

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**



**DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE TOXOPLASMOSIS AGUDA MEDIANTE
NUEVAS COMBINACIONES DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES
QUIMÉRICOS**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR POR EL GRADO DE
BACHILLER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTOR:

DIEGO ALONSO BENITES TAN

ASESORA:

DRA. MARITZA M. CALDERÓN SÁNCHEZ.

LABORATORIO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS

LIMA-PERÚ

2021

Resumen:

La toxoplasmosis, causada por *Toxoplasma gondii* (TG), es una de las zoonosis más comunes en el mundo. La infección aguda es asintomática, pero en personas inmunodeficientes o casos de infección congénita, puede ser mortal. Estos casos requieren un diagnóstico temprano y acertado de la fase aguda.

Las pruebas serológicas identifican anticuerpos que reaccionan con antígenos de TG. Tradicionalmente, se utiliza el lisado de antígeno total de *Toxoplasma* (TLA). Sin embargo, este es ineficiente para identificar fase aguda.

Al utilizar antígenos recombinantes (AR) de TG se ha visto potencial para diferenciar fases pero con baja sensibilidad. Al combinar ARs individuales incrementa la sensibilidad, pero se pierde la capacidad de identificar la fase aguda.

Los antígenos recombinantes quiméricos (ARQ) son combinaciones de epitopes de AR. Su uso es fácil de estandarizar y tiene alta sensibilidad. El ARQ AMA1-SAG2-GRA1-ROP1 puede diferenciar fases en pruebas de avidez IgG. Pero la presencia de AMA1 en este ARQ puede ocasionar reacciones cruzadas con parásitos del phylum Apicomplexa. En Iquitos, pueden ocurrir reacciones cruzadas con el género *Plasmodium* debido a su prevalencia en pacientes con el VIH, vulnerables a toxoplasmosis. Por ello, conviene reemplazar AMA1 por un AR que tenga epitopes caracterizados, altamente inmunogénico, representativo de la fase aguda, sin homología con antígenos de parásitos que infecten a humanos y con alta sensibilidad reportada; todas estas características de GRA8.

El objetivo de este trabajo es evaluar un nuevo ARQ capaz de identificar la fase aguda de toxoplasmosis, y que no cause reacciones cruzadas con antígenos del género *Plasmodium*.

Palabras clave: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis aguda, antígeno recombinante quimérico, ELISA, malaria.

Abstract:

Toxoplasmosis, caused by *Toxoplasma gondii* (TG), is one of the most common zoonosis in the world. Acute infection is asymptomatic, but in immunodeficient people or cases of congenital transmission, it can be mortal. These cases require an early and accurate diagnosis of the acute phase.

Serological tests identify antibodies that react with TG antigens. Traditionally, toxoplasma lysate antigen (TLA) is used. Nevertheless, it is inefficient to identify the acute phase.

With the use of recombinant antigens (AR) from TG, there has been potential to differentiate phases but with low sensitivity. Combining individual ARs increases sensitivity, but the ability to identify the acute phase is lost.

Recombinant chimeric antigens (ARQ) are combinations of AR epitopes. Its usage is easily standardized and gives high sensitivity. The ARQ AMA1-SAG2-GRA1-ROP1 can differentiate phases in IgG avidity tests. But the presence of AMA1 in this ARQ can cause cross-reactions with parasites from the Apicomplexa phylum. In Iquitos, cross-reactions with the genus Plasmodium can occur due to its prevalence in patients with HIV, vulnerable to toxoplasmosis. Thus, it is best to replace AMA1 with an AR that has characterized epitopes, is highly immunogenic, is representative of the acute phase, has no homology with antigens from parasites that infect humans and has a reported high sensitivity; GRA8 has all of these traits.

The objective of this work is to evaluate a new ARQ capable of identifying the acute phase of toxoplasmosis and that gives no cross-reactions with antigens from the Plasmodium genus.

Key words: *Toxoplasma gondii*, acute toxoplasmosis, recombinant chimeric antigen, ELISA, malaria.

Tabla de contenidos

I. Estado del arte:	1
1. Generalidades de <i>Toxoplasma gondii</i> :.....	1
1.1 Ciclo Biológico, estadios del parásito y mecanismos de infección:	1
1.2 Epidemiología de la Toxoplasmosis	2
1.3 Toxoplasmosis y poblaciones en riesgo:	3
1.3.1 Toxoplasmosis en individuos inmunosuprimidos:	3
1.3.2 Toxoplasmosis en mujeres embarazadas:	4
2. Estrategias para el diagnóstico de toxoplasmosis	4
2.1 Técnicas de imagen	5
2.2 Técnicas moleculares	6
2.3.1 Antígenos recombinantes de <i>Toxoplasma gondii</i> y su uso en el diagnóstico serológico de Toxoplasmosis	8
2.3.2 Antígenos recombinantes quiméricos de <i>Toxoplasma gondii</i> y su uso en el diagnóstico serológico de Toxoplasmosis	9
II. Problema de investigación:	11
III. Estrategia de abordaje	14
3.1 Elaboración del antígeno recombinante quimérico (ARQ)	14
3.2 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los ARQ:	16
IV. Referencias Bibliográficas:	17
V. Anexos:.....	22
Tabla 1. Antígenos recombinantes más relevantes	22
Tabla 2. Combinaciones de antígenos recombinantes.	23
Tabla 3. Antígenos recombinantes quiméricos.....	24

I. Estado del arte:

1. Generalidades de *Toxoplasma gondii*:

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado patógeno, capaz de infectar casi cualquier tipo de célula nucleada en los mamíferos o aves (1,2). Pertenece al phylum Apicomplexa, que se caracterizan por tener una estructura celular polarizada, un citoesqueleto complejo y organelas en la zona apical (1). Otros miembros pertenecientes a este phylum son los géneros *Plasmodium*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora* y *Cystoisospora* (1).

