

UNIVERSIDAD NACIONAL
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO REGIONAL EN CIENCIAS VETERINARIAS TROPICALES



Desarrollo de una técnica inmunoenzimática para el diagnóstico de anticuerpos contra *Paragonimus mexicanus*

Luana Gabriele Andrade Gomes

Universidad Nacional, Heredia, 17 de abril de 2020

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador del Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales, Maestría en Enfermedades Tropicales para optar al grado *Magister Scientae*

Miembros del Tribunal Examinador

[Dr. Francisco San Lee Campos]

Representante del Consejo Central de Posgrado

[M.Sc. Sandra Estrada]

Coordinador del posgrado o su representante

[PhD. Gaby Dolz Wiedner]

Tutor de tesis

[PhD. Frank Solano Campos]

Miembro del Comité Asesor

[PhD. Ana Jiménez Rocha]

Miembro del Comité Asesor

[Luana Gabriele Andrade Gomes]

Sustentante

Resumen general

La paragonimiasis es una zoonosis parasitaria transmitida por alimentos que se considera desatendida y subdiagnosticada en Costa Rica. Debido a que no se encuentra disponible una prueba diagnóstica inmunológica, el objetivo del presente estudio fue producir y caracterizar diferentes proteínas recombinantes de *Paragonimus westermani* para posteriormente utilizarlas en pruebas inmunoenzimáticas. Inicialmente se expresaron y purificaron las cisteína proteasas recombinantes de *P. westermani* CP4, CP7 y CP9, las cuales se evaluaron mediante la técnica de inmunoblot con sueros de ratas positivas y negativas a *Paragonimus mexicanus* y con sueros humanos positivos a *P. westermani*, *P. mexicanus*, fascioliasis, esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, toxocariasis, leishmaniosis, esparganosis, amebiasis y sueros humanos negativos a parasitosis. La cisteína proteasa CP7 fue el antígeno que mostró más especificidad, puesto que detectó los sueros positivos a *Paragonimus* spp., pero no reaccionó con los sueros negativos, y solamente presentó reacción cruzada con sueros de pacientes con fascioliasis, toxocariasis y esparganosis; mientras que los otros dos antígenos presentaron más reacciones cruzadas con otras parasitosis. Seguidamente, se utilizó el antígeno CP7 de *P. westermani* en la estandarización de la técnica inmunoenzimática de ELISA para detectar anticuerpos contra *Paragonimus* spp. Una vez estandarizada la técnica se analizaron sueros humanos positivos a *P. westermani*, sueros humanos positivos a *P. mexicanus* y sueros humanos infectados con otras helmintiasis, y sueros de pacientes sin parasitosis. La sensibilidad y especificidad del ELISA estandarizado fue de 71.4 % y 100.0%, respectivamente, y el valor predictivo positivo y negativo de 100.0% y 77.8 %. Este representa el primer reporte de la estandarización de un ELISA para el diagnóstico de *Paragonimus* spp. en Costa Rica y Centroamérica. Se recomienda evaluar el desempeño de un antígeno recombinante de *P. mexicanus* para utilizar en este ELISA.

Palabras clave:

Cisteína proteasa, antígeno recombinante, inmunoblot, ELISA, sensibilidad, especificidad, valor predictivo.

Agradecimientos

A Dios por darme el don de la vida, además de salud, perseverancia y valor para avanzar profesionalmente y también personalmente.

A mi tutora la Dra. Gaby Dolz por brindarme su conocimiento, paciencia, tiempo, asesoramiento, y apoyo para la realización de este trabajo. Gracias por la motivación, por los consejos y por transmitirme su entusiasmo y pasión por la investigación.

A mi lector Dr. Frank Solano por abrirme las puertas de su laboratorio y recibirme con tanta atención y aprecio, también agradezco por todos los consejos, asesoramiento, pasión, dedicación y apoyo incondicional para la realización del presente estudio.

A mi lectora Dra. Ana Jiménez por brindarme conocimiento, tiempo, asesoramiento y apoyo incondicional para la realización del presente estudio. Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y recibirme con mucha atención.

Al Posgrado Regional en Ciencias Veterinarias Tropicales por la oportunidad de crecimiento profesional que me ha brindado.

Al Dr. Javier Alvarado por brindarme conocimiento, atención, tiempo, motivación, consejos, además de abrirme las puertas de su laboratorio y recibirme con mucha atención.

A Mauricio Andino, Daisy Fallas y Marta Bonilla por su valiosa amistad y por el apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Sugiyama Hiramuro por venir desde Japón a compartir sus conocimientos, además de brindarme los sueros para el presente estudio. Muchas gracias por su precioso aporte.

