitido la cuantificación de proteínas durante décadas mediante la lectura de absorbancia evidenciada en un cambio de coloración por la unión antígeno-anticuerpo. Sin embargo cuando se quieren cuantificar varios analitos, realizar múltiples ELISAs puede ser laborioso, costoso y consume cantidades relativamente grandes de muestras (31, 53).

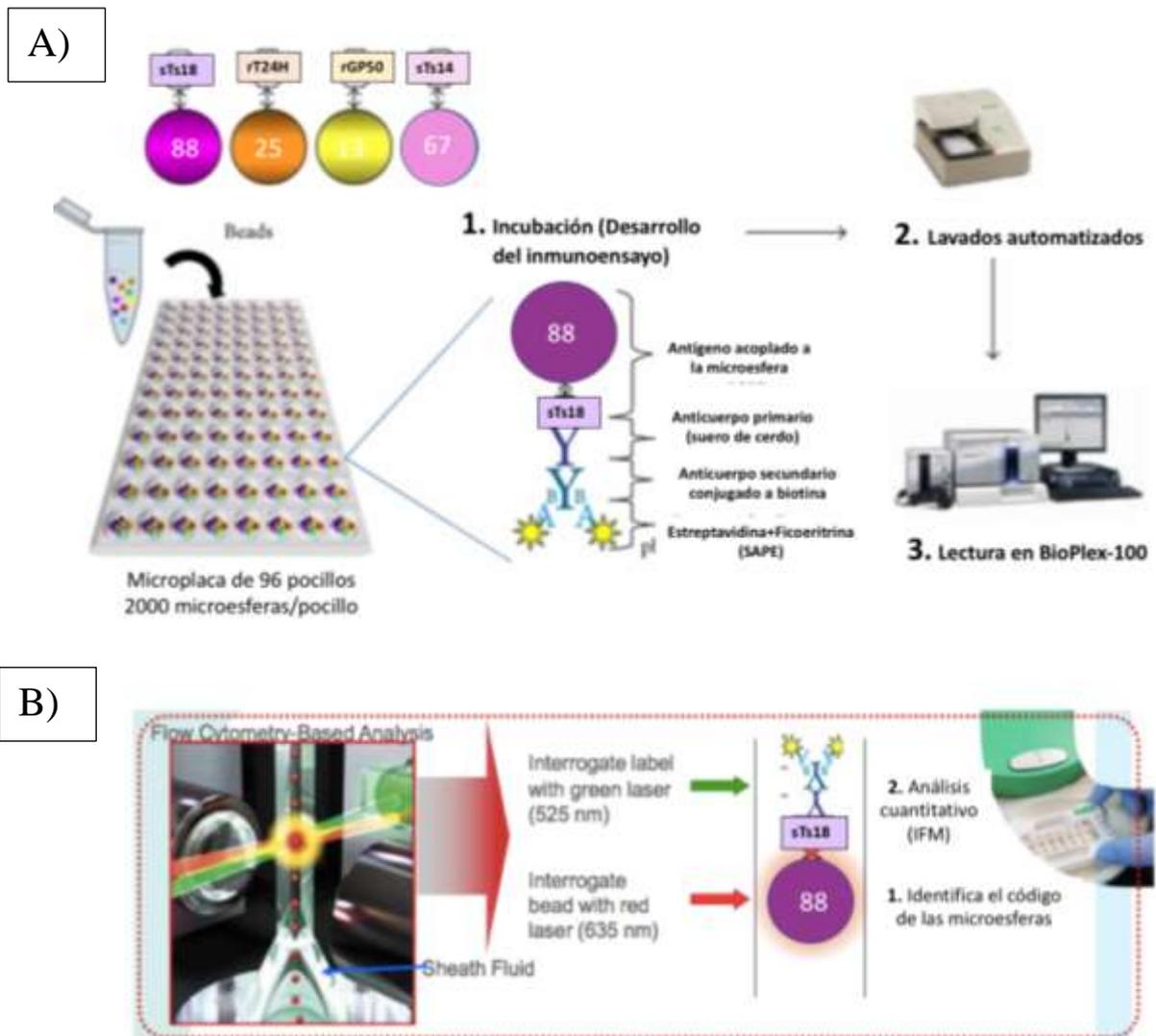
Las pruebas de ELISA de múltiples analitos, o multiplex, ofrecen la posibilidad de obtener información cuantitativa confiable en un análisis simultáneo de varios analitos. Estos ensayos se basan en el uso de microesferas magnéticas, de  $6.4 \mu\text{M}$ , lo que facilita su manipulación para procesos de conjugación de proteínas y desarrollo de reacciones inmunoenzimáticas, proporcionando una superficie de captura para diversos analitos (54). Otra ventaja es que, en lugar de la superficie plana de la placa de plástico del ELISA, las microesferas proporcionan una superficie esférica con mayor capacidad para capturar el analito deseado (55).

Además de poseer un centro superparamagnético, cada microesfera esta revestida por dos marcas de colorantes fluorescentes que pueden ser distinguidas en diferentes espectros de emisión. De esta manera, cada microesfera es identificada mediante un equipo llamado BioPlex-100 (Luminex corp), especial para este tipo de inmunoensayos múltiples, que identifica cada microesfera añadida al ensayo y cuantifica la cantidad de anticuerpo unido a las microesferas mediante la fluorescencia emitida (56). BioPlex-100 permite clasificar hasta 100 microesferas

magnéticas con intensidades de colores fluorescentes diferentes, lo que permite conjugarlas con hasta 100 analitos diferentes y evaluar su reacción en una sola muestra. Asimismo, la facilidad de manipulación ha permitido el desarrollo de diferentes tipos de microesferas magnéticas con grupos químicos especiales para conjugarse a proteínas, receptores, enzimas o ADN, obteniendo una gran versatilidad de ensayos (55, 57, 58).



**Figura 4.** Coloración de microesferas en ensayos múltiples. Las microesferas son coloreadas internamente con dos fluorescentes diferentes (rojo e infrarrojo), diez concentraciones de estos generan 100 distintas reiones o códigos de color de las microesferas. Cada microesfera es conjugada a un analito específico (antígeno) que se utiliza en el ensayo múltiple.



**Figura 5.** Representación esquemática del fundamento de la técnica del inmunoensayo multiplex basado microesferas magnéticas. A) Descripción gráfica del desarrollo del inmunoensayo. B) Proceso de lectura dentro del equipo BioPlex-100.

### 1. Ventajas

Además de tener potencial uso para evaluar diferentes analitos de manera simultánea y cuantitativa, las principales ventajas de este sistema múltiple son la velocidad y el alto rendimiento, dado que cada microesfera sirve como una prueba

individual. De esta manera, se puede realizar y analizar una gran cantidad de ensayos diferentes simultáneamente (59, 60). Adicionalmente, la versatilidad y la precisión porque permite personalizarlo en función del analito de interés y realizar una cuantificación en tiempo real (61).

#### F. El cerdo: hospedero intermediario y modelo animal para el estudio de la NCC

Los modelos animales son ideales para el estudio de enfermedades. En la NCC son útiles para caracterizar los procesos fisiopatológicos durante la implantación del quiste, para identificar biomarcadores específicos, para evaluar el desarrollo de la respuesta inmune y marcadores de la inflamación (62).

Debido a que el cerdo es el huésped intermedio natural de *T. solium*, es ampliamente estudiado para determinar procesos inmunopatológicos relacionados a la NCC. Se han utilizado cerdos naturalmente infectados con cisticercosis para evaluar la eficacia de drogas antihelmínticas caracterizar los procesos patológicos de la enfermedad y evaluar las pruebas de diagnóstico inmunológico (63, 64). Sin embargo, aunque la infección natural es el modelo más cercano a una infección real en humanos; su uso no permite precisar la longevidad del quiste, el grado de degeneración y existe una gran variabilidad en el número de quistes por cerdo.

Por este motivo, nuestro grupo de investigación ha utilizado y estandarizado un método de infección controlada y experimental. Esta infección experimental se realiza por la ruta oral donde con una sola proglotis grávida de *T. solium*, se recrea

una infección por cisticercosis permitiendo explorar la evolución de la enfermedad (24, 62). Cabe resaltar que este es el método de infección utilizado en las muestras evaluadas en esta investigación.

### 1. Inmunidad en el cerdo: Respuesta inmune adaptativa humoral en la infección por cisticercosis

Una de las razones por las que el cerdo se utiliza como modelo animal de muchas enfermedades que afectan a humanos, es su similaridad en la respuesta inmune. La respuesta inmune en cisticercosis brevemente se divide en etapas. Durante la primera etapa se ha identificado que citocinas producidas por linfocitos Th1 son los componentes protectivos contra las oncosferas cuando se establece el cisticerco; luego el parásito empieza a activar mecanismos de evasión por lo que el hospedero porcino empieza a desarrollar una respuesta humoral de varias clases de anticuerpos (2, 24, 65).

En este sentido, es importante mencionar que la respuesta humoral en la cisticercosis es principalmente mediada por la IgG , sugiriendo una infección crónica y pudiendo ser reconocida libremente en el suero de los hospederos infectados. Asimismo, teniendo en cuenta que la cisticercosis es una infección a largo plazo, la respuesta celular proliferativa que ocurre es activada por linfocitos de tipo Th2, lo que se asocia a la sobrevivencia del parásito; sin embargo, el balance Th1/Th2 aún no ha sido descrito completamente (20, 65) .

En este estudio se evaluó la respuesta inmune adaptativa humoral basada en la respuesta de anticuerpos IgG contra antígenos recombinantes y péptidos sintéticos específicos de importancia diagnóstica en muestras de suero de cerdos. Las muestras de suero seleccionadas provienen de una infección experimental controlada por vía oral que permitió el desarrollo de quistes viables y degenerados de acuerdo a la edad en la cual fueron infectados los cerdos (1,3 y 5 meses). De esta manera, se determinaron los niveles de fluorescencia de anticuerpos IgG específicos contra cada antígeno diagnóstico durante el curso de la infección, constituyéndose como una posible herramienta para el estudio de la cinética de anticuerpos en simultáneo y asociarlo a una etapa o un tipo de infección.

## V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El inmunoensayo basado en microesferas (MBA) será una herramienta capaz de detectar cambios en los niveles de fluorescencia emitidos por la respuesta inmune adaptativa humoral de anticuerpos IgG específicos contra cada uno de los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos de *Taenia solium* para describir su cinética durante el curso de la infección de cisticercosis en el modelo animal porcino?

## **VI. OBJETIVOS**

### **A. OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la capacidad de un inmunoensayo múltiple basado en microesferas (MBA) para describir la cinética de anticuerpos IgG específicos contra los antígenos diagnósticos de cisticercosis durante el curso de la infección.

### **B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Optimizar el ensayo basado en microesferas para la detección simultánea de anticuerpos IgG contra cisticercosis en muestras de suero de cerdos.
- Utilizar la técnica del MBA para describir y comparar la respuesta de IgG en simultáneo en los tres grupos de infección: cerdos infectados a 1, 3 y 5 meses de edad.
- Utilizar la técnica del MBA para describir y comparar la respuesta de IgG en simultáneo en cerdos que desarrollaron infección viable y no-viable.
- Evaluar el porcentaje de concordancia y determinar el índice kappa entre el MBA y la técnica de referencia para evaluar anticuerpos en cisticercosis (Western blot, LLGP-EITB).

## VII. METODOLOGIA

### A. Diseño de estudio

El presente estudio fue experimental, retrospectivo y longitudinal. En este estudio se desarrolló un ensayo múltiple basado en microesferas para detectar simultáneamente anticuerpos IgG frente a 2 proteínas recombinantes (rGP50 y rT24H) y 4 péptidos sintéticos (sTsRS1, sTS18, sTSRS2 y sTS14). Para ello, se optimizó el ensayo múltiple mediante la evaluación de diferentes buffers y concentraciones de cada antígeno para ser acoplados a la microesferas, y se evaluó una batería de 162 sueros de cerdos de nuestra seroteca. Estas muestras de suero, que estuvieron almacenadas en ultracongelación (-70°C) correspondían a un estudio previo donde 18 cerdos fueron experimentalmente infectados con cisticercosis (39). El estudio previo reportó que estos cerdos fueron divididos en tres grupos de edades de infección (1, 3 y 5 meses de edad), y a cada uno de ellos se les tomó nueve muestras en el tiempo hasta su necropsia, que fue en el día 90 PI. El ensayo de microesferas evaluó simultáneamente la respuesta inmune adaptativa humoral contra cada antígeno recombinante durante la infección por cisticercosis.

### B. Población y muestras de estudio

Para este estudio se evaluaron un total de 162 muestras de suero de nuestra seroteca, ubicadas en una ultracongeladora en las instalaciones de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (LID-UPCH), donde el laboratorio de Neurocisticercosis monitorea

constantemente la adecuada temperatura de almacenamiento. El estudio al cual pertenecen las muestras desarrolló una infección experimental de cerdos y estaba titulado “Serological responses in porcine cysticercosis” (39), el cual fue realizado en el año 2008 por nuestro grupo de trabajo de cisticercosis (Cysticercosis working group of Peru, CWGP). Cabe resaltar que el director del CWGP brindó acceso a esta seroteca para la realización de este estudio. Brevemente, 18 cerdos fueron infectados experimentalmente con cisticercosis mediante la ingesta oral de un proglótido grávido de *T solium*. Los cerdos fueron divididos en tres grupos de infección equitativos: 6 cerdos infectados a 1 mes de edad, 6 infectados a los 3 meses de edad y 6 cerdos infectados a los 5 meses de edad. Durante los 90 días de seguimiento, se les tomó 9 muestras de sangre en diferentes puntos de tiempo (día 0 o muestra basal antes de la infección, 7, 14, 21, 28, 42, 57, 70 y 90 post infección) a fin de evaluar la respuesta inmunológica ante la infección con cisticercosis. Noventa días luego de la infección, los cerdos fueron sacrificados y se evaluó el resultado de la infección en términos de presencia de anticuerpos.