1.1 Ciclo Biológico, estadios del parásito y mecanismos de infección:

Durante su ciclo biológico, *T. gondii* tiene tres estadios infecciosos los cuales son: el ooquiste, el quiste y el taquizoito (1,2). Con los ooquistes, el mecanismo de infección es fecal-oral, estos se encuentran en las heces de los felinos infectados y pueden causar una infección si contaminan alimentos ingeridos por otro felino, un ave u otro mamífero (1,3). Los bradizoitos son infecciosos por medio del carnivorismo, estos se encuentran en quistes alojados en el tejido muscular de los hospederos y pueden causar infección si se consume la carne de un animal infectado o se recibe un trasplante de un órgano infectado con los quistes(1,3). Los taquizoitos proliferan en el hospedero al inicio de la infección y pueden transmitirse por vía congénita de madre a hijo al cruzar la placenta e infectar los tejidos del feto (3).

Su ciclo de vida puede ser dividido en los ciclos sexual y asexual. El ciclo sexual ocurre en felinos, los cuales actúan como hospederos definitivos (2). El ciclo asexual ocurre principalmente en aves y mamíferos, incluyendo el humano, los cuales actúan como

hospederos intermediarios (2). Cabe resaltar que los felinos también pueden actuar como hospederos intermediarios.

El ciclo sexual ocurre cuando un felino ingiere carne infectada con quistes llenos de bradizoitos o alimentos contaminados con ooquistes (1). Una vez dentro del hospedero, infecta el epitelio intestinal y se reproduce dentro de este, lo que resulta en la formación de ooquistes inmaduros que son excretados en sus heces y maduran en el ambiente (1). El ciclo asexual puede dividirse en las fases aguda y crónica; y comienza cuando el hospedero intermediario ingiere carne infectada con bradizoitos o alimentos contaminados con ooquistes (1,2). El parásito infecta el epitelio intestinal y se diferencia en taquizoito (2), los cuales comienzan a reproducirse rápidamente por endodiogenia dentro de cualquier tipo de célula nucleada (2). Después de 7 a 10 días post-infección, los taquizoitos se diferencian a bradizoitos y se alojan en quistes dentro de los tejidos, principalmente el tejido nervioso y el muscular (2), este proceso de diferenciación marca el inicio de la fase crónica que se caracteriza por una reproducción asexual lenta; esta forma facilita la evasión del sistema inmune del hospedero (1,2).

La posibilidad de ser infeccioso en sus estadíos principales y su capacidad para infectar a gran parte de los animales de sangre caliente, además de poder infectar múltiples tipos de célula, hacen que sea una de las zoonosis más comunes en el mundo.

1.2 Epidemiología de la Toxoplasmosis

Se estima que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con *T. gondii* (1), sin embargo, la mayoría no es consciente de ello porque la infección aguda tiende a ser asintomática o presentar síntomas similares a una enfermedad viral menor (4,5). En la

actualidad, la prevalencia del parásito es variable entre países, desde un 10% a un 80%, y frecuentemente hay grandes diferencias dentro de un mismo país, y entre comunidades de una misma región (5). Prevalencias bajas de 10% a 30% se han observado en America del Norte, Asia Sureste y el Norte de Europa (5); moderadas de 30% a 50% han sido reportadas en países del Centro y el Sur de Europa (5), y mayores al 50% se han encontrado en zonas tropicales de America Latina y Africa (5).

La prevalencia de toxoplasmosis depende mayormente de factores antropogénicos como hábitos alimenticios y de higiene, pero también tiene alta correlación con zonas rurales y tropicales (4). Esta tendencia hace que coexista con otros parásitos endémicos, algunos del phylum Apicomplexa, como *Plasmodium sp.*, causante de la malaria y el cual es un parásito hemático y tisular al igual que el Toxoplasma. Además, puede cohabitar con los géneros *Cryptosporidium*, *Cystoisospora* y *Cyclospora*, los cuales son parásitos intestinales en los humanos (6-9).

1.3 Toxoplasmosis y poblaciones en riesgo:

La mayoría de casos de infección son asintomáticos (10,11). Sin embargo, la infección puede ser fatal en individuos inmunocomprometidos, y la infección primaria en mujeres embarazadas puede ocasionar una enfermedad severa e incapacitante en el feto en desarrollo (10,11).

1.3.1 Toxoplasmosis en individuos inmunosuprimidos:

Los síntomas severos de infección aguda en individuos inmunosuprimidos normalmente son resultado de una reactivación de una infección crónica latente (10).

Los signos son neurológicos e incluyen: dolores de cabeza, mareos, neumonía,

retinocoroiditis y encefalitis, siendo este último el más común (10). Estos son padecidos principalmente por pacientes con el VIH, pero también se ha visto reactivación en pacientes con cáncer y en trasplantes de órganos que reciben tratamientos inmunosupresores (10). Si no se trata a tiempo la toxoplasmosis resulta fatal.

1.3.2 Toxoplasmosis en mujeres embarazadas:

La infección congénita ocurre cuando una mujer embarazada, infectada por primera vez por *T. gondii*, transmite taquizoitos al feto. Debido a que la mujer aún no desarrolla anticuerpos contra el parásito, estos ingresan al feto a través de la placenta (11). La severidad de la enfermedad en los infantes es inversamente proporcional a la edad gestacional en la que se da la infección, siendo aquellos infectados en el primer trimestre los que presentan manifestaciones más severas (11). Las consecuencias varían desde abortos espontáneos, coriorretinitis, calcificaciones craneales, hidrocefalia y microcefalia. Todos estos fatales para la vida y el desarrollo a futuro del recién nacido (11).