Al Dr. Bernal León por sus consejos para implementar la técnica inmunoenzimática.

Al Lic. Randall Rubí por su ayuda en la inoculación de las ratas.

Al Dr. Roderico Hernández Chea por brindarme conocimiento, consejos, tiempo y apoyo para la realización del presente estudio.

Dedicatoria

A Dios:

Por estar siempre conmigo.

A mi esposo:

Víctor Julio Arias Fernández por brindarme mucho amor, mucha comprensión, motivación y apoyo incondicional.

A mis padres:

Erivete Andrade Gomes y Marcos Antonio Gomes por brindarme mucho amor, una buena educación, además de enseñarme buenos valores.

A Gaby Dolz:

Por motivarme.

ÍNDICE

Resumen general	III
Agradecimientos	IV
Dedicatoria.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
Introducción General	IX
Referencias Bibliográficas	XV
ARTÍCULO 1.....	1
Resumen	1
Abstract	1
1. Introducción.....	2
2. Materiales y métodos	4
2.1- Diseño del estudio	4
2.2- Sueros a analizar.....	4
2.2.1 Sueros controles positivos	4
2.2.2 Sueros controles negativos	4
2.3 Obtención de las cisteínas proteasas recombinantes (CP4, CP7 y CP9) de <i>P. westermani</i>	5
2.3.1 Procedimiento de preparación de los plásmidos.....	5
2.3.2 Expresión de las proteínas de interes en <i>E. coli</i> BL21	5
2.3.3 Extracción de las proteínas producidas y evaluación de solubilidad	6
2.3.4 Solubilización de las proteínas presentes en cuerpos de inclusión.....	6
2.3.5 Purificación de las proteínas solubles.....	7
2.4 Análisis cualitativo y cuantitativo de los antígenos recombinantes purificados ..	7
2.5. Implementación del inmunoblot utilizando los antígenos purificados.....	7
2.5.1 Inmunoblot con anticuerpo anti-His	8
2.5.2 Inmunoblot con sueros de ratas	8
2.5.3 Inmunoblot con sueros humanos.....	9
3. Resultados.....	9
4. Discusión	15
5. Conclusiones	18

6. Recomendaciones.....	18
7. Referencias bibliográficas	18
ARTÍCULO 2.....	22
Resumen	22
Abstract	22
1. Introducción	23
2. Materiales y métodos	26
2.1 Obtención y cuantificación de la CP7 de <i>P. westermani</i>	26
2.2. Uso de la proteína recombinante CP7 como antígeno en un ELISA indirecto	28
2.2.1. Sueros analizados	28
2.2.2. Estandarización del ELISA	28
3. Resultados.....	29
4. Discusión.....	36
5. Conclusiones.....	38
6. Recomendaciones.....	39
7. Referencias Bibliográficas	39
Discusión general	43
Conclusiones generales.....	44
Recomendaciones generales	44

ÍNDICE DE FIGURAS

ARTÍCULO 1

Figura 1. SDS-PAGE de la fracción soluble de proteínas recombinantes.	10
Figura 2. SDS-PAGE para el análisis de la purificación de la proteína recombinante CP4, CP7 y CP9 mediante cromatografía de afinidad.	11
Figura 3. Reacciones de las proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 de <i>P. westermani</i> con el anticuerpo anti-His en inmunoblot.....	13
Figura 4. Reacciones de las proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 de <i>P. westermani</i> con sueros de ratas en inmunoblot.....	14
Figura 5. Reacciones de las proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 de <i>P. westermani</i> con sueros humanos controles positivos y negativos en inmunoblot.....	15

ARTÍCULO 2

Figura 1. SDS-PAGE para el análisis de la purificación de la proteína recombinante CP7 mediante cromatografía de afinidad..	30
Figura 2. Resultados del ELISA utilizando diferentes soluciones.....	30
Figura 3. Resultados del ELISA utilizando diferentes concentraciones del antígeno CP7 en PBS.....	31
Figura 4. Resultados del ELISA utilizando diferentes soluciones bloqueadoras al 10% en PBS	32
Figura 5. Resultados del ELISA utilizando diferentes diluciones de los sueros.	33
Figura 6. Resultados del ELISA utilizando diferentes diluciones del conjugado.	33
Figura 7. Resultados de los sueros analizados en el ELISA	36

ÍNDICE DE CUADROS

ARTÍCULO 1

Cuadro 1. Cantidad de proteína CP4, CP7 y CP9 obtenidas en las diferentes eluciones (E1 a E4) de la cromatografía de afinidad.....	12
--	----