**Tabla 1.** Esquema de la procedencia de las muestras de suero de cerdo utilizadas en el estudio.

<b>Id cerdo</b>	<b>Método de infección</b>	<b>Edad de infección</b>	<b>Seguimiento</b>
8113	Oral: 1 proglótido	1 mes de edad	0,7,14,21,28,42,57,70 y 90 PI
8114			
8115			
8116			
8117			
8118			
8107		3 meses de edad	
8108			
8109			
8110			
8111			
8112		5 meses de edad	
8101			
8102			
8103			
8104			
8105			
8106			

PI = Post infección

### C. Procedimientos y técnicas

#### 1. Obtención de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos

En los últimos 20 años, el laboratorio de inmunoquímica e inmunoensayos de la División de enfermedades parasitarias del Centro de Prevención y Control de Enfermedades (CDC-Atlanta, GA) ha colaborado cercanamente con nuestro grupo de investigación logrando caracterizar cada una de las proteínas LLGP utilizadas en el EITB para el diagnóstico de la NCC, y sus formas recombinantes.

Para el estudio, el laboratorio de inmunoquímica e inmunoensayos de la División de enfermedades parasitarias del CDC, envió a clonar, expresar y purificar las proteínas recombinantes rGP50 y rT24H en el sistema de expresión de *E.coli* (rT24H) y *baculovirus* (rGP50) con la empresa GenScript, USA. Asimismo, los péptidos sTs18, sTs14, sTsRS1 y sTsRS2 se enviaron a sintetizar químicamente con la misma empresa.

*Validación de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos:* La validación de la funcionalidad de las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos se realizó mediante la técnica de Western Blot donde se mezcló 50 ug/ml de cada proteína con SDS (dodecil sulfato de sodio) (BioRad, USA) al 10% y tracking dye (Azul de bromofenol) (BioRad, USA) a una dilución de 1:50. Esta solución se calentó a 95°C por 15 minutos y luego se agregó glicerol al 6% para obtener un volumen final de 50 ul. Se realizó una electroforesis SDS-PAGE en un gel de acrilamida del 8-25% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 uM (Merck, Alemania) en el equipo TransBlot turbo (BioRad, USA) por 30 minutos. Finalmente, las membranas se bloquearon por 1 hora con PBS Tween 0.3% leche 5% y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para realizar el inmunoensayo, la membrana se descongeló e incubó *overnight* con un pool de suero de cerdos positivos a cisticercosis y pool de suero de cerdos negativos a cisticercosis (con diagnóstico confirmado por necropsia), a una dilución de 1:100 en buffer de bloqueo. Al día siguiente, se realizaron cinco lavados con PBS Tween 0.3%, se adicionó el anticuerpo secundario anti Pig-IgG (Seracare-KPL, USA) diluido 1:6000, y se dejó

incubar 2 horas en agitación. Luego de 3 lavados con PBS Tween 0.3% y 2 lavados con PBS, se agregó la solución reveladora de DAB (3'-3' Diaminobencidina) (BioRad, USA) y 2.5 ul de peróxido de hidrógeno. Luego de 10 minutos de reacción, se observó la presencia de proteínas mediante una coloración marrón en la membrana; lo que determinó la funcionalidad de las proteínas recombinantes.

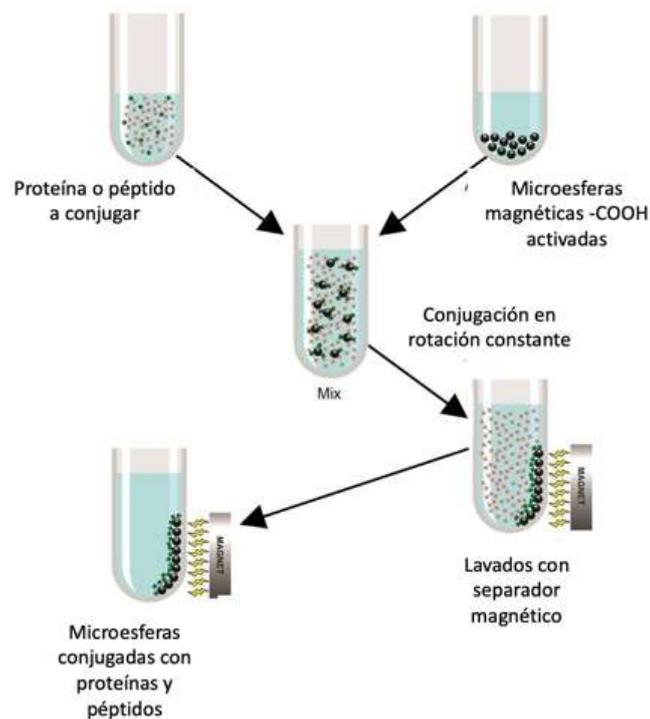
## 2. Optimización del ensayo basado en microesferas (MBA)

Selección de buffer de acoplamiento: El acoplamiento de las microesferas a las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos se realizó de acuerdo a los protocolos sugeridos por el fabricante (MagPlex Microspheres- Luminex Corporation, USA). Las microesferas MagPlex, utilizadas para este ensayo, son micropartículas de poliestireno de 6.4  $\mu\text{M}$  de diámetro incrustadas con material superparamagnético, y con el uso de un separador magnético (imán) se facilita su manipulación en los procesos de conjugación, mejorando así el porcentaje de recuperación en los pasos de lavado. Los grupos carboxilo funcionales en la superficie de las microesferas MagPlex permiten un fácil acoplamiento a un grupo amino, como el de las proteínas. Estas además han sido teñidas con colorantes en conjuntos espectralmente distintos o “regiones”, lo que les permite ser identificadas individualmente por el equipo BioPlex. Estas microesferas con regiones o codificación única proporcionan un sustrato ideal para realizar su multiplexación.

Brevemente, se alicuotó la cantidad deseada de cada microesfera a ser acoplada, siendo 50  $\mu\text{L}$  (~125 000 microesferas) para las evaluaciones de optimización y 1 mL (~2.5 millones de microesferas) para la producción final del lote. Luego se

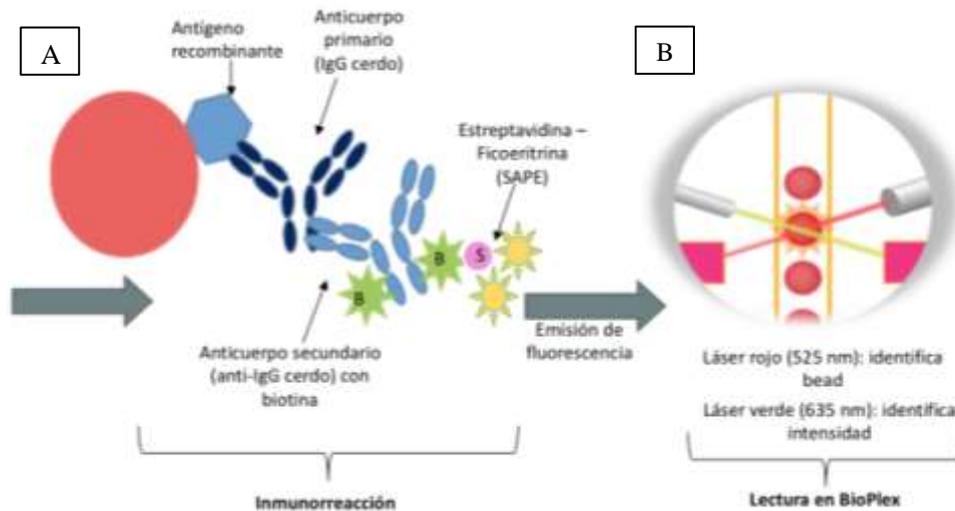
realizaron dos lavados con buffer MES-NaCl Tween 0.05% con la ayuda de un separador magnético o magneto. Cada lavado estuvo compuesto por 30 segundos en vórtex, seguido de 20 segundos en el sonicador y 1 minuto en el magneto, a fin de poder retirar el sobrenadante y colocar 500 ul de buffer de lavado nuevamente. Luego de los lavados, se agregó 20 ul de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo NHS) (Merck, Alemania) para activar las microesferas carboxilo, y se dejó incubar por 30 minutos en oscuridad y movimiento constante. Luego, se realizaron 3 lavados más. Para determinar el mejor buffer de acoplamiento se probaron 3 buffers: PBS pH 7.8, MES pH 5 y Borato pH 8.5. Las microesferas fueron resuspendidas en 100 ul de cada uno de los buffers de acoplamiento (MES, Borato o PBS), y se adicionó una concentración saturante (12.5 ug/ml) de cada antígeno. El acoplamiento se realizó durante al menos 3 horas en oscuridad, movimiento constante y a temperatura ambiente. Finalmente, las microesferas fueron lavadas con PBS-Tween 0.3% y se incubaron con la solución bloqueadora de buffer PBS+1% de albúmina de suero bovino – BSA+ 0.05% de azida de sodio durante 30 minutos con el fin de evitar uniones inespecíficas de proteínas a los grupos carboxilo libres de las microesferas. Las microesferas acopladas fueron resuspendidas en su volumen inicial de acoplamiento en buffer bloqueante con inhibidores de proteasas (fenilmetilsulfonilo, leupeptina y pepstatina) (Merck, Alemania) y se almacenaron en oscuridad y a 4°C. Las condiciones de acoplamiento óptimas se determinaron comparando la relación señal/ruido (S/N) de un pool de sueros de cerdos positivos y negativos (confirmados por necropsia).

Determinación de concentración de proteína o péptido para acoplamiento: Luego de seleccionar el mejor buffer de acoplamiento para cada una de las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, se determinó la concentración óptima para el acoplamiento con tres concentraciones previamente establecidas por el protocolo del laboratorio de inmunquímica del CDC: 22.5 ug/ml, 12.5 ug/ml y 2.5 ug/ml. Para el proceso de conjugación se siguió el protocolo del fabricante Magplex, que ha sido brevemente descrito en la sección anterior. De igual manera que para la evaluación del mejor buffer de conjugación, las tres concentraciones se evaluaron para cada antígeno o péptido y se comparó la relación señal/ruido (S/N) en un pool de sueros de cerdos positivos y negativos.



**Figura 6.** Esquema del procedimiento de conjugación para el acoplamiento de microesferas magnéticas a proteínas recombinantes y péptidos sintéticos.

Evaluación del ensayo basado en microesferas: El desarrollo del MBA se realizó para la detección de anticuerpos IgG específicos contra las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos. El principio del inmunoensayo es que cada antígeno recombinante o péptido, acoplado a una microesfera, se une a su par de anticuerpos IgG específicos y este complejo sea reconocido por un anticuerpo secundario policlonal acoplado a una molécula de biotina (anti Swine-IgG (H+L)). La biotina del anticuerpo secundario se une a la estreptavidina acoplada al fluorocromoficoeritrina (Streptavidin Phicoerythrin-SAPE). Finalmente la fluorescencia generada por la formación del complejo (Ag-Ab primario-Ab secundario) es reconocida en el lector BioPlex 100 (Luminex corporation, USA). Bioplex 100 es un equipo especialmente diseñado para la evaluación de ensayos múltiplex que alinea las microesferas en el sistema fluídico del lector e ingresan a la celda de flujo, donde dos rayos láser las interrogan individualmente para determinar el color de la microesfera (láser rojo 635 nm de “clasificación” o codificación que identifica la región de cada microesfera) y la intensidad de la señal del ensayo o intensidad de fluorescencia de PE (láser verde 532 nm). El análisis de fluorescencia se midió en 100 microesferas por cada región por pocillo, según sugerencia del fabricante (Luminex corporation, USA). Los resultados se registraron en el software del programa incorporado en el equipo BioPlex 100 como intensidad de fluorescencia media (MFI) y de la misma manera fueron analizados.



**Figura 7.** Representación esquemática del fundamento del inmunoensayo de

microesferas. (A) Representación gráfica de la microesfera conjugada al

antígeno/péptido y siendo reconocida por el anticuerpo primario (azul). El

anticuerpo secundario acoplado a biotina reconoce al anticuerpo primario. La biotina del anticuerpo secundario es reconocida por la estreptavidina que esta

unida a la ficoeritrina quien emite la fluorescencia de la reacción. (B)

Representación gráfica de la lectura en el equipo BioPlex 100. Luego de que las microesferas sean alineadas, dos rayos láser inciden en cada microesfera, el laser verde reconoce la región o identidad de cada microesfera y el láser rojo detecta la

fluorescencia de reacción emitida por la ficoeritrina.