Debido a la gravedad de las manifestaciones clínicas por la infección aguda en estas poblaciones en riesgo, es necesario un método de diagnóstico rápido y eficaz para la fase aguda de toxoplasmosis.

2. Estrategias para el diagnóstico de toxoplasmosis

Para dar el tratamiento de manera oportuna a la fase aguda de la toxoplasmosis humana es necesario conocer los métodos utilizados para diagnosticarla. Estos son: las técnicas de

imagen, las técnicas moleculares y las técnicas serológicas, siendo estas últimas las más utilizadas (12). Además, es necesario saber las ventajas y limitaciones de cada uno.

2.1 Técnicas de imagen

Las técnicas de imagen son métodos indirectos que buscan identificar signos de la infección por toxoplasmosis en los pacientes (12).

En pacientes inmunodeficientes, se busca identificar daño cerebral. El signo de diana excéntrico es el criterio más común que sugiere toxoplasmosis con sensibilidad de 25% y especificidad de 90% (13). En los ganglios basales se observan lesiones nodulares múltiples y también lesiones redondas hipodensas o isodensas con pared delgada y lisa (13). Además, se observan lesiones calcificadas de pared gruesa después de recibir tratamiento para toxoplasmosis (12). Las lesiones mencionadas se observan mediante tomografía axial computarizada (TAC) (12,13). También se pueden observar áreas hiperintensas por resonancia magnética (RM), las cuales cambian a isointensas después de recibir tratamiento (12).

Para toxoplasmosis congénita, se espera ver hidrocefalia y calcificaciones cerebrales, particularmente en las áreas periventriculares y en el plexo coroideo; estas lesiones son observables por TAC (12). Además, se puede detectar ventriculomegalia, nodulos ecogénicos periventriculares, calcificación ocular y microftalmia, entre otros, por medio de ecografía (12,14). A pesar de esto, los signos empiezan a ser evidentes en el tercer trimestre y los más característicos, como lesiones oculares, no son descubiertos hasta después del parto (14).

Debido a su baja sensibilidad y su dependencia en identificar lesiones, estas técnicas son usadas junto a otras para poder confirmar toxoplasmosis aguda y no son útiles si se desea un diagnóstico temprano de la enfermedad (12).

2.2 Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares son métodos indirectos que detectan el ADN del parásito presente en el líquido amniótico o en el feto (Toxoplasmosis congénita), ó en el líquido cefalorraquídeo (Toxoplasmosis encefálica) (12). Las técnicas más comunes son aquellas basadas en la reacción en cadena de polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *polymerase chain reaction*), para detectar ADN del parásito a partir de una muestra del paciente; la mejor sensibilidad se consigue de muestras de líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico (15-17). Actualmente, se utiliza el PCR en tiempo real (qPCR) en el cual se emplean “primers” y sondas taqman dirigidas al gen B1 (gen multicopia, repetido 35 veces) y la secuencia REP 529 (gen multicopia, repetido 200 a 300 veces). Se ha reportado para el gen B1 una sensibilidad de 83% en muestras de líquido cefalorraquídeo (18). La sensibilidad obtenida usando muestras de coágulo ha mejorado en qPCR con la secuencia REP529, sin embargo, el diagnóstico más acertado se obtiene usando líquido cefalorraquídeo (15-17).

Las pruebas moleculares basadas en PCR han mostrado ser acertadas para el diagnóstico de la fase aguda, e incluso han mostrado ser específicas al no tener reacciones cruzadas con otras parasitosis (17,18). Sin embargo, su costo es alto para países en vías de desarrollo (17). Además, para obtener una mejor sensibilidad, son necesarios procedimientos invasivos como la punción lumbar y la amniocentesis, los cuáles, pueden no ser seguros como cuando existe

elevada presión intracraneal (17) o el embarazo aún no llega a las 15 semanas, respectivamente (19).

2.3 Técnicas serológicas

Las técnicas serológicas son métodos indirectos que utilizan antígenos de *T. gondii* para detectar anticuerpos en el suero de los pacientes. A través de los años, se han desarrollado diversas pruebas inmunológicas como la prueba de tinción Sabin Feldman (SFDT), prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT), Ensayo de Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), Western blot (WB) y ensayos de avidéz para IgG, entre los principales (12,20). La eficacia de estas pruebas depende de la calidad de los antígenos empleados.

Una forma de serodiagnóstico es la detección de distintos tipos de anticuerpos (IgA, IgM, IgG e IgE) que tienen patrones específicos de expresión según el tiempo de la infección. Los anticuerpos IgM se expresan al inicio de la infección y su detección podría ser indicativo de una infección aguda, sin embargo el tiempo por el que estos permanecen es variable (1 a 6 meses) (21). Los anticuerpos IgG incrementan luego de dos meses de la infección y disminuyen una vez controlada la infección, pero persisten en niveles bajos por el resto de la vida (21). La detección serológica de IgG e IgM es lo más común en el diagnóstico de toxoplasmosis.

Evaluar la maduración de los anticuerpos IgG detectando la avidéz de estos, es una manera de diferenciar infecciones recientes de infecciones pasadas (21). Una avidéz alta indica infección antigua y una avidéz baja evidencia interacciones débiles entre antígeno y anticuerpo, lo cual indica infección reciente (21). Sin embargo, esto no resulta útil al diagnosticar infección aguda cuando hay reactivación en pacientes inmunosuprimidos.

El antígeno tradicional para métodos serológicos es el que se obtiene del lisado de antígeno total de *Toxoplasma* (TLA), su obtención implica la purificación de la proteína total de taquizoitos que crecen en cultivos o son mantenidos en animales de laboratorio infectados. Los procedimientos para producir estos antígenos difieren entre laboratorios, son de alto costo y requieren una larga preparación, además se corre el riesgo de infección por manipulación (12,20). Finalmente, estos antígenos no son capaces de detectar anticuerpos (IgG o IgM) específicos de la fase aguda de toxoplasmosis, siendo un problema para las poblaciones en riesgo.