ARTÍCULO 2

Cuadro 1. UE, media, desviación, punto de corte, y resultado determinado con los sueros negativos analizados en ELISA.....	35
Cuadro 2. UE y resultado determinado con los sueros positivos analizados en ELISA.....	35

Introducción General

***Paragonimus* y paragonimiasis**

La paragonimiasis es una enfermedad causada por especies del tremátodo *Paragonimus* (Vargas-Arzola *et al.*, 2014; Kwon *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2016) una zoonosis parasitaria alimentaria importante (Singh *et al.*, 2012; Kalhan *et al.*, 2015), sin embargo, desatendida (Morter *et al.*, 2018). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2010 existieron al menos 139 mil casos de paragonimiasis y 250 muertes, causando un estimado de 1 millón de años de vida ajustados por discapacidad a nivel mundial (Torgerson *et al.*, 2015).

Se han descrito más de 50 especies de *Paragonimus*, 15 de las cuales son reconocidas por ocasionar infecciones en humanos (Li *et al.*, 2016). Entre éstas se destacan en Asia: *Paragonimus miyazakii*, *Paragonimus heterotremus*, *Paragonimus skrjabini*, *Paragonimus ohirai* y *Paragonimus westermani* (el responsable de la mayoría de los casos de paragonimiasis en Asia) (Diaz, 2013; Acha y Szyfres, 2003; Luo *et al.*, 2016); en Africa: *Paragonimus africanus* y *Paragonimus uterobilateralis* (Blair *et al.*, 2016; Morter *et al.*, 2018); y en América: *Paragonimus kelikotti* y *Paragonimus mexicanus* (Ahn *et al.*, 2015). Recientemente se ha reportado una tercera especie en América, precisamente en Costa Rica, *Paragonimus caliensis* (Hernández-Chea *et al.*, 2017).

Ciclo de vida de *P. mexicanus*

P. mexicanus utiliza dos hospedadores intermediarios y completa su ciclo de vida en los hospedadores definitivos, mamíferos, particularmente carnívoros silvestres (felinos, mapaches, cánidos salvajes) y marsupiales (zorros y zarigüeyas), pero también carnívoros domésticos (gatos y perros) (Brenes *et al.*, 1980; Lopez-Caballero *et al.*, 2013; Blair, 2014; García-Márquez, 2010).

Aunque algunos autores consideran también al hombre como hospedador definitivo en el ciclo de *P. mexicanus* (Chai, 2013), porque se ha reportado el desarrollo y reproducción de los parásitos en los pulmones (Procop, 2009), éstos se consideran hospedadores accidentales, no siendo esenciales para la sobrevivencia de *P. mexicanus*, ya que el ciclo lo mantienen los hospedadores animales, y el parásito. Al estar poco adaptado al hospedador humano, en la mayoría de las

ocasiones produce un parasitismo errático (Calvopiña *et al.*, 2018; Monge *et al.*, 1985; Vélez *et al.*, 2000; Procop 2009; Henry *et al.*, 2012). En el hospedador definitivo los gusanos adultos normalmente se encuentran encapsulados en los pulmones o en la superficie pleural, y menos frecuentemente en otros órganos (Liu *et al.*, 2008). Los parásitos son hermafroditas, y por fertilización cruzada de las parejas de parásitos enquistadas en pulmón o pleura se da la producción de huevos, que se liberan en los bronquiolos con la tos, o se mezclan con esputo y son tragados hasta su posterior liberación en heces (Acha y Szyfres, 2003; Diaz, 2013).

En el agua los huevos se convierten en miracidios y estos penetran en el caracol (primer hospedador intermedio) (Roy *et al.*, 2015). En Costa Rica el primer hospedador intermediario es *Aroapyrgus costaricensis* (Brenes *et al.*, 1980). En el caracol, el miracidio se convierte en esporocisto maduro, el cual produce asexualmente la primera generación de redias, dentro de las cuales se desarrolla la segunda generación, la que produce la cercaria, la cual abandona el caracol e infecta los cangrejos de agua dulce (segundo hospedador intermedio) del género *Pseudothelphusa*, *Ptychophallus*, *Potamocarcinum* y *Hypolobocerca* (Bowman *et al.*, 2002; Chai, 2013, García-Márquez, 2010). El cangrejo se infecta de dos formas: por consumo del caracol infectado, o por penetración activa de la cercaria. Una vez que la cercaria se ubica en sitios específicos en el cangrejo (músculos, branquias y hepatopáncreas) se convierte en metacercaria (Acha y Szyfres, 2003). Los mamíferos, incluyendo humanos, se infectan al ingerir crustáceos de agua dulce crudos o semi-crudos conteniendo metacercarias infecciosas (Vélez *et al.*, 2003; Procop, 2009; Lopez-Caballero *et al.*, 2013).