Cabe resaltar que el ensayo de MBA se realizó siguiendo un protocolo estandarizado y pre establecido por el laboratorio de Inmunquímica del CDC. Se utilizaron 2000 microesferas acopladas con cada antígeno o péptido por pocillo de la microplaca de ensayo. Los cálculos se realizaron teniendo en cuenta el volumen

final en el pocillo (50 ul) y se utilizó como diluyente la solución bloqueante de PBS Tween 0.3% Leche 5%; la leche añadida al buffer PBS actúa de agente bloqueante para evitar uniones inespecíficas en la superficie de la microesfera y el tween actúa removiendo estas interacciones inespecíficas y débiles. Asimismo, se realizó la dilución del suero porcino a 1:100 en la misma solución. En resumen, a una microplaca de inmunoensayos de color oscuro y fondo plano (Costar black plate, ThermoFisher Scientific, USA) se le adicionó 50 ul de la solución de las microesferas conjugadas con los antígenos a evaluar y 50 ul de la muestra de suero diluida, esto se incubó durante 30 minutos. Luego se realizaron 4 lavados con PBS Tween 0.3% con la ayuda de un lavador automatizado para inmunoensayos acoplado a una placa magnética en la base (Lavador magnético Biotek ELX-T50, Agilent Technologies, USA) utilizando el programa pre determinado “Costar plate magnetic flat bottom”, y se adicionó 50 ul de conjugado policlonal anti swine-IgG (H+L) con biotina (Southern Biotech, USA) a una dilución de 1:200. Luego, se realizaron 4 lavados más , se agregó 50 ul de solución SAPE (Estreptavidina-Ficoeritrina, Southern Biotech, USA) diluida 1:250 y se incubó por otros 30 minutos. Finalmente las microesferas fueron lavadas y resuspendidas en 125 ul de PBS-BSA 1% Azida de sodio 0.05% para la lectura en el equipo BioPlex 100. Todas las muestras se incubaron por duplicado y si existía discordancia entre las mismas (<20%) se repitió en un nuevo ensayo. Los resultados fueron exportados a una tabla de Excel por el software de Luminex Corp, para su posterior análisis.

### 3. Electroinmunotransferencia blot (EITB)

La prueba de referencia para la evaluación de anticuerpos IgG en simultáneo en cisticercosis es el western blot con 7 antígenos afines a la lentil lectina, también conocida como LLGP-EITB. Para cumplir con el cuarto objetivo del estudio, se tomaron los resultados de la base de datos reportada en el artículo de Deckers *et al* (39), donde se reporta la presencia de anticuerpos IgG mediante el número de bandas diagnósticas de glicoproteínas específicas del cisticerco de *T. solium* (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13). Esta evaluación se realizó al momento de la colecta de muestra utilizando la metodología descrita originalmente por Tsang (28).

### 4. Recolección de datos

Toda la información referente al experimento fue ingresada digitalmente a una base de datos en el programa Excel 2020 (Microsoft Office 2020, USA) y fue mantenida bajo estricta confidencialidad por el investigador principal.

#### D. Plan de análisis

A partir de los resultados del ensayo basado en microesferas se determinaron las intensidades de fluorescencia emitidas por los anticuerpos IgG contra cada antígeno recombinante y péptido analizado en cada punto de tiempo evaluado y la respuesta en conjunto de estos anticuerpos durante el curso de la infección en cada grupo de infección y frente al tipo de infección (categorizada en viable y no viable) de cada cerdo, se expresaron en unidades de intensidad de fluorescencia media (IFM). El

promedio de la respuesta de anticuerpos en cada punto de tiempo fue comparada por grupo de estudio y la diferencia entre ellas fue analizada mediante la prueba de t de student. Los niveles de anticuerpos IgG para el ensayo de microesferas y para el EITB fueron expresados mediante valores estadísticos de resumen como: media y desviación estándar o mediana y rango intercuartílico, según su distribución. Además se representaron gráficamente. Aunque la técnica del MBA brinda valores numéricos de IFM y la del ensayo de referencia (LLGP-EITB) es cualitativa, la comparación de la presencia de anticuerpos fue posible mediante el establecimiento de un punto de corte para el MBA, el cual se estableció utilizando el método del punto de cambio, descrito como  $\pm 3$  veces la desviación estándar del promedio del IFM de las muestras negativas (muestras basales). Se evaluó también el porcentaje de concordancia entre las dos pruebas (número de muestras que coinciden en resultado, dividido entre el total de muestras y multiplicado por 100%) y valor de coeficiente Cohen's kappa para analizar la concordancia. Asimismo, la estadística de resumen y gráficos fueron realizados utilizando el software estadístico de STATA V.14 (Stata Corp. College Station, TX, USA) considerando un 5% de significancia para todos los tests..

#### E. Consideraciones éticas

Esta investigación obtuvo la aprobación del Comité de Ética en animales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia UPCH (SIDISI 205765), en el cual se mencionó que las muestras de suero analizadas fueron seleccionadas de un estudio previo aprobado por el comité de ética en animales de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (39).

## VIII. RESULTADOS

### A. Optimización de MBA

La optimización partió de un protocolo pre establecido de CDC y consistió en la evaluación del buffer de acoplamiento y concentración ideal de cada antígeno recombinante y péptido sintético, donde para cada uno se determinaron los valores de fluorescencia (IFM) .

En cuanto al buffer de acoplamiento ideal para cada antígeno o péptido, rGP50 y rT24H obtuvieron valores de fluorescencia mayores a 4000 usando el buffer de acoplamiento MES, mientras que sTs14, sTsRS1 y sTsR2 tuvieron un los mayores valores de fluorescencia con buffer borato. Finalmente, el único péptido que se acopló mejor con buffer PBS fue la sTs18. La concentración ideal de cada antígeno fue determinada de la misma manera ya acoplándose con los buffers determinados en el experimento anterior, donde rGP50 fue la proteína recombinante que obtuvo el mayor valor de fluorescencia, necesitó 12.5 ug/ml de antígeno (IFM: 11067.03) al igual que rT24H (IFM: 3105.17). Los péptidos sintéticos sTs18, sTsRS2 y sTsRS1 conjugados a 22.5 ug/ml de concentración obtuvieron los altos valores de fluorescencia (IFM: 2488.17, IFM: 2172.33 y IFM: 788.67 respectivamente); mientras que sTs14 solo necesitó 2.5 ug/ml de antígeno para acoplarse óptimamente a las microesferas (IFM: 2580.17).

**Tabla 2.** Resumen de condiciones óptimas de buffer de acoplamiento, concentración de antígenos o péptidos y valor de intensidad de fluorescencia media (IFM) obtenido.

<b>Antígeno recombinante/ péptido sintético</b>	<b>Buffer de acoplamiento</b>	<b>Concentración de antígeno</b>	<b>IFM</b>
<b>rGP50</b>	MES	12.5 ug/ml	11067.03
<b>rT24H</b>	MES	12.5 ug/ml	3105.17
<b>sTs14</b>	Borato	2.5 ug/ml	2580.17
<b>sTs18</b>	PBS	22.5 ug/ml	2488.17
<b>sTsRS1</b>	Borato	22.5 ug/ml	788.67
<b>sTsRS2</b>	Borato	22.5 ug/ml	2172.33

B. MBA para cisticercosis porcina: Detección de anticuerpos IgG por grupo de infección

Luego del acoplamiento de los 6 antígenos recombinantes a las condiciones óptimas determinadas en el experimento anterior, se realizó el ensayo de MBA para todas las muestras a evaluar. La distribución de las fluorescencias emitidas por anticuerpos (IFM) contra cada antígeno recombinante y péptido sintético se determinaron por cerdo y durante el curso de la infección (día 0 a día 90 PI).

Debido a que la respuesta humoral porcina en la infección por cisticercosis esta estrechamente relacionada a la naturaleza y número de cisticercos (viables o degenerados), se extrajo la información de las fichas de necropsia de las bases de datos del estudio previo (39). La información de la necropsia fue necesaria para

determinar la carga parasitaria de cada cerdo y obtener información acerca de la viabilidad de la infección al momento de la necropsia (90 PI), lo que a su vez es un factor crucial para entender la respuesta humoral de anticuerpos IgG. Estos datos se encuentran detallados en la sección de anexos.

En general, todos los cerdos presentaron valores de fluorescencia muy bajos (menores a 18) en sus muestras pre infección o muestras basales. El grupo de cerdos que se infectó a un mes de edad presentó mayores valores de fluorescencia para todos los antígenos (variando entre IFM de 1022.08-8415.92), especialmente contra rT24H, sTsRS1 y sTs18, a excepción de los cerdos que no desarrollaron la infección (ID 8117, 8118). Los valores de IFM demostraron que la fluorescencia aumenta gradualmente durante el curso de la infección desde el día 21 PI para rGP50 y día 28 PI para rT24H y los demás péptidos; alcanzando su máximo valor en el día 90 PI, a excepción del cerdo ID 8114, que desarrolló mayor cantidad de quistes degenerados y donde la respuesta contra los antígenos disminuyó notablemente después del día 57 y 70 PI. Aunque no se encontraron quistes en la necropsia, en el cerdo ID 8117 se detectaron señales de fluorescencia bajas 138.91 y 99.56 para el día de la necropsia contra los antígenos rGP50 y rT24H, respectivamente. Estos anticuerpos detectados podrían deberse a la exposición a la infección, sin embargo, no logró establecerse en el animal. Por el contrario, en el cerdo ID 8118 (también negativo en la necropsia) no se detectaron niveles de fluorescencia mayores a 20 (similar a las muestras basales).

El grupo de cerdos que se infectó a los 3 meses de edad también mostró un promedio de niveles de fluorescencia más altos contra el antígeno rT24H (al día 90 PI) y los péptidos sTs14 y sTs18 (al día 67 PI). Por el contrario, los niveles de fluorescencia más bajos se obtuvieron frente a los péptidos sTsRS1 Y sTsRS2. Se observó que, mientras la fluorescencia emitida por anticuerpos contra antígenos recombinantes rGP50 y rT24H aumentaron durante el curso de la infección hasta el día 90 PI; la emitida por anticuerpos contra los péptidos sintéticos mantuvieron su máximo nivel solo hasta el día 67 y 70 PI y luego decrecieron, siendo los anticuerpos contra sTs14 los que presentaron la mayor caída de señal emitida. Asimismo, el cerdo que presentó la fluorescencia más elevada de anticuerpos contra todos los antígenos (especialmente contra rGP50, y un marcado decrecimiento al día 70 PI contra sTs14 y sTs18) fue el cerdo ID 8112, que presentaba 167 quistes viables y 1197 quistes degenerados. Por otro lado, los cerdos con ID 8111 (solo 7 quistes degenerados encontrados en necropsia) y ID 8107 (sin quistes en necropsia) desarrollaron un bajo nivel de fluorescencia de anticuerpos sólo contra rT24H y rGP50.

Finalmente, el grupo de cerdos infectados a los 5 meses de edad fueron los que presentaron menores niveles de fluorescencia contra todos los antígenos, describiendo una tendencia de respuesta inmune adaptativa humoral marcada; donde la respuesta contra rGP50 se eleva durante todo el curso de la infección desde el día 21 PI y alcanzando su máximo valor en el día 90 PI; mientras que la respuesta frente a rT24H y los demás péptidos sintéticos de la familia de 8KDa mostraron un decrecimiento desde el día 42 y 57 PI hasta el día de la necropsia. Asimismo, los cerdos ID 8101 y ID 8105 fueron los que presentaron elevados niveles de

fluorescencia pero también el mayor decrecimiento de la misma frente a los antígenos de la familia de 8kDA, estos cerdos presentaban 2808 y 1724 quistes degenerados, respectivamente.

### C. MBA para cisticercosis porcina: Comparación de la detección de anticuerpos IgG entre grupos de infección

El promedio de la respuesta de cada anticuerpo fue comparada entre los tres grupos de infección en todos los puntos de tiempo. La figura 8 ilustra los valores de IFM emitidos por la detección de anticuerpos IgG frente a cada antígeno en el tiempo, esta es representada en una línea de tendencia correspondiente a cada grupo de infección, asimismo el t test indicó si la diferencia entre IFM de los anticuerpos era significativamente diferente o no entre los tres grupos de infección (los valores de  $p$  por cada intervalo de tiempo se encuentran detallados en la sección de anexos)

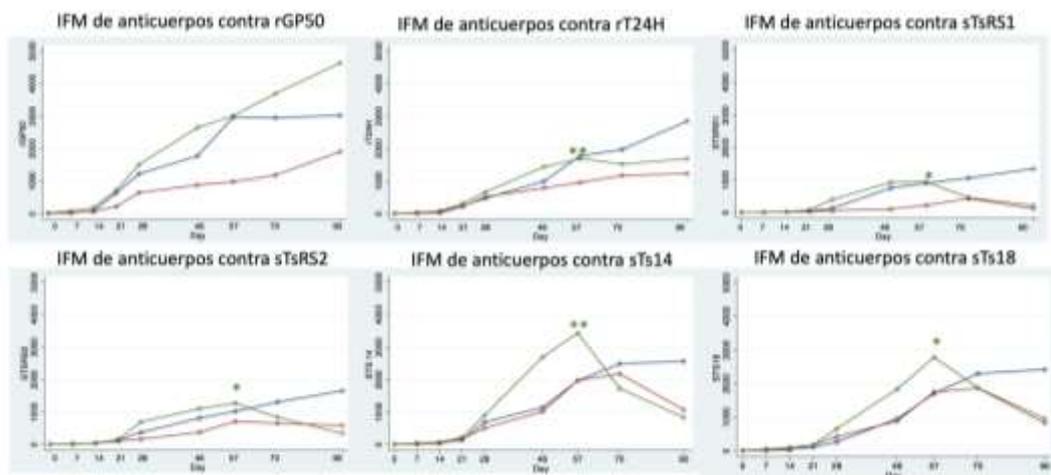
En general, para todos los antígenos se obtuvo mayores valores de IFM más altos en el grupo de cerdos infectados a 1 mes de edad (IFM rGP50: 3020.83, IFM rT24H: 2844.97, IFM sTsRS1: 1348.97, IFM sTsRS2: 1650.97, IFMsTs14: 2561.63 y IFMsTs18: 2416.30) seguido por los grupos de 3 y 5 meses. Se observó también que la concentración de anticuerpos contra el antígeno recombinante rGP50 mantuvo un patrón de respuesta similar en los tres grupos de edades, donde el ratio aumentó desde el día 21 hasta el día 90 PI, excepto en el grupo de cerdos de 1 mes de edad donde la respuesta decreció ligeramente al día 90 PI.