2.3.1 Antígenos recombinantes de *Toxoplasma gondii* y su uso en el diagnóstico serológico de Toxoplasmosis

Los antígenos recombinantes (AR) son proteínas capaces de generar respuesta inmune que han sido expresadas en un organismo diferente al de su origen. Numerosos AR han mostrado tener alta sensibilidad y especificidad al ser usados para pruebas serológicas, pero la ventaja que ofrecen sobre el TLA es su capacidad para diferenciar entre fases de infección (Ver Tabla 1). Una gran cantidad de genes que codifican AR de TG han sido clonados en sistemas de expresión bacterianos y eucariotas (20). Se han expresado antígenos de superficie como SAG1, SAG2, SAG3; de gránulos densos como GRA1, GRA2, GRA5, GRA6, GRA7 y GRA8; de roptrias como ROP1 y ROP2; y de micronemas como MIC1, MIC2 y MIC3; así como otros AR como B10, MAG1 y AMA1 (20).

Determinados AR tendrán una mayor respuesta en sueros de fase aguda que en los de fase crónica. Para IgM ELISA, el antígeno P35 ha mostrado tener sensibilidad de 90% para sueros en fase aguda y ningún suero de fase crónica fue positivo, y en prueba IgG ELISA, mostró

85.3% de sensibilidad para fase aguda y 8% para fase crónica (20). El AR ROP1 ha mostrado sensibilidad de 94.6% en sueros de fase aguda y 15.5% en sueros de fase crónica para IgG ELISA (20). Por otro lado, existen AR donde la diferencia no es marcada como los AR GRA1 y SAG2 que mostraron una sensibilidad de 83.3% y 93.9% para sueros en fase aguda y de 77.8% y 96.5% en sueros de fase crónica, respectivamente para Ig ELISA (22,23). La tabla 1 muestra AR que han tenido una respuesta más fuerte ante sueros de pacientes en fase aguda.

La sensibilidad y especificidad del serodiagnóstico aumenta si se usan estos AR en combinación, pero su capacidad para discriminar fases de infección se reduce (Ver tabla 2). Una de las combinaciones que mantuvo su capacidad de diferenciación fue SAG2, P25, GRA7 y GRA8 que en IgG ELISA mostró 90% de sensibilidad y 97% de especificidad para sueros en fase aguda y solo 1.4% de sensibilidad para sueros en fase crónica (20).

2.3.2 Antígenos recombinantes quiméricos de *Toxoplasma gondii* y su uso en el diagnóstico serológico de Toxoplasmosis

Un antígeno recombinante quimérico (ARQ) es una proteína sintética que contiene epitopes inmunoreactivos de distintos antígenos para *T. gondii* que han sido propiamente seleccionados (Ver Tabla 3). La ventaja que tienen sobre los AR es su mayor sensibilidad y especificidad en el serodiagnóstico, debido a la combinación de antígenos, y su alta reproducibilidad (20). Los primeros ARQ sintetizados usaron combinaciones de epitopes de MIC2, MIC3, SAG1, GRA3 y GRA7, que resultaron en los ARQ GST-EC2 con 98% de sensibilidad y GST-EC3 con 84% de sensibilidad para anticuerpos IgM (20). Posteriormente,

ARQs como SAG1/2, MIC1-MAG1-SAG1 y SAG2-GRA1-ROP1 han mostrado sensibilidad del 100% para anticuerpos IgG (20,24).

A pesar de tener eficacia comparable con los kits comerciales basados en TLA, su capacidad de diferenciar anticuerpos en fase aguda o fase crónica se ve limitada. En el caso de MIC1-MAG1 y MIC1-MAG1-SAG1, estos tienen sensibilidad de 85.1% y 96.9%, respectivamente, en la detección de anticuerpos IgG por ELISA durante la fase crónica (20).

El ARQ tetravalente, AMA1-SAG2-GRA1-ROP1, ha mostrado tener sensibilidad del 95.5% para detectar IgM y de 100% para detección de IgG en sueros de pacientes con Toxoplasmosis, utilizando la prueba ELISA (25). Además, en ensayos de avididad de IgG, ha mostrado una sensibilidad y especificidad del 100% al poder diferenciar sueros en fase aguda de los de fase crónica (25). A pesar de que se mostró la utilidad de este ARQ en el serodiagnóstico, se requieren más ensayos con mayor número de muestras y tener resultados replicables en otros laboratorios para la estandarización (25).

Los ARQ sintetizados son de alta calidad y empiezan a ser una opción frente a los kits comerciales basados en TLA. Sin embargo, estos aún requieren más pruebas para ser confiables al diferenciar infección aguda de crónica, sobre todo en países tropicales donde existe mayor riesgo de reacciones cruzadas (15,16,26). En ningún estudio de ARQ se ha evaluado la posibilidad de reacciones cruzadas con parásitos de géneros relevantes como *Sarcocystis spp.*, *Neospora spp.*, *Plasmodium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Candida spp.*, y *Cryptococcus spp.*, a diferencia de los estudios con qPCR en el gen B1 (17). Las combinaciones actuales de ARQ que utilizan AR como AMA1, SAG1 y MIC2, proteínas

conservadas en el phylum Apicomplexa, tienen alta posibilidad de reacciones cruzadas (27-29).