En el humano, las metacercarias ingeridas llegan al intestino, atraviesan el diafragma, llegando a la cavidad pleural y eventualmente a los pulmones donde maduran y pueden vivir durante años, o también pueden migrar a diferentes tejidos, incluyendo el sistema nervioso central (Li *et al.*, 2016), lo que es muy frecuente en infecciones por *P. mexicanus* (Chai, 2013).

Presentaciones clínicas de la enfermedad

La paragonimiasis se clasifica clínicamente en pleuropulmonar o pulmonar y en extrapulmonar o ectópica (Kalhan *et al.*, 2015). La paragonimiasis pleuropulmonar ocurre generalmente cuando son afectados el parénquima pulmonar y la pleura

(Singh *et al.*, 2012). La paragonimiasis pulmonar es la forma típica, adonde los gusanos adultos habitan en quistes fibrosos pulmonares (Blair *et al.*, 2016). Las manifestaciones clínicas son tos crónica productiva, hemoptisis y dolor en el pecho, por lo que a menudo es diagnosticada erróneamente como tuberculosis pulmonar (Kalhan *et al.*, 2015).

La paragonimiasis extrapulmonar o ectópica ocurre cuando se da una migración anómala de los parásitos juveniles a sitios extrapulmonares (Chai, 2013, Chen *et al.*, 2013; Amaro *et al.*, 2016), causando daño a los músculos, y órganos, incluyendo el cerebro (Friant *et al.*, 2015). Los factores que contribuyen a la migración errática se deben a una infección masiva (Procop, 2009, Singh *et al.*, 2012), disminución del estatus inmune del hospedador, o adaptación del parásito al hospedador (Singh *et al.*, 2012). En Latinoamérica se han reportado casos ectópicos en cerebro, hígado, tejido cercano a la vejiga, y en tejidos subcutáneos (Acha y Szyfres, 2003). Las formas juveniles y adultas del gusano pueden llegar al sistema nervioso central causando la neuro paragonimiasis (McNulty *et al.*, 2014). La paragonimiasis cerebral es la migración errática más seria y en ocasiones fatal. Los síntomas van a depender del área del cerebro afectado y del número de parásitos (Yi *et al.*, 2014). La paragonimiasis cerebral ocasiona hemorragia cerebral particularmente en niños o adolescentes (Xia *et al.*, 2014). Los pacientes presentan dolor de cabeza, convulsiones, hemiparesia, hipostesia, visión borrosa y síntomas meníngeos (Zeng *et al.*, 2016; Amaro *et al.*, 2016). Clínicamente el cerebro es el sitio de localización ectópica más común ocurriendo en un 20 a 45% de los pacientes con paragonimiasis errática (Yi *et al.*, 2014). La paragonimiasis extra-pulmonar del tipo cerebral es más común en niños que en adultos (Zeng *et al.*, 2016) y más común en hombres que en mujeres (Chai, 2013).

Diagnóstico

La paragonimiasis pulmonar se diagnostica por observación microscópica de huevos (no embrionados y operculados con paredes gruesas) en esputo o en heces (Calvopiña *et al.*, 2014; Roy *et al.*, 2015). La detección de los huevos en esputo se realiza mediante frotis y tinción de Ziehl–Neelsen (Calvopiña *et al.*, 2017). En niños se recomienda más el análisis de heces por su costumbre de tragar el esputo. El

diagnóstico en heces se realiza por medio de técnicas de concentración o por la técnica de sedimentación éter-formol (Singh *et al.*, 2012; Calvopiña *et al.*, 2014).

La observación microscópica de huevos resulta ser una técnica de diagnóstico menos sensible que pruebas inmunodiagnósticas, además resultan negativas en infecciones pleurales y ectópicas (Lee *et al.*, 2007; Ahn *et al.*, 2015). El diagnóstico de la paragonimiasis ectópica dependerá de la localización del parásito, por ejemplo, para paragonimiasis cerebral, se utilizan las técnicas de imagen como rayos X, tomografías computarizadas y resonancia magnética (Procop, 2009; Sing *et al.*, 2012). En la paragonimiasis subcutánea se realiza biopsia e histopatología. La presencia de absceso con infiltrado eosinofílico es sugestivo de paragonimiasis (Kodama *et al.*, 2014).