Por otro lado, la fluorescencia emitida por los anticuerpos contra los otros antígenos recombinantes y péptidos apareció alrededor del día 28 PI. Se observó que rT24H aumentó gradualmente hasta el día 90 PI para los grupos de 1 y 3 meses, sin embargo, en el grupo de 5 meses obtuvo su máximo valor (IFM:1690.72) en el día 57 PI y luego decreció ligeramente hasta el día de la necropsia, describiendo una pendiente de -15.55 y siendo la diferencia estadísticamente significativa al compararse con los cerdos infectados a 1 y 3 meses de edad ( $p=0.07$ ).

Asimismo, un patrón similar al de rT24H se observó para los péptidos sTsRS2 y sTs14, donde la concentración de anticuerpos IgG empezó a elevarse cerca al día 28 PI para los tres grupos de infección; pero la respuesta contra sTsRS2 decreció para el grupo de infección de 3 meses, IFM de 3 meses decayó de 711.43 a 650.78 y para el grupo de 5 meses decayó de 1270.05 a 837.80, describiendo una pendiente de -28.47 con una significancia marginal al compararlo con los otros grupos de infección ( $p=0.228$ ), mientras que para el grupo de 1 mes continuó en ascenso hasta el día 90 PI. Para sTs14, en cambio, la respuesta decreció drásticamente a partir del día 57 PI para los grupos de infección de 3 y 5 meses de edad (IFM de 3 meses: de 1974.88 a 1613.12 y IFM de 5 meses: de 3432.05 a 1725.08 ); mostrando la mayor pendiente para el grupo de 5 meses (slope=-119.83) y siendo la diferencia entre grupos estadísticamente significativa ( $p=0.049$ ).

Otro patrón similar se encontró para los niveles de fluorescencia emitidos contra los péptidos sTsRS1 y sTs18, donde para los tres grupos de infección la respuesta apareció un poco después del día 28 PI, aumentó rápidamente y finalmente decreció

para el día de la necropsia. De igual manera, se observó mayor decaimiento de señal en el grupo de infección de 5 meses que describió una pendiente de  $-25.77$  para sTsRS1 y de  $-77.29$  para sTs18; sin embargo, solo la pendiente descrita por sTsRS1 resultó ser marginalmente significativa ( $p=0.1$ ). Otra diferencia importante entre los grupos de infección es que la caída de respuesta frente a estos dos antígenos recombinantes fue similar en los grupos de 1 y 3 meses, que redujo notablemente su ratio en el día 70 PI; mientras que el grupo de 5 meses disminuyó su respuesta antes (desde el día 57 PI).

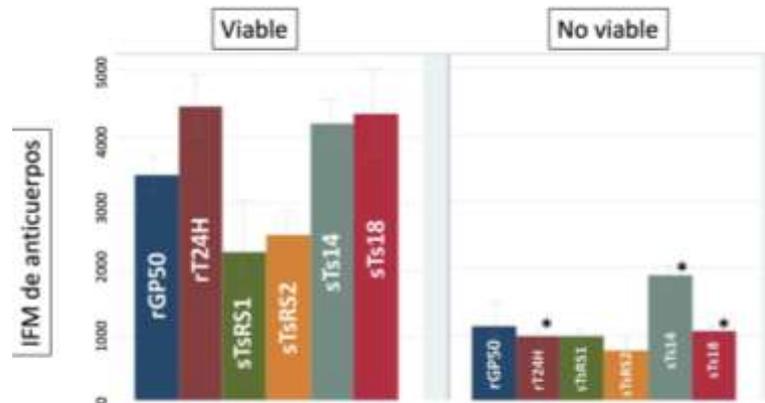


**Figura 8.** Valores de IFM emitidos por la detección de anticuerpos IgG frente a cada antígeno comparando los tres grupos de infección durante el tiempo de seguimiento (0 a 90 PI). La línea azul representa al grupo de cerdos infectados a un mes edad, la línea roja representa el grupo de cerdos infectados a 3 meses de edad y la línea verde representa el grupo de cerdos infectados a 5 meses de edad. El símbolo “\*” indica el punto en el tiempo en el que el la señal de fluorscencia decae y el “\*\*” cuando el valor  $p$  es significativo al comparar las diferencias en la IFM entre grupos de infección.

#### D. MBA para cisticercosis porcina: Detección de anticuerpos según tipo de infección

De acuerdo a la naturaleza de los quistes encontrados en las carcasas de cerdos, se realizó una re clasificación de acuerdo a si presentaban infección viable (9/15), con al menos un quiste viable, o infección no viable (6/15), sólo quistes degenerados. De esta manera, se evaluó la distribución de los valores de fluorescencia contra cada antígeno en presencia de una infección viable y no viable (Figura 9 y 10). De igual manera que anteriormente, el el t test indicó si la diferencia entre IFM de los anticuerpos era significativamente diferente o no entre los cerdos con infección viable y no viable (los valores de  $p$  por cada intervalo de tiempo se encuentran detallados en la sección de anexos).

Se demostró que todas las valores de fluorescencia emitidos por la detección de anticuerpos IgG en cerdos con quistes viables fueron diferentes de los cerdos que superaron la infección y poseían sólo quistes degenerados. En general, los cerdos con infección viable o activa, al momento de la necropsia, poseían los mayores valores de fluorescencia. Como se observa en la figura 9, en cerdos con infección viable la fluorescencia emitida por anticuerpos detectados contra rT24H, sTs18 y sTs14 fueron las más elevadas en comparación con las de los cerdos con infección no viable (IFM de rT24H: 4230.91 versus 1114.01, IFM de sTs18: 4099.56 versus 1080.43 e IFM de sTs14: 4024.31 versus 1840.06), siendo estas diferencias entre el grupo de con infecciones viables y no viables estadísticamente significativas ( $p=0.005$ ,  $0.003$  y  $0.006$ , respectivamente).

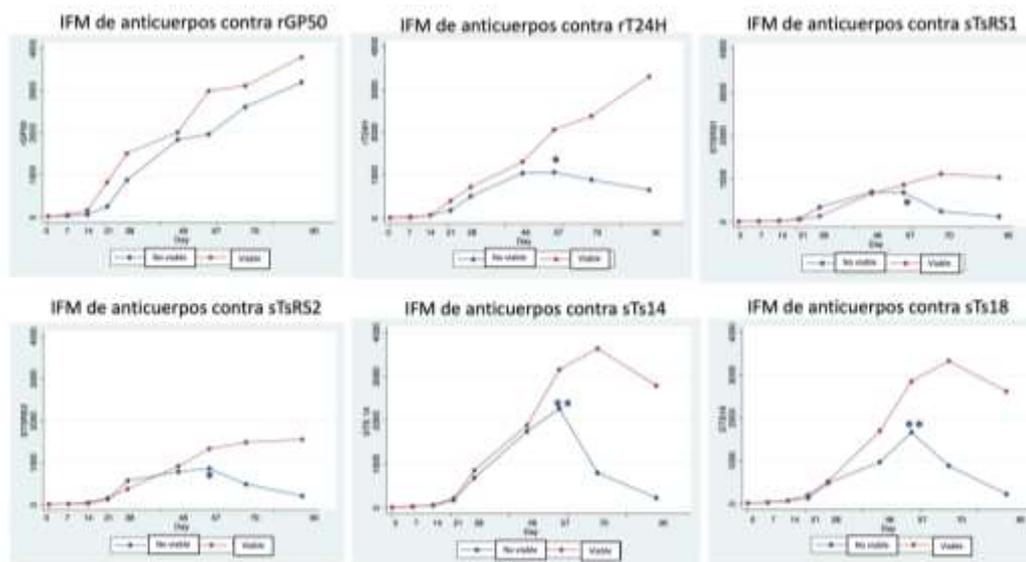


**Figura 9.** Valores de IFM emitida por anticuerpos IgG en respuesta a cada antígeno evaluado en cerdos con infección viable y no-viable. El símbolo “\*” indica valor  $p < 0.01$  determinado por la prueba t de student.

Además, se observó la cinética de los valores de fluorescencia emitida por los anticuerpos durante el tiempo en cerdos con infección viable y no viable. En la figura 10 se observó que en todos los cerdos la señal empieza a elevarse desde día 21 PI para rGP50 y rT24H. Por el contrario, para los demás antígenos de 8kDa (sTsRS1, sTsRS2, sTs14 y sTs18) la señal empieza tardíamente en el día 28 PI. A excepción de rGP50 donde la señal se mantiene en ascenso hasta el día 90 PI, los cerdos con infecciones no-viables solo mantienen la señal hasta el día 57 PI, donde empieza a decaer, mientras que en cerdos con infecciones viables se mantiene en ascenso hasta el día 70 PI o 90 PI.

Las tendencias descritas por la señal de fluorescencia de los cerdos que presentaban infecciones no viables tienen un marcado decrecimiento en la señal de anticuerpos

IgG desde el día 57 PI para los antígenos de la familia de 8kDa evaluados, describiendo pendientes marcadas para sTs14 (slope=-79.97) y sTs18 (slope=-51.75), y siendo la diferencia entre la señal en cerdos con infección viable y no viable al día 57 PI marginal o estadísticamente significativa ( $p=0.09$  y  $0.16$  para sTs14 y sTs18). Por el contrario, los niveles de fluorescencia de anticuerpos IgG contra rGP50 en cerdos con infección no viable, nunca decreció y para los demás antígenos se identificaron pendientes menos pronunciadas (slope rT24H=-13.51, slope sTSRS1=-18.01 y slope sTSRS2=-18.96) y no detectándose diferencias significativas entre los cerdos del grupo de infecciones viables y no viables ( $p>0.2$ ).



**Figura 10.** Valores de IFM de anticuerpos en cerdos con infección viable (en color rojo) y no-viable (en color azul) durante el tiempo de seguimiento (0-90 días PI). El símbolo “\*” indica el punto en el tiempo en el que el la señal de fluorscencia decae y el “\*\*” cuando el valor  $p$  es significativo ( $p<0.01$ ) al comparar las diferencias en la IFM entre cerdos con infección viable y no viable en el día 57 PI.

#### E. Detección anticuerpos por LLGP-EITB

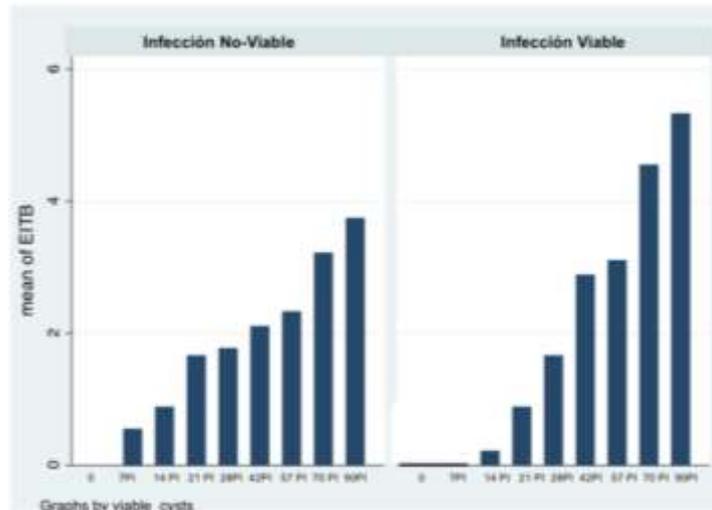
Debido a que el LLGP-EITB es el ensayo de referencia para detectar la presencia de anticuerpos frente a las glicoproteínas diagnósticas de cisticercosis y a que se utilizó para comparar lo obtenido en el MBA, se reporta los resultados obtenidos. Todos los cerdos fueron EITB-negativos antes de la infección (muestra basal o día 0) hasta el día 21 PI. El número bandas (presencia de anticuerpos IgG) aumentó pogramáticamente hasta el día de la necropsia. Al igual que en el MBA, a pesar que los cerdos ID 8117 e ID 8107 no desarrollaron la infección (sin quistes en la necropsia), igual detectaron presencia de anticuerpos para las glicoproteínas de las familias GP50 y T24 (banda 1, 2 y 3 del EITB).

De acuerdo a la presencia de anticuerpos por grupos de infección, la tabla 3 muestra la presencia de anticuerpos, expresada en número de bandas promedio en el EITB, durante el curso de la infección para los tres grupos de cerdos. Los cerdos infectados a 1 mes de edad obtuvieron menor presencia de anticuerpos que los grupos de 3 y 5 meses, (3-4 bandas frente a 5-6 bandas) para el día de la necropsia.

**Tabla 3.** Número de bandas de anticuerpos detectados por EITB durante el curso de la infección y por grupo de infección.

<b>Día PI</b>	<b>Número de bandas promedio</b>		
	<b>1 MES</b>	<b>3 MESES</b>	<b>5 MESES</b>
0	0	0	0
7	0	0	0
14	0.5	0	1
21	1	1	2
28	2	1	2.5
46	3	2	3.5
57	3	3	4
70	3	3.5	5.5
90	3	4	6

Al analizar la presencia de anticuerpos mediante el LLGP-EITB según el tipo de infección (viable o no viable), se observó que los cerdos que desarrollaron infecciones viables presentaron anticuerpos IgG detectables contra la GP50 desde día 21 PI, y los anticuerpos contra los demás antígenos se detectaron desde el día 28 PI contra la T24 y luego contra los antígenos nativos de la familia de 8Kda (de 4 a 6 bandas hasta el día de la necropsia). Por el contrario, para los cerdos que resolvieron infección, resultando en quistes degenerados o infecciones no viables, se empezaron a detectar anticuerpos contra GP50 más tempranamente desde el día 14 PI. Sin embargo, al día 90 PI solo llegan a detectar anticuerpos IgG contra las 3 primeras bandas diagnósticas (respuestas de anticuerpos contra GP50 y T24), sin llegar a desarrollar respuesta frente a los antígenos de la familia de 8kDa en todos los cerdos.