II. Problema de investigación:

Los estudios más recientes sobre el diagnóstico serológico de toxoplasmosis en humanos utilizando ARQ muestran resultados prometedores, sin embargo, estos antígenos aún no pueden sustituir a los kits de diagnóstico comerciales basados en TLA. Muchos ARQ sintetizados han conseguido tener una alta sensibilidad y especificidad para anticuerpos IgG, pero su capacidad de diferenciar sueros de pacientes en fase crónica o fase aguda es limitada (20). Esto se debe a que no se conoce una combinación de antígenos que sean específicos de la fase aguda de toxoplasmosis. Además, proteínas recombinantes que han mostrado ser marcadores de fase aguda en forma individual, pierden esta capacidad al usarse en combinación con otros. Por ejemplo, los AR, ROP1 y MAG1 muestran sensibilidad de 94.6% y 97.3%, respectivamente, para sueros de pacientes en fase aguda; y un 15.5% y 7.5% para sueros de pacientes en fase crónica. Pero la sensibilidad del ARQ MAG1-ROP1 para sueros en fase aguda es de 86.4% y para aquellos en fase crónica es de 32.8% (30,31).

Los antígenos utilizados para un parásito pueden dar reacciones cruzadas con anticuerpos para otros parásitos con proteínas similares, resultando en falsos positivos (29). En casos de parasitosis de animales, se ha visto en múltiples ocasiones las reacciones cruzadas entre pruebas con TLA y los géneros *Hammondia spp.* y *Neospora spp.* (29). También se han observado anticuerpos monoclonales de *T. gondii* reaccionar de manera fuerte y específica a antígenos de superficie en *Pneumocystis carini* (32). En perros, la presencia de *T. gondii* ha ocasionado reacciones cruzadas en pruebas para *Leishmania infantum chagasis* (33). En

humanos, se vio reacciones cruzadas de individuos con toxoplasmosis en la prueba IFAT con antígenos para *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria (34).

Si bien se ha mejorado el diagnóstico por ARQ, hay poca información sobre potenciales reacciones cruzadas con anticuerpos de proteínas homólogas a *T. gondii* de otros parásitos, sobre todo aquellos que infectan a humanos. Por este motivo, el uso del ARQ más eficaz actualmente (AMA1-SAG2-GRA1-ROP1) en zonas con alta prevalencia de otras parasitosis, puede resultar en una baja especificidad. AMA1 es una proteína homóloga entre *T. gondii* y el género *Plasmodium*, localizada en los micronemas de parásitos intracelulares en desarrollo o en la superficie apical de parásitos extracelulares previo a invasión, y es conservada en el phylum Apicomplexa (27). Además, el antígeno MIC2, usado también en ARQ, es parte de la familia de adhesinas conservadas TRAP (Por sus siglas en inglés, Thrombospondin-related anonymous proteins), común para Apicomplexa (28).

Las reacciones cruzadas con el género *Plasmodium spp.* son de gran importancia, ya que los parásitos de este género tienen una mayor prevalencia en zonas rurales y subrurales de la Amazonía, donde también hay alta incidencia de infección por el VIH y, por lo tanto, riesgo de toxoplasmosis encefálica (6,7). Además, se ha visto que estos parásitos coexisten en la región de Iquitos (15,16,26). Debido a esto, nuevos ARQ deben evitar la posibilidad de reacciones cruzadas con especies de *Plasmodium* si se pretende que sean funcionales para el diagnóstico serológico de toxoplasmosis en estas áreas, además de cumplir con los requisitos de alta sensibilidad y especificidad, y la capacidad de diferenciar fase aguda de fase crónica.

Algunos AR candidatos son aquellos con epitopes caracterizados (sintetizados anteriormente en ARQ), altamente inmunogénicos, inductor de respuesta inmune durante la fase aguda,

poca similitud con antígenos de otros parásitos y alta sensibilidad individual o en combinación. Aquellos AR utilizados en el ARQ AMA1-SAG2-GRA1-ROP1 son buenos candidatos, debido a que este ha presentado los mejores resultados al diferenciar la fase aguda de la fase crónica, utilizando la técnica de avidéz de IgG. Sin embargo, AMA1 puede ocasionar una reacción cruzada con parásitos del género *Plasmodium* (27). El ARQ tetravalente AMA1-SAG2-GRA1-ROP1 se sintetizó al unir las secuencias del ARQ trivalente SAG2-GRA1-ROP1 y el AR AMA1 (24,25). Por lo tanto, es posible intercambiar a AMA1 en esta combinación por algún AR más específico de *T.gondii* para sintetizar un nuevo ARQ tetravalente. El AR de granulos densos GRA8 (P35) es un candidato para este intercambio, debido a que es el único en cumplir con los criterios mencionados previamente. Primero, tiene epitopes caracterizados, el fragmento de nucleotidos 74 al 435 del gen de GRA8, residuos de aminoácido del 26 al 170, ha sido sintetizado individualmente y en el ARQ P35-MAG1 (22,30). Segundo, es altamente inmunogénico, porque las proteínas de gránulos densos son secretadas en abundancia en las primeras horas de infección causando una fuerte respuesta de los anticuerpos (20,35). Tercero, es característico de la fase aguda, ya que este tipo de proteínas contribuye a la biogénesis y maduración de la vacuola parasitófora donde se replica el taquizoito (36); para GRA8 en particular existe un consenso sobre su efectividad para poder identificar la fase aguda (35). Cuarto, este AR no presenta homología con parásitos presentes en humanos, mostró homología con un antígeno de *Hammondia hammondi*, sin embargo este parásito no infecta a humanos (37). Finalmente, ha mostrado tener alta sensibilidad y especificidad en pruebas serológicas individualmente o en combinación (20).

El objetivo del presente estudio es evaluar a GRA8 en combinación con SAG2-GRA1-ROP1, en un nuevo ARQ tetravalente, en su capacidad de diferenciar la fase aguda de toxoplasmosis de la crónica y probar su capacidad para evitar reacciones cruzadas con antígenos del género *Plasmodium*, en zonas endémicas a Malaria.

III. Estrategia de abordaje

Se utilizarán los AR GRA8, SAG2, GRA1 y ROP1 en dos combinaciones para crear los siguientes ARQ: SAG2-GRA1-ROP1-P35 y P35-SAG2-GRA1-ROP1. Para ello, se clonarán las secuencias de los genes de los AR en un vector adecuado, se transformará una cepa de *Escherichia coli* con dicho vector, se inducirá la expresión de los ARQ, se purificarán dichos ARQ y se medirá la concentración obtenida. Luego, se evaluará la utilidad de ambos ARQ en tres pruebas serológicas para detectar anticuerpos IgG e IgM y la avididad de IgG en sueros de pacientes de un hospital de Iquitos. Finalmente, se verificará si estas tres pruebas tienen reacciones cruzadas con sueros provenientes de pacientes que padecen Malaria.

3.1 Elaboración del antígeno recombinante quimérico (ARQ)

Con el objetivo de sintetizar un ARQ tetravalente que contenga el AR GRA8 (P35), se utilizará el plásmido pUETDp35, el cual contiene la secuencia truncada de P35 (aminoácidos del 26 al 170) (22). Esta secuencia se amplificará mediante PCR y el producto se clonará en el plásmido pET30/SAG2-GRA1-ROP1, el cual se utilizó para sintetizar el ARQ SAG2-GRA1-ROP1 (24) y eventualmente el AMA1-SAG2-GRA1-ROP1 (25). Para que P35 esté directamente después de la secuencia de ROP1, el producto del PCR deberá insertarse entre los sitios de restricción EcoRI y EcoRV de pET30/SAG2-GRA1-ROP1. Para que P35 se encuentre antes de la secuencia de SAG2, el producto del PCR deberá insertarse en el sitio

BglIII del plásmido pET30/SAG2-GRA1-ROP1. Los plásmidos resultantes contendrán genes fusionados de cuatro antígenos de *T. gondii*, estos se encontrarán flanqueados por dominios His6-tag (25) para posterior purificación. La composición de aminoácidos de los dos ARQ resultantes sería: 31aa – 170aa para SAG2, 26aa - 190aa para GRA1, 85aa – 396aa para ROP1 y 26aa – 170aa para P35.

Se transformará la cepa de *Escherichia coli* Rosetta(DE3)pLacI con pET30/SAG2-GRA1-ROP1-P35 o pET30/P35-SAG2-GRA1-ROP1. Crecerán en medio TB suplementado con 20 ug/ml de kanamicina y 34ug/ml de cloramfenicol de un día a otro a 23°C. Luego, en 1000ml de medio TB, suplementado por los mismos antibióticos, se inocularán 20ml del cultivo anterior. Los nuevos cultivos crecerán con agitación vigorosa a 23 °C a la densidad óptica 0.4 a $\lambda = 600$ nm(OD600) (25). Se inducirá la expresión de proteína mediante IPTG a concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 1.5mM para se verificar a que concentración se obtiene el mejor rendimiento. Se utiliza IPTG debido a que el plásmido utilizado contiene el mecanismo de inducción de expresión del operon lac (con el promotor T7) (25). Luego, la bacteria recombinante se incubará con agitación vigorosa por 18 horas a 23°C (25). Se cosecharán las células por centrifugación, los pellets se resuspenderán a 30ml de buffer (20 mM Tris–HCl pH 7.9, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 0.1 % Triton X-100) (24). Las células serán sonicadas y se removerá el residuo insoluble por centrifugación. Se purificará la proteína del sobrenadante usando una columna de Ni²⁺- ácido iminodiacético-Sepharosa de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Novagen, Madison, WI, USA) (24).

Los ARQ obtenidos serán analizados por SDS-PAGE en geles de acrilamida al 10% y teñidos con Azul de Coomassie (24). Se determinará la concentración de las proteínas purificadas mediante el método de Bradford usando albumina de suero bovino como estándar (24).

3.2 Evaluación de la sensibilidad y especificidad de los ARQ:

Para evaluar la utilidad de ambos ARQ en pruebas serológicas, se utilizarán 400 muestras de suero provenientes de pacientes del hospital “Cesar Garayar García” en Iquitos y se separarán en cuatro grupos. El grupo I, 100 muestras de pacientes con el VIH positivo con toxoplasmosis aguda, IgM e IgG positivo (VIDAS[®] TOXO IgM y VIDAS[®] TOXO IgG II), baja avidéz de IgG (VIDAS[®] TOXO IgG avidity) (25), signo de diana excéntrico en tomografía cerebral (13) y qPCR de líquido cefalorraquídeo positivo (15,18). El grupo II, 100 muestras de pacientes con toxoplasmosis crónica, IgG positivo (VIDAS[®] TOXO IgM y VIDAS[®] TOXO IgG II) y alta avidéz de IgG (VIDAS[®] TOXO IgG avidity) (25). El grupo III, 100 muestras de pacientes con malaria confirmada en muestras de sangre por gota gruesa y frotis (38). Finalmente, el grupo IV, 100 muestras de pacientes sanos, negativo a las pruebas serológicas de toxoplasmosis (VIDAS[®] TOXO IgM, VIDAS[®] TOXO IgG II y VIDAS[®] TOXO IgG avidity) y a la prueba de Malaria. Cabe resaltar que se confirmará que el grupo I y II (pacientes con toxoplasmosis) no tengan malaria. De la misma manera, el grupo III debe estar libre de toxoplasmosis. El grupo I es el único con pacientes con el VIH, debido a que los síntomas que presentan y su diagnóstico confirman que todos los sueros en este grupo provienen de individuos con infección aguda.

Se realizarán pruebas IgM ELISA, IgG ELISA y avidéz de IgG, para los grupos I, II y III, utilizando los dos ARQ. Luego, se obtendrá la sensibilidad y especificidad de cada uno para

cada prueba mediante la determinación de puntos de corte por curvas ROC (25). Finalmente, se comprobará posibles reacciones cruzadas al verificar cuantos sueros del grupo IV reaccionan frente a las tres pruebas mencionadas anteriormente.