**Figura 11.** Número de bandas detectadas en EITB durante el curso de la infección (día 0 a 90 PI) y en cerdos con infección viable y no-viable.

F. Comparación de la presencia de anticuerpos de familias diagnósticas (GP50, T24 y 8kDa) medida por MBA y EITB

Finalmente, se comparó la detección de anticuerpos contra las proteínas recombinantes y péptidos sintéticos del MBA y contra los antígenos nativos del LLGP-EITB. Para ello se estableció un punto de corte de la prueba de MBA (promedio de IFM de muestras basales + 3SD) y se categorizaron los resultados en función a la presencia o ausencia de anticuerpos.

Ambos ensayos detectaron la presencia de anticuerpos contra antígenos de la familia GP50 (GP50 y rGP50) desde etapas tempranas de la infección. Aunque, el EITB detectó la respuesta contra GP50 desde el día 7 y 14 PI; y el MBA desde el día 14 o 21 PI; y ambos ensayos detectaron su presencia hasta el día de necropsia. De igual manera para la familia diagnóstica T24, se detectó presencia de

anticuerpos IgG en el EITB contra GP39-42 y GP24 desde el día 14 y 21 PI, mientras que para la forma recombinante rT24H del MBA desde el día 28 PI. La presencia de anticuerpos contra la familia T24 también se mantuvo hasta el día de la necropsia para ambos ensayos. Con respecto a la presencia de anticuerpos contra la familia diagnóstica de 8kDa, las formas nativas GP21, GP18, GP14 y GP13 (bandas diagnósticas 4, 5 6 y 7 del EITB) detectaron presencia de anticuerpos IgG tardamente en el día 70 o 90 PI; mientras que el MBA detectó presencia de anticuerpos contra péptidos sintéticos sTsRS1, sTsRS2, sTs14 y sTs18 (familia de 8kDa) desde el día 28 PI para todos los grupos. Asimismo, todas las respuestas de anticuerpos se mantuvieron hasta el día de la necropsia.

El porcentaje de concordancia y el índice kappa entre estas dos pruebas también fue evaluado y se obtuvo una concordancia global de ~96% (kappa = 0.75). Para evaluar la presencia de anticuerpos durante el curso de la infección en los cerdos infectados a un mes de edad la concordancia entre la EITB y MBA fue de 98.89%, 100% y 91.93% para las familias GP50, T24 y 8kDa, respectivamente (kappa = 0.8, 1 y 0.25). Para los cerdos infectados a los 3 meses de edad la concordancia fue de 98.76%, 96.89% y 94.41% para las familias GP50, T24 y 8kDa, respectivamente (kappa = 0.91, 0.81 y 0.53); y para los cerdos de 5 meses de edad fue de 97.52% para familia GP50 y T24 y 95.03% para la familia de 8kDa (kappa = 0.82, 0.81 y 0.68) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Porcentajes de concordancia e índice kappa en la detección de anticuerpos en los tres grupos de infección medidas por el EITB y el MBA.

<b>Concordancia entre las dos pruebas / Índice kappa</b>	<b>Familia GP50</b>	<b>Familia T24</b>	<b>Familia 8kDa</b>	<b>Concordancia global</b>
<b>Cerdos infectados a 1 mes de edad</b>	96.89%	100.00%	91.93%	<b>96.27%</b>
<b>Índice kappa</b>	0.81	1.0	0.25	<b>0.69</b>
<b>Cerdos infectados a los 3 meses de edad</b>	98.76%	96.89%	94.41%	<b>96.69%</b>
<b>Índice kappa</b>	0.91	0.81	0.52	<b>0.75</b>
<b>Cerdos infectados a los 5 meses de edad</b>	97.52%	97.52%	95.03%	<b>96.69%</b>
<b>Índice kappa</b>	0.82	0.81	0.68	<b>0.77</b>

Además, se evaluó la concordancia de la detección de anticuerpos IgG medida por el EITB y el MBA luego de re clasificar a los cerdos según el tipo de infección al día de la necropsia. Los cerdos con infección viable obtuvieron una concordancia global de 96.3% (kappa = 0.91), siendo de 100% (kappa = 1.0) al detectar anticuerpos IgG contra las familias diagnósticas GP50 y T24 y de 88.89% (kappa = 0.73) contra la familia de 8kDa. Similarmente, los cerdos con infección no-viable obtuvieron 95.24% (kappa = 0.89) de concordancia global entre las dos pruebas, siendo 100% (kappa = 1.0) concordantes para detectar anticuerpos IgG contra GP50 y T24 y 85.71% (kappa = 0.67) contra la familia de 8kDa.

**Tabla 5.** Porcentajes de concordancia e índice kappa en la detección de anticuerpos en cerdos con infecciones viables y no-viables medidas por el EITB y el MBA.

<b>Concordancia entre las dos pruebas / Índice kappa</b>	<b>Familia GP50</b>	<b>Familia T24</b>	<b>Familia 8kDa</b>	<b>Concordancia global</b>
<b>Cerdos con infección viable</b>	100.00%	100.00%	88.89%	<b>96.30%</b>
<b>Índice kappa</b>	1.00	1.00	0.73	<b>0.91</b>
<b>Cerdos con infección no-viable</b>	100.00%	100.00%	85.71%	<b>95.24%</b>
<b>Índice kappa</b>	1.00	1.00	0.67	<b>0.89</b>

## **IX. DISCUSIÓN**

Este estudio se enfocó en el uso de un inmunoensayo basado en microesferas (MBA) para evaluar cuantitativa y simultáneamente la cinética de anticuerpos IgG producidos contra antígenos recombinantes de *T solium*, utilizando un panel de sueros de cerdos infectados con cisticercosis a diferentes edades: 1, 3 y 5 meses, y a los cuales se les realizó seguimiento por 90 días luego de la infección. El motivo por el cual se seleccionó esta batería de sueros, fue para evaluar la capacidad del MBA para medir la respuesta inmune adaptativa humoral frente a un set de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos de importancia diagnóstica para cisticercosis durante el curso de la infección e identificar tendencias en la respuesta inmune adaptativa humoral desde el establecimiento del quiste hasta su degeneración.

El MBA permitió evaluar cuantitativamente los niveles de fluorescencia emitidos por anticuerpos IgG, este inmunoensayo múltiple está basado en microesferas magnéticas que se pueden clasificar en regiones únicas debido a que están teñidas con distintas proporciones de dos fluorocromos. La clasificación en regiones únicas permite asignar un código a cada microesfera obteniendo como resultado la detección simultánea de diferentes microesferas diferentes en una sola muestra (66, 67). Si bien este formato MBA para detectar cuantitativamente anticuerpos séricos contra antígenos puede ser útil para determinar la prevalencia de cisticercosis porcina y de otras enfermedades en simultáneo (68), en este estudio se utilizó para caracterizar el progreso de los niveles de fluorescencia de anticuerpos IgG

producidos durante la infección en tres grupos de cerdos experimentalmente infectados.

Los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos de *T solium* que se conjugaron a las microesferas y fueron utilizados en este estudio, son representantes de las tres familias diagnósticas utilizadas en la prueba de LLGP-EITB (GP50, T24 y 8 kDa). Todas las proteínas recombinantes (rGP50 y rT24H) y péptidos sintéticos (sTsRS1, sTs18, sTsRS2 y sTs14) han sido previamente evaluados en ensayos de inmunodiagnóstico, obteniendo adecuados valores de sensibilidad y especificidad (10, 41, 43, 52, 68, 69). En este estudio, el ensayo múltiple permitió no solo detectar la presencia de anticuerpos IgG frente a estos antígenos en simultáneo, sino además realizarlo de manera cuantitativa basándose en la intensidad de fluorescencia emitida por la reacción antígeno-anticuerpo.

Los resultados de la estandarización del MBA indicaron diferentes valores de IFM para cada uno de los seis antígenos recombinantes evaluados, donde los péptidos sintéticos (sTsRS2 y sTsRS1) presentaron las señales más bajas; incluso teniendo concentraciones de antígeno saturantes (22.5 ug/ul). En contraste, los antígenos recombinantes rGP50 y rT24H obtuvieron los valores de IFM más altos. Sin embargo, el principal objetivo de esta investigación no fue evaluar la performance de cada antígeno evaluado, sino entender el comportamiento de cada anticuerpo producido contra estos antígenos y cómo interaccionan entre ellos en diferentes estadios de la infección por cisticercosis.

En general, el MBA permitió observar un aumento progresivo de la señal de fluorescencia de anticuerpos IgG desde el día 21PI para el antígeno rGP50 y desde el día 28 PI para rT24H hasta el día de la necropsia. Asimismo, las respuestas frente a los péptidos sintéticos de la familia de 8kDa empezaron cerca al día 28 PI y aumentó progresivamente para el grupo de cerdos más jóvenes (infectados a 1 mes de edad), que en su mayoría presentaban quistes viables. Sin embargo, para el grupo de cerdos infectados a los 3 y 5 meses de edad se observó decrecimiento de la señal en las últimas semanas antes de la necropsia, esto debido a la degeneración de los quistes que se presentó en este grupo de cerdos.

La detección de anticuerpos IgG de acuerdo al grupo de infección experimental también mostró que los cerdos infectados a un mes de edad desarrollaron niveles de fluorescencia más altos para todos los antígenos evaluados, esto podría ser debido a que las infecciones viables exponen al hospedero a una mayor cantidad de antígenos por lo que su sistema inmune se encuentra en constante producción de defensas (70). Asimismo, en los grupos de cerdos infectados a los 3 y 5 meses de edad se observó una mayor señal frente a los antígenos rGP50 y rT24H durante todo el tiempo de seguimiento, mientras que para los demás antígenos la señal decreció luego del día 57 PI. El antígeno sTs14 fue el que decreció en mayor proporción con la degeneración de quistes de los cerdos infectados a los 5 meses de edad describiendo una pendiente marcada de -119.83 al día 70 PI y estableciendo una diferencia significativa en ese punto de tiempo frente a los otros grupos de infección ( $p=0.005$ ); esto podría sugerir una alta asociación entre la respuesta de anticuerpos que induce este antígeno y la viabilidad de la infección.

Una de las tendencias observadas en la señal emitida por anticuerpos IgG son las tendencias descritas por los antígenos rGP50 y rT24H, donde a pesar de ser evaluados por grupo de infección, las señales se mantienen en aumento. Estas dos proteínas se han asociado a fuertemente a establecimiento del parásito (12).

Por otro lado, reportes previos (12) han mencionado que fracciones del antígeno nativo T24 co-precipita con algunas fracciones antigénicas de los antígenos de la familia de 8kDa. En el caso del antígeno recombinante rT24H, a pesar de que solo se clonó la región hidrofóbica del antígeno nativo T24, se observó un patrón similar en la señal emitida por anticuerpos IgG que inducen este antígeno y algunos péptidos de la familia de 8kDa. La cinética de anticuerpos descrita durante el curso de la infección parecían ser similares entre los antígenos rT24H y los antígenos de 8kDa, ya que iniciaron en el día 28PI y en cerdos con infecciones no viables la señal descendió desde el día 57 PI; lo que podría indicar un grado de asociación debido a probables epítomos compartidos. Un análisis más profundo de la estructura primaria y modelamiento tridimensional de estas proteínas, así como un análisis comparando los epítomos lineales y conformacionales, determinarían si existe una similitud a nivel estructural entre los epítomos de estos antígenos recombinantes.

De acuerdo con la detección de anticuerpos IgG según el tipo de infección, se determinó que en presencia de quistes viables rT24H, sTs18 y sTs14 fueron los antígenos que inducían una mayor señal de respuesta de anticuerpos con diferencias estadísticamente significativas frente a al grupo de cerdos con infecciones no

viables ( $p < 0.05$ ), sugiriendo una alta asociación entre la presencia de anticuerpos contra esos antígenos y el establecimiento de una infección activa. Por otro lado, anticuerpos contra el antígeno rGP50 mantuvieron su señal independientemente del grupo de infección o de la viabilidad del quiste. Una explicación para esto podría ser que la familia GP50 está relacionada con el anclaje a la membrana, función para la cual no es necesaria la presencia de un quiste vivo.

La presencia de anticuerpos de cerdos fue evaluada también por el ensayo western blot LLGP-EITB, este ensayo está basado en el uso de siete glicoproteínas del parásito purificadas en una columna de lectina de lentejas. En el western blot o LLGP-EITB en los cerdos más jóvenes se detectó presencia de anticuerpos solo contra 3 glicoproteínas de la familia GP50 y T24, a pesar que tenían un alto número de quistes viables y que en el ensayo de microesferas mostraron señales altas contra los antígenos recombinantes de la familia de 8kDa. Esto podría deberse a la naturaleza recombinante de los antígenos el MBA, los que podrían estar compartiendo epítomos con los de la familia T24. Por otro lado, para los animales mayores (infectados a los 3 y 5 meses de edad) se detectó presencia de anticuerpos frente a todos los antígenos, tanto en el EITB como en el ensayo en microesferas; sin embargo, en el MBA se observa que decaen desde el día 57 PI hasta el día de la necropsia; patrón que no se puede observar en el EITB debido a su naturaleza cualitativa.