IV.Referencias Bibliográficas:

1. Dubey JP. The History and Life Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Toxoplasma Gondii*. Elsevier. Second edition. 2014. p. 1–17.
2. Black MW, Boothroyd JC. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2000;64(3):607–23.
3. Tenter AM, Heckeroth AR y Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol*, 2000; 30(12-13):1217-58.
4. Pappas G, Roussos N, Falagas ME. *Toxoplasmosis snapshots : Global status of Toxoplasma gondii seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis*. *Int J Parasitol*. 2009;39:1385–94.
5. Robert-Gangneux F, Dardé M-L. *Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis*. *Clinic Microbiol Rev*. 2012;25(2): 264-96.
6. Organización Mundial de la Salud. *World malaria report 2018*. Ginebra; 2018. 165 p.
7. Desai N, Sarkar R, Kang G. *Cryptosporidiosis: An under-recognized public health problem*. *Trop Parasitol*. 2012;2(2):91-98.
8. Lindsay DS, Dubey JP, Blagburn BL. *Biology of Isospora spp. from humans, nonhuman primates, and domestic animals*. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10(1):19–34.

9. Chacin-Bonilla L. Cyclospora Cayetanensis. En: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, editores. Global Water Pathogen Project. 2017. p 36.
10. Wang ZD, Liu HH, Ma ZX, Ma HY, Li ZY, Yang ZB, et al. *Toxoplasma gondii* Infection in Immunocompromised Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol.* 2017;8(389):1-12.
11. Mcauley JB. Congenital Toxoplasmosis. *Journ Pediat Infect Dis Soc.* 2014;3(1): 30-35
12. Rostami A, Karanis P, Fallahi S. Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection.* 2018;46(3):303–15.
13. Páez LA, Araque JM, Lozano AJ. Neuroimagen de la toxoplasmosis en el paciente con Sida. *Revist Facult Med Univ Nacion Colomb.* 2001;49(1):270–5.
14. Malinger G, Werner H, Leonel JCR, Rebolledo M, Duque M, Mizyrycki S, et al. Prenatal brain imaging in congenital toxoplasmosis. *Prenat Diagn.* 2011;31:881–6.
15. Vidal JE, Colombo FA, Penalva de Oliveria AC, Focaccia R, Pereira-Chiocola VL. PCR Assay Using Cerebrospinal Fluid for Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in Brazilian AIDS patients. *Clin Microbiol.* 2004;42(10):4765-8.
16. Colombo FA, Vidal JE, Penalva de Oliveria AC, Hernandez AV, Bonasser-Filho F, Nogueira RS. Diagnosis of Cerebral Toxoplasmosis in AIDS Patients in Brazil: Importance of Molecular and Immunological Methods Using Peripheral Blood Samples. *Clin Microbiol.* 2005;43(10):5044-7.
17. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al.

- Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *J Clin Microbiol.* 2002;40(12):4499–503.
18. Gutierrez-Loli R, Ferradas C, Diestra A, Traianou A, Bowman N, Bok J, et al. Development of a novel protocol based on blood clot to improve the sensitivity of qPCR detection of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood specimens. *Am J Trop Med Hyg.* 2019;100(1):83–9.
 19. Seeds JW. Diagnostic mid trimester amniocentesis : How safe ?. *Americ Journ Obstet Gynecol.* 2004;191:608–16.
 20. Holec-Ga L. *Toxoplasma gondii* Recombinant Antigens as Tools for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis: Current Status of Studies. *Clinic Vaccin Immunol.* 2013;20(9):1343-51.
 21. Zhang K, Lin G, Han Y, Li J. Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. *Clin Chim Acta.* 2016;461:83–9.
 22. Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Pietkiewicz H, Holec L, Gasior A, Myjak P. Efficient production of the *Toxoplasma gondii* GRA6, p35 and SAG2 recombinant antigens and their applications in the serodiagnosis of toxoplasmosis. *Acta Parasitologica.* 2005;50(3):249-54.
 23. Pietkiewicz H, Hiszczyńska-Sawicka E, Kur J, Petersen E, Nielsen HV, Stankiewicz M, et al. Usefulness of *Toxoplasma gondii*-Specific Recombinant Antigens in Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 2004;42(4):1779-81.

24. Ferra B, Holec-Gąsior L, Kur J. A new *Toxoplasma gondii* chimeric antigen containing fragments of SAG2, GRA1, and ROP1 proteins—impact of immunodominant sequences size on its diagnostic usefulness. *Parasitol Res.* 2015;114(9):3291–9.
25. Ferra B, Holec-Gąsior L, Gatkowska J, Dziadek B, Dzitko K, Grąźlewska W, et al. The first study on the usefulness of recombinant tetravalent chimeric proteins containing fragments of SAG2, GRA1, ROP1 and AMA1 antigens in the detection of specific anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in mouse and human sera. *PLoS One.* 2019;14(6):1–23.
26. Cubillas R, Maguiña C, Saona P, Chinga E, Llanos F. Prevalencia de anticuerpos anti-*toxoplasma gondii* en gestantes del Hospital Cayetano Heredia (Lima). *Boletín la Soc Peru Med Interna.* 2000;13(3):1–13.
27. Zhang H, Compaore MKA, Lee E goo, Liao M, Zhang G, Sugimoto C, et al. Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and the anti-NcAMA1 antibody inhibits host cell invasion by both parasites. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;151(2):205–12.
28. Huynh M-H, Carruthers VB. *Toxoplasma* MIC2 is a major determinant of invasion and virulence. *PLoS Pathog.* 2006;2(8):753–62.
29. Gondim LFP, Mineo JR, Schares G. Importance of serological cross-reactivity among *Toxoplasma gondii*, *Hammondia* spp., *Neospora* spp., *Sarcocystis* spp. and *Besnoitia besnoiti*. *Parasitology.* 2017;144(7):851–68.