Respecto a la evaluación de la presencia de anticuerpos dependiendo del tipo de infección medida por el EITB, se observó que en los cerdos con infección viable se

detectó presencia de anticuerpos desde el día 14 PI y fue aumentando gradualmente hasta detectarse anticuerpos frente a las tres familias diagnósticas. Por el contrario, en los cerdos que presentaban solo quistes degenerados solo se detectó presencia de anticuerpos frente a las familias GP50 y T24 desde el día 7 PI. Estos resultados podrían indicar que en una infección viable el parásito expone al hospedero a todos los antígenos evaluados, activando así el sistema inmunológico del cerdo para generar anticuerpos específicos que combatan la infección; y la infección suele prosperar por la respuesta tardía de anticuerpos al día 14 PI. Por otro lado, en los cerdos que presentaron quistes degenerados se detectó la presencia de anticuerpos más tempranamente desde el día 7 PI, por lo que la infección fue superada y solo se producen ciertos antígenos relacionados a anclaje y estructura (como GP50).

Cuando se comparó la presencia de anticuerpos medidas por el MBA y western blot EITB se demostró que los antígenos nativos del EITB generan una respuesta más temprana de anticuerpos para los antígenos de la familia GP50 y T24; sin embargo, para los de 8kDa los anticuerpos detectados más tempranamente fueron contra los péptidos sintéticos del MBA. Esto se podría explicar por la naturaleza nativa o recombinante de cada antígeno evaluado en cada ensayo; es posible que las formas recombinantes no posean la misma antigenicidad que la forma nativa por modificaciones postraduccionales u otras conformaciones.

En general, los resultados de la presencia de anticuerpos medida por el ensayo de microesferas y el western blot EITB, determinaron que la cinética está fuertemente relacionada con la viabilidad del quiste, lo que a su vez está determinado por la

edad de infección de los cerdos. Se ha determinado que el sistema inmunitario de los cerdos más jóvenes aún no está completamente desarrollado, facilitando así el establecimiento y permanencia del parásito viable por mayor tiempo; lo que se traduce en señales altas de detección de anticuerpos para antígenos relacionados a quistes vivos como los de excreción/secreción de la familia de 8kDa del MBA y mayor presencia de bandas que detectan anticuerpos en el EITB. Por el contrario, los cerdos infectados a mayor edad afrontaron exitosamente la infección, logrando degenerar los quistes que se establecieron en el tejido; lo cual se vió reflejado en el niveles altos de concentración de anticuerpos al inicio de la infección con un rápido decrecimiento conforme avanzaba la infección.

Si bien ambas pruebas no se pueden reportar de la misma manera debido a la naturaleza cuantitativa (MBA) o cualitativa (EITB); el análisis de concordancia fue global de ~96%, ( $\kappa = 0.93$ ) siendo mayor para la familia proteica GP50 y T24. Esto debido a que con la familia de 8kDa, el MBA detecta la caída de la concentración de anticuerpos IgG hasta hacerse indetectable, las formas nativas de la familia de 8kDa se continúan detectando hasta el final del seguimiento.

Al comparar ambas técnicas para evaluar respuesta específica de anticuerpos en simultáneo, el EITB demostró ser más sensible en confirmar la presencia de anticuerpos (cualitativamente) cuando se establece el quiste; por otro lado el MBA fue capaz de cuantificar la respuesta de todos los anticuerpos en simultáneo presentando varias ventajas. Primero, proporcionó resultados cuantitativos para cada proteína evaluada, lo que permite ver tendencias en el tiempo durante el curso

de la infección. Además, es un formato eficiente y de alto rendimiento que evalúa anticuerpos en simultáneo y está basado en antígenos recombinantes o sintéticos que están disponibles en cualquier part del mundo.

Este estudio también presentó algunas limitaciones por el tipo de muestra y por la naturaleza del inmunoensayo. Respecto al panel de sueros utilizados, aunque permitió evaluar la respuesta inmune adaptativa humoral del hospedero durante el curso de la infección y en presencia de quistes viables y degenerados; existió una gran variabilidad en el número de quistes viables y degenerados encontrados por cerdo. Esta variable conocida como “carga parasitaria” puede ser un factor importante que afecte la cuantificación de la presencia de anticuerpos sobreestimando sus valores contra determinados antígenos. Asimismo, en el estudio previo de donde se obtuvieron los sueros, no se reportó el número de quistes musculares y el número de quistes cerebrales por separado. Tener esta información con respecto a la localización del quiste, es crucial para entender la respuesta inmune adaptativa circulantes en suero. El cerebro al ser una zona privilegiada inmunológicamente, suele desarrollar una baja detección de anticuerpos, a diferencia de cuando los quistes se alojan en tejido muscular.

Una de las limitaciones de este estudio atribuible a la naturaleza del inmunoensayo es el uso de proteínas recombinantes. Es conocido que muchas veces las proteínas recombinantes al momento de la expresión pierden algunas modificaciones postraduccionales que influyen en su funcionalidad y antigenicidad. Una de las modificaciones postraduccionales más comunes es la glicosilación, donde se

adicionan hidratos de carbono a la estructura proteica. En este sentido, se sabe que las proteínas nativas purificadas y utilizadas en el ensayo de EITB son glicoproteínas del quiste; por lo cual la glicosilación de las mismas podría tener un rol mayor en su antigenicidad. Sin embargo, las regiones de mayor antigenicidad de las proteínas nativas fueron clonadas o sintetizadas químicamente en las versiones recombinantes; además, por muchos años se han estudiado y utilizado estos recombinantes en diversas técnicas inmunológicas, demostrando un buen rendimiento. Por último, en este ensayo no se pudo determinar precisamente los puntos de corte de la prueba o límites de detección, por lo que se utilizaron las muestras basales de cada cerdo (antes de la infección) como puntos de referencia de negativos. Si bien el objetivo de este estudio no fue evaluar la performance de la técnica de MBA, el evaluar una batería de muestras negativas y determinar la especificidad del ensayo hubiera permitido realizar un análisis de concordancia más profundo entre el EITB y el MBA. Futuros ensayos con series de muestras definidas serán realizados para determinar el verdadero punto de corte de este inmunoensayo.

Finalmente cabe resaltar que la utilidad potencial más evidente de esta técnica diagnóstica multiplex MBA no es el pronto diagnóstico de los casos de cisticercosis, sino evaluar el comportamiento y tendencias de la detección de anticuerpos en diferentes estadios de la infección y frente a cada antígeno. Pese a las limitaciones presentadas, este estudio fue crucial para tener una aproximación cuantitativa de la cinética de la respuesta inmune adaptativa humoral durante el curso de una infección por cisticercosis utilizando estos antígenos recombinantes y para comparar la respuesta que inducen frente a sus homólogos nativos del LLGP-EITB.

Además, se obtuvo un protocolo optimizado para el uso de esta plataforma multiplex (MBA), que es más rentable y eficiente que evaluar la presencia de anticuerpos IgG en un ensayo de ELISA individual. Aunque se necesitarían más ensayos comparando la respuesta inmune adaptativa humoral en distintos escenarios y con un mayor tamaño muestral; en el futuro, se podrá definir la mejor combinación de antígenos y patrones específicos de concentración de anticuerpos que evalúen el progreso de la infección.

## **X. CONCLUSIONES**

- En el proceso de optimización, se determinó que los antígenos recombinantes rGP50 y rT24H a 12.5 ug/mL conjugados con buffer MES fueron los que obtuvieron IFM más altos en comparación con los péptidos sintéticos. Asimismo, de el péptido sintético sTs14 fue el que mejor desempeño obtuvo utilizando solo 2.5 ug/mL conjugados a buffer borato.
- La técnica del MBA describió y comparó la cinética de los niveles de fluorescencia emitidos por los IgG en los tres grupos de infección demostrando diferentes tendencias para cada grupo de infección. Donde se observó que los anticuerpos IgG contra los antígenos rGP50 y rT24H se mantuvieron durante más tiempo, incluso en presencia de quistes degenerados en cerdos de 3 y 5 meses, mientras que los anticuerpos contra los péptidos sTs14, sTs18, sTsRS1 y sTsRS2 decayeron a partir del día 57 PI. Excepto para el grupo de cerdos infectados a un mes de edad donde todos los anticuerpos detectados mantuvieron niveles de fluorescencia altos y en aumento durante todo el seguimiento.
- La técnica del MBA permitió diferenciar dos tendencias marcadas en la señal de fluorescencia emitida por anticuerpos IgG en cerdos con infecciones viables y no viables, donde fue mayor contra los péptidos sTs14 y sTs18 en cerdos con quistes viables; asimismo, mostraron una reducción

drástica ante la degeneración del quiste, por lo que podrían ser usados como biomarcadores para detectar infecciones viables.

- Finalmente se determinó el porcentaje de concordancia y análisis kappa entre los antígenos nativos del LLGP-EITB (western blot) y los recombinantes del MBA, el cual fue mayor al 96% y 0.89, demostrando que ambos inducen respuestas de anticuerpos IgG similares en el hospedero.

## **XI. RECOMENDACIONES**

- Determinar cuantitativamente la presencia de anticuerpos específicos mediante concentraciones, para lo que será necesario establecer una curva estándar de referencia.
- Expandir la evaluación de MBA para cisticercosis porcina para determinar con mayor precisión las tendencias de la señal de anticuerpos en el curso de la infección y después del tratamiento.
- Realizar un análisis estadístico a profundidad para identificar combinaciones de antígenos recombinantes que puedan predecir algún estadio de la infección.
- Realizar el análisis bioinformático a nivel estructural de los antígenos recombinantes y péptidos sintéticos para evaluar posibles epítomos compartidos que estén interfiriendo en la cuantificación individual de la concentración de anticuerpos.
- Determinar la performance en términos de sensibilidad y especificidad y posibles reacciones cruzadas con otras parasitosis de la prueba de MBA con una batería de suero cerdos definida para establecer el punto de corte adecuado.

## **XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Abdel Razek AA, Watcharakorn A, Castillo M. Parasitic diseases of the central nervous system. *Neuroimaging Clin N Am*. 2011;21(4):815-41, viii.
2. Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol*. 1994;4:77-116.
3. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH. *Taenia solium* Cysticercosis and Its Impact in Neurological Disease. *Clinical microbiology reviews*. 2020;33(3).
4. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect*. 2000;2(15):1875-90.
5. Chembensofu M, Mwape KE, Van Damme I, Hobbs E, Phiri IK, Masuku M, et al. Re-visiting the detection of porcine cysticercosis based on full carcass dissections of naturally *Taenia solium* infected pigs. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):572.
6. Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1990;43(2):194-9.
7. Diaz F, Garcia HH, Gilman RH, Gonzales AE, Castro M, Tsang VC, et al. Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Epidemiol*. 1992;135(8):875-82.

8. Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, Pacheco R, Verastegui M, Tsang VC. Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the highlands of Cusco, Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Acta Trop*. 1999;73(1):31
9. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, et al. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;133(1):115-24.
10. Greene RM, Hancock K, Wilkins PP, Tsang VC. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18-kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol*. 2000;86(5):1001-7.
11. Dermauw V, Carabin H, Cisse A, Millogo A, Tarnagda Z, Ganaba R, et al. Evaluating the Recombinant T24H Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot Assay for the Diagnosis of Neurocysticercosis in a Panel of Samples from a Large Community-Based Randomized Control Trial in 60 Villages in Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(2):565-9.
12. Arroyo G, Rodriguez S, Lescano AG, Alroy KA, Bustos JA, Santivanez S, et al. Antibody Banding Patterns of the Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot and Brain Imaging Findings in Patients With Neurocysticercosis. *Clin Infect Dis*. 2018;66(2):282-8.
13. Sitali MC, Schmidt V, Mwenda R, Sikasunge CS, Mwape KE, Simuunza MC, et al. Experimental animal models and their use in understanding cysticercosis: A systematic review. *PLoS One*. 2022;17(7):e0271232.
14. Cangalaya C, Bustos JA, Calcina J, Vargas-Calla A, Suarez D, Gonzalez AE, et al. Perilesional Inflammation in Neurocysticercosis - Relationship Between

Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging, Evans Blue Staining and Histopathology in the Pig Model. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(7):e0004869.

15. Mahanty S, Orrego MA, Mayta H, Marzal M, Cangalaya C, Paredes A, et al. Post-treatment vascular leakage and inflammatory responses around brain cysts in porcine neurocysticercosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003577.

16. Cangalaya C, Bustos JA, Calcina J, Vargas-Calla A, Mamani J, Suarez D, et al. Radiological evolution of porcine neurocysticercosis after combined antiparasitic treatment with praziquantel and albendazole. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):e0005624.

17. Garcia HH, Del Brutto OH. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2000;14(1):97-119, ix.

18. Sotelo J. Clinical manifestations, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2011;11(6):529-35.

19. Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, Garcia-Varela M, Sciutto E, Larralde C, et al. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infect Genet Evol*. 2014;23:150-60.

20. Flisser A, Avila G, Maravilla P, Mendlovic F, Leon-Cabrera S, Cruz-Rivera M, et al. *Taenia solium*: current understanding of laboratory animal models of taeniosis. *Parasitology*. 2010;137(3):347-57.

21. Garcia HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in P. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*. 2003;362(9383):547-56.

22. Verastegui MR, Mejia A, Clark T, Gavidia CM, Mamani J, Ccopa F, et al. Novel rat model for neurocysticercosis using *Taenia solium*. *Am J Pathol*. 2015;185(8):2259-68.
23. Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Handb Clin Neurol*. 2014;121:1445-59.
24. Arora N, Tripathi S, Kumar P, Mondal P, Mishra A, Prasad A. Recent advancements and new perspectives in animal models for Neurocysticercosis immunopathogenesis. *Parasite Immunol*. 2017;39(7).
25. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003;87(1):43-51.
26. Assana E, Awah-Ndukum J, Djonmaila JD, Djiatche HD, Awe C, Manchang TK, et al. A comparison of *Taenia solium* and *Taenia hydatigena* infection in pigs using serological diagnosis and post-mortem inspection methods in Benoue division, North Cameroon. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. 2019;17:100306.
27. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop*. 2003;87(1):79-86.
28. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989;159(1):50-9.
29. Garcia HH, Martinez M, Gilman R, Herrera G, Tsang VC, Pilcher JB, et al. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. The Cysticercosis Working Group in Peru. *Lancet*. 1991;338(8766):549-51.