30. Drapała D, Holec-Gasior L, Kur J. New recombinant chimeric antigens, P35-MAG1, MIC1-ROP1, and MAG1-ROP1, for the serodiagnosis of human toxoplasmosis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(1):34–9.
31. Holec-Gasior L, Kur J, Hiszczyńska-Sawicka E. GRA2 and ROP1 recombinant antigens as potential markers for detection of toxoplasma gondii-specific immunoglobulin G in humans with acute toxoplasmosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(4):510–4.
32. Hassl A, Muller WA, Aspöck H. An identical epitope in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* causing serological cross reactions. *Parasitol Res.* 1991;77:351-52
33. Zanette MF, de Lima VMF, Laurenti MD, Rossi CN, Vides JP, Vieira RF da C, et al. Serological cross-reactivity of Trypanosoma cruzi, Ehrlichia canis, Toxoplasma gondii, Neospora caninum and Babesia canis to Leishmania infantum chagasi tests in dogs. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;47(1):105–7.
34. Abramo C, Fontes CJF, Krettli AU. Cross-reactivity between antibodies in the sera of individuals with leishmaniasis, toxoplasmosis, and Chagas' disease and antigens of the blood- stage forms of Plasmodium falciparum determined by indirect immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg.* 1995;53(2):202–5.
35. Babaie J, Miri M, Sadeghiani G, Zare M, Khalili G, Golkar M. Expression and Single-step Purification of GRA8 Antigen of Toxoplasma gondii in Escherichia

coli. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2011;3(2):67-77.

36. Kim Y-R, Kim J-S, Yun J-S, Kim S, Kim SY, Jang K, et al. *Toxoplasma gondii* GRA8 induces ATP5A1–SIRT3-mediated mitochondrial metabolic resuscitation: a potential therapy for sepsis. *Exp Mol Med*. 2018;50(464):1-11.
37. Simon L, Fillaux J, Guigon A, Lavergne R-A, Villard O, Villena I, et al. Serological diagnosis of *Toxoplasma gondii*: analysis of false-positive IgG results and implications. *Parasite*. 2020; 27(7):1-9.
38. Berzosa P, de Lucio A, Romay-Barja M, Herrador Z, González V, García L, et al. Comparison of three diagnostic methods (microscopy, RDT, and PCR) for the detection of malaria parasites in representative samples from Equatorial Guinea. *Malaria Journal*. 2018;17(1):1-12

V. Anexos:

Tabla 1. Antígenos recombinantes más relevantes.

Antígeno	Resultado en IgG ELISA	Número de muestras y fase de toxoplasmosis
GRA6	Sensibilidad para fase aguda 93.9% Sensibilidad para fase crónica 63.1%	90 total, 33 agudo, 57 crónico
GRA8	Sensibilidad para fase aguda 85.3% Sensibilidad para fase crónica 8%	91 total, 41 agudo, 50 crónico
GRA4	Sensibilidad para fase aguda 58.3% Sensibilidad para fase crónica 18.2%	36 total, 12 agudo, 22 crónico

GRA7	Sensibilidad para fase aguda 75% Sensibilidad para fase crónica 36.3%	36 total, 12 agudo, 22 crónico
MAG1	Sensibilidad para fase aguda 97.3% Sensibilidad para fase crónica 7.5%	117 total, 37 agudo, 80 crónico
ROP1	Sensibilidad para fase aguda 94.6% Sensibilidad para fase crónica 15.5%	127 total, 37 agudo, 90 crónico

Fuente: Holec-Ga L. 2013 (22)

Tabla 2. Combinaciones de antígenos recombinantes.

Antígenos	Resultado en IgG ELISA	Número de muestras y fase de toxoplasmosis
GRA7, GRA8, SAG1	Sensibilidad 98.4% Especificidad 95.7%	247 total, 88 agudo, 92 crónico y 53 seroconvertidos*
GRA7, GRA8, SAG2, P25	Sensibilidad fase aguda 90% Sensibilidad fase crónica 1.4% Especificidad fase aguda 97%	90 total, 20 agudo, 70 crónico
GRA1, GRA7, SAG1	Sensibilidad fase aguda 100% Sensibilidad fase crónica 91.1%	241 total, 117 agudo, 124 crónico
GRA6, GRA8, SAG2	Sensibilidad 88.9% Especificidad 100%	72 crónico
MAG1, SAG1, GRA5	Sensibilidad 92.6% Especificidad 100%	189 total, 27 agudo, 18 post agudo, 144 crónico

Fuente: Holec-Ga L. 2013 (22) * Aparición de anticuerpos (en este caso para TG) en una segunda muestra de suero de una persona en un intervalo de tiempo corto de tomada la primera muestra

Tabla 3. Antígenos recombinantes quiméricos.

Antígenos	Resultado ELISA IgG	Número de muestras y fase de toxoplasmosis
Gst-EC2	Sensibilidad 100% Especificidad 100%	100 sueros de adultos con Toxoplasmosis confirmada
Gst-EC3	Sensibilidad 100% Especificidad 100%	100 sueros de adultos con Toxoplasmosis confirmada
MIC1-MAG1-SAG1	Sensibilidad fase aguda 100% Sensibilidad fase crónica 96.9%	162 total, 47 agudo, 19 postagudo, 96 crónico
AMA1-SAG2- GRA1-ROP1	Sensibilidad 100% Especificidad 100% fase aguda (IgG avidéz)	329 total, 64 agudo, 128 crónico

Fuente: Holec-Ga L. 2013 (22)