30. Flisser A, Gyorkos TW. Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. *Parasite Immunol.* 2007;29(12):637-49.
31. Garcia HH, O'Neal SE, Noh J, Handali S, Cysticercosis Working Group in P. Laboratory Diagnosis of Neurocysticercosis (*Taenia solium*). *J Clin Microbiol.* 2018;56(9).
32. Gomez-Puerta L, Vargas-Calla A, Castillo Y, Lopez-Urbina MT, Dorny P, Garcia HH, et al. Evaluation of cross-reactivity to *Taenia hydatigena* and *Echinococcus granulosus* in the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay for the diagnosis of porcine cysticercosis. *Parasit Vectors.* 2019;12(1):57.
33. Sreedevi C, Hafeez M, Kumar PA, Rayulu VC, Subramanyam KV, Sudhakar K. PCR test for detecting *Taenia solium* cysticercosis in pig carcasses. *Trop Anim Health Prod.* 2012;44(1):95-9.
34. Gonzales AE, Garcia HH, Gilman RH, Gavidia CM, Tsang VC, Bernal T, et al. Effective, single-dose treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole. *Am J Trop Med Hyg.* 1996;54(4):391-4.
35. Garcia HH, Gonzalez AE, Rodriguez S, Gonzalvez G, Llanos-Zavalaga F, Tsang VC, et al. [Epidemiology and control of cysticercosis in Peru]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2010;27(4):592-7.
36. Bern C, Garcia HH, Evans C, Gonzalez AE, Verastegui M, Tsang VC, et al. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis.* 1999;29(5):1203-9.
37. Garcia HH, Pretell J, Gilman RH, Cysticercosis Working Group in P. Neurocysticercosis and the global world. *J Neurol.* 2002;249(8):1107-8.

38. Ramirez-Zamora A, Alarcon T. Management of neurocysticercosis. *Neurol Res.* 2010;32(3):229-37.
39. Deckers N, Kanobana K, Silva M, Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, et al. Serological responses in porcine cysticercosis: a link with the parasitological outcome of infection. *Int J Parasitol.* 2008;38(10):1191-8.
40. Tsang VC, Pilcher JA, Zhou W, Boyer AE, Kamango-Sollo EI, Rhoads ML, et al. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 1991;29(1-2):69-78.
41. Handali S, Gonzalez AE, Hancock K, Garcia HH, Roberts JM, Gilman RH, et al. Porcine antibody responses to *taenia solium* antigens rGp50 and sTs18var1. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(3):322-6.
42. Bueno EC, Scheel CM, Vaz AJ, Machado LR, Livramento JA, Takayanagui OM, et al. Application of synthetic 8-kD and recombinant GP50 antigens in the diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(3):278-83.
43. Handali S, Pattabhi S, Lee YM, Silva-Ibanez M, Kovalenko VA, Levin AE, et al. Development and evaluation of porcine cysticercosis QuickELISA in Triturus EIA analyzer. *J Immunoassay Immunochem.* 2010;31(1):60-70.
44. Chaisiri K, Kusolsuk T, Homsuwan N, Sanguankiat S, Dekumyoy P, Peunpipoom G, et al. Co-occurrence of swine cysticercosis due to *Taenia solium* and *Taenia hydatigena* in ethnic minority villages at the Thai-Myanmar border. *J Helminthol.* 2019;93(6):681-9.

45. Gomez-Puerta LA, Garcia HH, Gonzalez AE, Cysticercosis Working Group in P. Experimental porcine cysticercosis using infected beetles with *Taenia solium* eggs. *Acta Trop*. 2018;183:92-4.
46. Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, Yushak ML, Lane WS, Garcia HH, et al. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol*. 2006;147(1):109-17.
47. Hernandez-Gonzalez A, Noh J, Perteguer MJ, Garate T, Handali S. Comparison of T24H-his, GST-T24H and GST-Ts8B2 recombinant antigens in western blot, ELISA and multiplex bead-based assay for diagnosis of neurocysticercosis. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):237.
48. Noh J, Rodriguez S, Lee YM, Handali S, Gonzalez AE, Gilman RH, et al. Recombinant protein- and synthetic peptide-based immunoblot test for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1429-34.
49. Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, et al. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2577-86.
50. Lee C, Noh J, O'Neal SE, Gonzalez AE, Garcia HH, Cysticercosis Working Group in P, et al. Feasibility of a point-of-care test based on quantum dots with a mobile phone reader for detection of antibody responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(10):e0007746.
51. Mubanga C, Van Damme I, Trevisan C, Schmidt V, Phiri IK, Zulu G, et al. Evaluation of an Antibody Detecting Point of Care Test for Diagnosis of *Taenia*

solium Cysticercosis in a Zambian Rural Community: A Prospective Diagnostic Accuracy Study. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(11).

52. Handali S, Klarman M, Gaspard AN, Noh J, Lee YM, Rodriguez S, et al. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(1):68-72.

53. Ippolito D, Boniotti MB, Fiasconaro M, Fontana S, Boifava M, Pruiti Ciarello F, et al. Development and evaluation of a multi-antigen serological assay for the intra-vitam diagnosis of Tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in pigs. *J Immunol Methods*. 2022;503:113234.

54. Kong W, Li Y, Cheng S, Yan C, An S, Dong Z, et al. Luminex xMAP combined with Western blot improves HIV diagnostic sensitivity. *J Virol Methods*. 2016;227:1-5.

55. Spierings G, Dunbar SA. Pharmacogenetics using Luminex(R) xMAP(R) technology: a method for developing a custom multiplex single nucleotide polymorphism mutation assay. *Methods Mol Biol*. 2013;1015:115-26.

56. Breen EJ, Tan W, Khan A. The Statistical Value of Raw Fluorescence Signal in Luminex xMAP Based Multiplex Immunoassays. *Sci Rep*. 2016;6:26996.

57. Yin F, Chan JF, Zhu Q, Fu R, Chen JH, Choi GK, et al. Development and in-use evaluation of a novel Luminex MicroPlex microsphere-based (TRIOL) assay for simultaneous identification of *Mycobacterium tuberculosis* and detection of first-line and second-line anti-tuberculous drug resistance in China. *J Clin Pathol*. 2017;70(4):342-9.

58. Glushakova LG, Alto BW, Kim MS, Hutter D, Bradley A, Bradley KM, et al. Multiplexed kit based on Luminex technology and achievements in synthetic

biology discriminates Zika, chikungunya, and dengue viruses in mosquitoes. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):418.

59. Germeraad E, Achterberg R, Venema S, Post J, de Leeuw O, Koch G, et al. The development of a multiplex serological assay for avian influenza based on Luminex technology. *Methods.* 2019;158:54-60.

60. Stephenson RJ, Tribble BR, Wang Y, Kerrigan MA, Goldstein SM, Rowland RR. Multiplex serology for common viral infections in feral pigs (*Sus scrofa*) in Hawaii between 2007 and 2010. *J Wildl Dis.* 2015;51(1):239-43.

61. Wyns H, Croubels S, Vandekerckhove M, Demeyere K, De Backer P, Goddeeris BM, et al. Multiplex analysis of pro-inflammatory cytokines in serum of *Actinobacillus pleuropneumoniae*-infected pigs. *Res Vet Sci.* 2015;102:45-8.

62. Andrade-Mogrovejo DA, Gonzales-Gustavson E, Ho-Palma AC, Prada JM, Bonnet G, Pizzitutti F, et al. Development of a dose-response model for porcine cysticercosis. *PLoS One.* 2022;17(3):e0264898.

63. Gonzalez AE, Bustos JA, Jimenez JA, Rodriguez ML, Ramirez MG, Gilman RH, et al. Efficacy of diverse antiparasitic treatments for cysticercosis in the pig model. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(2):292-6.

64. Gonzalez AE, Bustos JA, Garcia HH, Rodriguez S, Zimic M, Castillo Y, et al. Successful Antiparasitic Treatment for Cysticercosis is Associated with a Fast and Marked Reduction of Circulating Antigen Levels in a Naturally Infected Pig Model. *Am J Trop Med Hyg.* 2015;93(6):1305-10.

65. Flisser A, Espinoza B, Tovar A, Plancarte A, Correa D. Host--parasite relationship in cysticercosis: immunologic study in different compartments of the host. *Vet Parasitol.* 1986;20(1-3):95-102.

66. Erkens T, Goeminne N, Kegels A, Byloos M, Vinken P. Analytical performance of a commercial multiplex Luminex-based cytokine panel in the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2018;91:43-9.
67. Kabsay R, Gomez-Morales MA, Rivera HN, McAuliffe I, Pozio E, Handali S. A Bead-Based Assay for the Detection of Antibodies against *Trichinella* spp. Infection in Humans. *Am J Trop Med Hyg*. 2021;104(5):1858-62.
68. Hernandez-Gonzalez A, Gonzalez-Bertolin B, Urrea L, Fleury A, Ferrer E, Siles-Lucas M, et al. Multiple-bead assay for the differential serodiagnosis of neglected human cestodiasis: Neurocysticercosis and cystic echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022;16(1):e0010109.
69. Corstjens PL, de Dood CJ, Priest JW, Tanke HJ, Handali S, Cysticercosis Working Group in P. Feasibility of a lateral flow test for neurocysticercosis using novel up-converting nanomaterials and a lightweight strip analyzer. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(7):e2944.
70. Sciutto E, Hernandez M, Garcia G, de Aluja AS, Villalobos AN, Rodarte LF, et al. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet Parasitol*. 1998;78(3):185-94.

### XIII. ANEXOS

**Anexo 1.** Análisis de calidad de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos utilizados en el estudio.

Confidential and Privileged



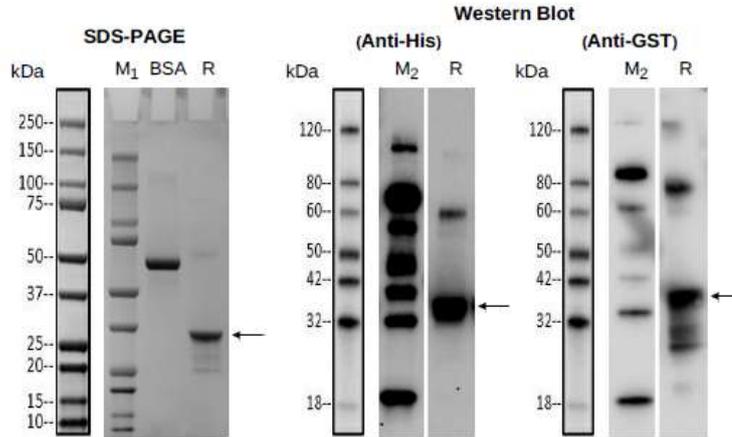
#### Certificate of Analysis

<b>Name:</b>	rT24H
<b>Type:</b>	Recombinant protein
<b>Shipping Condition:</b>	Dry Ice
<b>Lot Number:</b>	U0533HC040-3/P3HD001
<b>Expression Host:</b>	E.coli
<b>Purification:</b>	Protein was obtained from supernatant of cell lysate, Ni column+GST column

---

<b>Total Amount:</b>	15.76 mg. 4.00 ml/tube, 2 tubes
<b>Concentration:</b>	1.97 mg/ml(by Bradford)
<b>Purity:</b>	≥85%(SDS-PAGE under reducing condition)
<b>Mass:</b>	Confirmed by LC-MS
<b>Storage And Handling:</b>	Store at -80°C.Avoid repeated freezing and thawing
<b>Storage Buffer:</b>	PBS, pH 7.4

**SDS-PAGE & Western blot Analysis:**

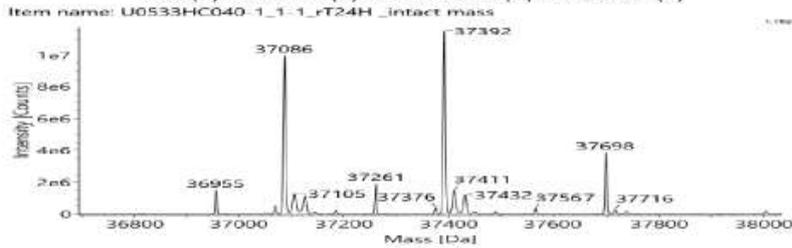


Lane M1: Protein Marker, Bio-rad, Cat. No. 1610374S, refer to annotated key on the left for size  
 Lane M2: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00673, refer to annotated key on the left for size  
 BSA: 2.00 µg  
 R: Reducing condition  
 Primary antibody: Mouse-anti-His mAb (GenScript, Cat. No. A00186)  
 Primary antibody: Mouse anti-GST mAb (GenScript, Cat.No. A00865)

**U0533HC040-1\_rT24H \_intact mass**

Protein name	Theoretical Mass(Da)	Observed Mass(Da)	Proposed modifications	Theoretical mass with proposed modifications(Da)	Δmass* (Da)
rT24H	37093	36955	-Met N-term(1);	36962	-7
	37093	37086	N/A;	37093	-7
	37093	37261	Glutathionylation(1); -Met N-term(1);	37267	-6
	37093	37392	Glutathionylation(1);	37396	-6
	37093	37698	Glutathionylation(2);	37703	-5

\*Δmass (Da) = Observed mass (Da) - Theoretical mass with proposed modifications (Da)



## Certificate of Analysis

**Order Number:** U0533HC040-8  
**Name:** rGP50  
**Type:** Cultured Supernatant of Mammalian Cell Containing Recombinant Protein  
**Shipping Condition:** Dry Ice  
**Lot Number:** U0533HC040-8/P9HE001

---

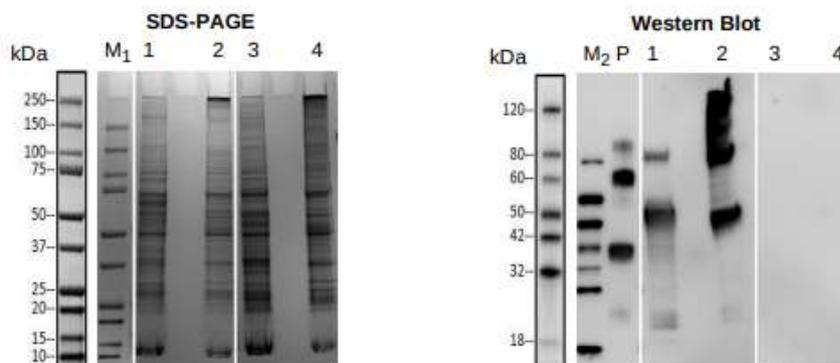
**Expression System:** Mammalian  
**Expression Vector:** pcDNA3.4  
**Expression Scale:** 30 ml

---

**Total amount:** 30.00 ml. 3.00 ml/tube, 10 tubes;  
**Storage and Handling:** Store at -80°C. Aliquots should be stored at the same temperature after first use to avoid multiple freeze-thaws

### Quality Assurance:

#### SDS-PAGE & Western blot Analysis:



Lane M<sub>1</sub>: Protein Marker, Bio-rad, Cat. No. 1610374S, refer to annotated key on the left for size  
 Lane M<sub>2</sub>: Protein Marker, GenScript, Cat. No. M00673, refer to annotated key on the left for size  
 Lane 1: Cell culture supernatant from day 8 post-transfection under a reducing condition  
 Lane 2: Cell culture supernatant from day 8 post-transfection under a non-reducing condition  
 Lane 3: Negative control under a reducing condition  
 Lane 4: Negative control under a non-reducing condition  
 Lane P: Purified protein (GenScript) as positive control  
 Primary antibody: Mouse anti-GST mAb (GenScript, Cat.No. A00865)

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

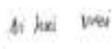
Product Name	Ts18var1
Order ID	U7770HB240_1
Lot No.	U7770HB240-1/PE2052
Sequence	EKIKPKCDTNSTKKEIEYIHNWFFHDDPIGKQIAQLAKNWNVETVQEAKEIRA SLAEYCRGLKNKTA
Modification	N/A
Length	67AA
Storage	-20°C
Recommended Solvent*	Ultrapure water
Comments	TFA salt

Test Item	Specifications	Results
Molecular Weight	Theoretical MW: 7777.76	Consistent
HPLC purity	≥75.0%	79.8%
Appearance	White lyophilized powder	Conforms
Gross Weight	4 mg	4.1mg

\*Note: Above recommended solvents for reference only. If there is any request for detailed dissolution conditions, we suggest you choose our 'Peptide Solubility Test Service'.

**Caution:**

For laboratory or further manufacturing use only. Not intended for household use. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or 1-732-885-9188.

Certified by:  Date: 04/23/2022

Thank you for your patronage to our Peptide services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1000  points. For more information, please contact us by e-mail at [web@genscript.com](mailto:web@genscript.com)

## CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name	TsRS1
Order ID	U7770HB240_2
Lot No.	U7770HB240-2/PE2053
Sequence	EETKPEDVVKNIKKGMEVYKFFYEDPLGKKIAQLAKDWKEAMLEARSKVR ASLAEYIRGLKNEAA
Modification	N/A
Length	66AA
Storage	-20°C
Recommended Solvent*	Ultrapure water
Contents	TFA salt

Test Item	Specifications	Results
Molecular Weight	Theoretical MW: 7602.78	Consistent
HPLC purity	≥75.0%	78.1%
Appearance	White lyophilized powder	Conforms
Gross Weight	4 mg	4.1mg

\*Note: Above recommended solvents for reference only. If there is any request for detailed dissolution conditions, we suggest you choose our 'Peptide Solubility Test Service'.

**Caution:**

For laboratory or further manufacturing use only. Not intended for household use. If you have any questions about the Certificate of Analysis, please contact our customer service representative at 1-877-436-7274 (Toll-Free), or 1-732-885-9188.

Certified by:



Date: 04/14/2022

Thank you for your patronage to our Peptide services! To maintain this working relationship, we shall be grateful if you can add our webpage URL into your lab website. As a token of appreciation, you will be rewarded by 1,000 **GenScript™** points. For more information, please contact us by e-mail at [web@genscript.com](mailto:web@genscript.com)

## Anexo 2. . Constancia de aprobación ética del proyecto de investigación



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Dirección Universitaria de  
**INVESTIGACIÓN, CIENCIA Y  
TECNOLOGÍA (DUICT)**

### CONSTANCIA 003 - 01 - 22

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el proyecto de investigación señalado a continuación fue **APROBADO** por el Comité de Ética, bajo la categoría de revisión **EXENTO**. La aprobación será informada en la sesión más próxima del comité.

Título del Proyecto : "Evaluación de la dinámica de anticuerpos en cerdos experimentalmente infectados con cisticercosis mediante un ensayo múltiple basado en microesferas".

Código de inscripción : 205765

Investigadores : Toribio Salazar Luz Milagros.

La aprobación incluyó los documentos finales descritos a continuación:

#### 1. Protocolo de investigación, versión recibida en fecha 19 de enero del 2022.

La **APROBACIÓN** considera el cumplimiento de los estándares de la Universidad, los lineamientos Científicos y éticos, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo investigador y la confidencialidad de los datos, entre otros.

Cualquier enmienda, desviaciones, eventualidad deberá ser reportada de acuerdo a los plazos y normas establecidas. La categoría de **EXENTO** es otorgado al proyecto por un periodo de un año en tanto la categoría se mantenga y no existan cambios o desviaciones al protocolo original. El investigador esta exonerado de presentar un reporte del progreso del estudio por el periodo arriba descrito y solo alcanzará un informe final al término de éste. La aprobación tiene vigencia desde la emisión del presente documento hasta el **18 de enero del 2023**.

Si aplica, los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 19 de enero del 2022.

Dr. Manuel Gasco Tantachuco  
Presidente

Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales

*IdB*

Av. Honorio Delgado 430, SMP 15102 📍  
Apartado postal 4314  
(511) 319-0000 anexo 201352 📞  
duict@oficinas-upch.pe 📧  
www.cayetano.edu.pe 🌐

**Anexo 3.** Tabla de resultados de carga parasitaria por cerdo obtenidos de las fichas de necropsia.

Tag/id CERDO	Grupo de infección	Quistes sanos/ viables	Quistes degenerados	Quistes totales
8113	1 mes	1946	92	<b>2038</b>
8114	1 mes	112	190	<b>302</b>
8115	1 mes	6210	36	<b>6246</b>
8116	1 mes	3295	4	<b>3299</b>
8117	1 mes	0	0	<b>0</b>
8118	1 mes	0	0	<b>0</b>
8107	3 meses	0	0	<b>0</b>
8108	3 meses	556	25	<b>581</b>
8109	3 meses	231	83	<b>314</b>
8110	3 meses	228	139	<b>367</b>
8111	3 meses	0	7	<b>7</b>
8112	3 meses	167	1197	<b>1364</b>
8101	5 meses	105	2808	<b>2913</b>
8102	5 meses	0	831	<b>831</b>
8103	5 meses	0	597	<b>597</b>
8104	5 meses	0	136	<b>136</b>
8105	5 meses	0	1724	<b>1724</b>
8106	5 meses	0	582	<b>582</b>

**Anexo 4.** Tabla resumen de valores de p obtenidos entre intervalos de tiempo por grupo de infección.

Grupo	Intervalo de días PI	rT24H		STSR2		STSR1		rGP50		STS14		STS18	
		Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value
5 meses	0-7	3.329	0.023	1.693	0.035	0.821	0.105	7.426	0.239	3.857	<0.001	4.471	0.017
5 meses	7-14	5.898	0.065	1.857	0.209	1.681	0.078	14.876	0.412	4.031	0.026	7.236	0.015
5 meses	14-21	32.857	0.192	17.1	0.004	8.136	0.001	77.633	0.228	20.631	0.012	9.895	0.088
5 meses	21-28	51.626	0.16	77.002	0.011	45.267	0.033	112.331	0.168	97.193	<0.001	69.664	<0.001
5 meses	28-42	53.801	0.027	28.884	0.034	38.911	0.001	78.052	0.012	127.43	<0.001	85.572	0.04
5 meses	42-57	17.15	0.555	5.21	0.682	-10.266	0.353	31.128	0.283	32.232	0.445	55.66	0.282
5 meses	57-70	-15.55	0.714	-28.465	0.228	-25.773	0.184	57.079	0.23	-119.828	0.116	-77.29	0.305
5 meses	70-90	18.156	0.719	-22.387	0.106	-10.533	0.316	53.397	0.198	-33.019	0.504	-29.65	0.592
3 meses	0-7	1.079	0.008	2.026	0.038	0.917	0.004	3.443	0.021	1.231	0.001	1.095	0.001
3 meses	7-14	2.655	0.004	1.719	0.293	1.131	0.088	5	0.038	2.462	0.023	2.195	0.006
3 meses	14-21	27.681	0.002	9.964	0.082	2.052	0.087	21.51	0.002	20.671	0.024	20.921	0.029
3 meses	21-28	42.671	0.038	8.178	0.425	3.943	0.135	60.724	0.15	46.4	0.208	34.867	0.219
3 meses	28-42	18.825	0.257	15.224	0.172	3.542	0.205	16.724	0.635	36.508	0.426	33.199	0.33
3 meses	42-57	11.319	0.538	22.406	0.239	7.547	0.18	6.703	0.862	64.194	0.426	57.368	0.433
3 meses	57-70	16.694	0.544	-4.665	0.845	16.008	0.179	15.812	0.788	15.249	0.896	9.201	0.932
3 meses	70-90	2.816	0.902	-3.283	0.846	-15.678	0.037	36.157	0.471	-55.353	0.374	-51.961	0.347
1 mes	0-7	0.986	0.147	0.505	0.122	0.719	0.003	1.757	0.023	1.221	0.116	1.59	0.045
1 mes	7-14	6.607	0.021	5.392	0.037	2.131	0.041	8.676	0.041	6.31	0.019	5.469	0.021
1 mes	14-21	26.36	0.268	12.257	0.185	3.426	0.145	78.998	0.05	11.107	0.222	7.543	0.16
1 mes	21-28	33.407	0.372	34.257	0.149	12.038	0.077	83.581	0.265	77.99	0.1	22.429	0.11
1 mes	28-42	36.97	0.196	31.361	0.173	44.512	0.036	39.623	0.48	32.655	0.428	48.833	0.069
1 mes	42-57	51.761	0.29	13.854	0.636	9.642	0.715	79.359	0.335	55.023	0.388	50.323	0.341
1 mes	57-70	15.417	0.829	22.09	0.628	12.619	0.737	-1.6	0.988	39.987	0.695	45.591	0.614
1 mes	70-90	43.706	0.509	17.24	0.702	14.285	0.703	3.764	0.96	3.811	0.962	6.044	0.934

**Anexo 5.** Tabla resumen de valores de p obtenidos entre intervalos de tiempo por viabilidad

Viabilidad	Intervalo de d	rT24H		STSR2		STSR1		rGP50		STS 14		STS18	
		Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value
Viabiles	0-7	1.594	0.019	1.394	0.044	1.003	<0.001	6.702	0.117	2.059	0.02	2.735	0.065
Viabiles	7-14	7.143	0.002	4.456	0.012	2.265	0.002	14.633	0.219	5.922	0.001	5.26	0.048
Viabiles	14-21	47.459	0.023	15.465	0.009	3.565	0.013	95.122	0.038	21.524	0.001	19.592	<0.001
Viabiles	21-28	46.26	0.105	30.632	0.032	11.241	0.005	97.657	0.142	91.256	0.004	45.989	0.005
Viabiles	28-42	41.829	0.03	38.917	0.005	37.663	0.01	35.648	0.387	73.579	0.055	83.897	0.014
Viabiles	42-57	49.857	0.101	27.536	0.064	13.102	0.456	65.613	0.255	84.8	0.135	77.086	0.16
Viabiles	57-70	24.547	0.53	11.597	0.589	19.909	0.353	9.595	0.901	36.912	0.629	36.749	0.622
Viabiles	70-90	46.091	0.229	3.474	0.896	-4.3	0.859	33.902	0.498	-42.363	0.414	-35.672	0.478
No viabiles	0-7	2.002	0.069	1.422	0.025	0.635	0.079	1.716	0.025	2.148	0.01	2.037	0.019
No viabiles	7-14	2.963	0.144	1.524	0.184	1.03	0.105	4.402	0.006	2.613	0.121	4.673	0.023
No viabiles	14-21	10.473	0.005	10.749	0.034	5.511	0.015	23.638	0.011	13.416	0.063	5.981	0.258
No viabiles	21-28	38.876	0.018	48.994	0.054	29.59	0.07	73.433	0.018	56.467	0.037	38.651	0.042
No viabiles	28-42	35.484	0.051	14.902	0.387	23.141	0.109	61.864	0.057	67.054	0.54	35.645	0.105
No viabiles	42-57	-0.335	0.986	-3.161	0.857	-11.126	0.458	5.127	0.891	7.274	0.874	24.529	0.447
No viabiles	57-70	-13.507	0.489	-18.957	0.304	-18.007	0.196	37.932	0.523	-79.974	0.097	-51.747	0.164
No viabiles	70-90	-10.432	0.366	-10.206	0.15	-4.467	0.328	14.948	0.783	-18.279	0.104	-19.829	0.104