Las pruebas serológicas son de gran utilidad para el diagnóstico de la paragonimiasis extrapulmonar (Amaro *et al.*, 2016) y el diagnóstico diferencial de esta enfermedad con tumores, quistes o lesiones nodulares causados por otras parasitosis (Singh *et al.*, 2012). Las tres principales pruebas serológicas utilizadas en el diagnóstico de la paragonimiasis son la prueba intradérmica, el inmunoblot, y el inmunoensayo enzimático (ELISA) (Chai, 2013).

La prueba intradérmica ha sido utilizada sobre todo para diferenciar la paragonimiasis de la tuberculosis. Consiste en la aplicación de 0,01 a 0,1 ml del antígeno (purificado o extracto crudo) del parásito en uno de los antebrazos del paciente. La reacción positiva se caracteriza por la aparición de una roncha ≥ 5 mm 15 minutos post inoculación (Singh *et al.*, 2012). Las principales desventajas de la prueba son, sin embargo, su baja especificidad debido a reacciones cruzadas con otros trematodos, especialmente si el antígeno no ha sido purificado (Muller, 2001; Singh *et al.*, 2012; Blair, 2014; Hernández-Chea, 2016). Además, no se logra diferenciar una infección activa de una infección pasada, ya que la reacción puede perdurar por muchos años después de la eliminación del parásito (Ulate *et al.*, 2015). Sin embargo, por ser barata y fácil de realizar, se utiliza en clínicas (Yun *et al.*, 2000) y en estudios epidemiológicos en áreas endémicas (Singh *et al.*, 2012).

El ELISA se utiliza en la investigación de la paragonimiasis debido a su alta sensibilidad y especificidad, y por permitir el procesamiento de un gran número de muestras en poco tiempo (Yu *et al.*, 2016). En los últimos años se han desarrollado

gran cantidad de ensayos para diagnóstico rutinario, que utilizan extracto crudo del parásito, proteína excretor-secretor o proteínas recombinantes (incluyendo las cisteínas proteasas) como antígenos (Blair, 2014).

Generalmente las pruebas de ELISA detectan anticuerpos IgG específicos contra *Paragonimus*, que desaparecen de 4 a 12 meses posteriores al tratamiento exitoso del paciente (Chai, 2013). Se ha demostrado que la detección de IgE específicos reducen las reacciones cruzadas, mientras que la detección de IgM permite la detección temprana de la infección (Singh *et al.*, 2012; Chai, 2013; Ahn *et al.*, 2015).

La sensibilidad (Se) y especificidad (Es) del ELISA depende del antígeno utilizado. Con el antígeno somático (Ag S) y antígeno excretor secretor (Ag ES) se han reportado Se de 100% para ambos antígenos y Es de 91.3% y 100%, respectivamente. El Ag S parece generar reacciones falsas positivas en pacientes con esquistosomiasis, pero también en pacientes con tuberculosis o personas sanas (Narain *et al.*, 2005).

El inmunoblot es una técnica que se utiliza para identificar anticuerpos contra proteínas específicas del parásito. En esta técnica la separación de las proteínas se da en función de su peso molecular a través de electroforesis en gel de agarosa. Luego las proteínas se transfieren a una membrana (nitrocelulosa o Di-fluoruro de polivinilideno), la cual se incuba con anticuerpos específicos contra las proteínas de interés. Por medio de lavado se elimina el anticuerpo no unido dejando sólo el anticuerpo unido a la proteína de interés. La reacción se visualiza con un anticuerpo secundario conjugado y un sustrato cromogénico precipitable, formándose una banda visible correspondiente al peso molecular de la proteína, cuando los anticuerpos se unen a la proteína de interés (Mahmood e Yang, 2012). Esta técnica ha sido utilizada en el diagnóstico de la paragonimiasis (Lee *et al.*, 2006; Fischer *et al.* 2013; Ahn *et al.*, 2015). En un estudio realizado en Costa Rica por Ulate (2000) se comparó el uso del Ag S y del Ag ES de *P. mexicanus* en un inmunoblot, encontrándose mejor desempeño del Ag ES, recomendándose su uso para el diagnóstico de paragonimiasis en Costa Rica.

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, EE. UU., desarrolló en 1988 un inmunoblot con un Ag S de 8 kDa preparado de un extracto crudo de *P.*

westermani, estableciendo una Se de 96% y Es de 99%, el cual sigue en uso, pero no está comercialmente disponible (Procop, 2009; Diaz, 2013; Blair, 2014). En contraste, la técnica de ELISA no ha sido utilizada por el CDC para el serodiagnóstico de la paragonimiasis (Procop, 2009). Una desventaja del uso de Ag S es la reacción cruzada con antígenos de otros parásitos (Yu *et al.*, 2016).

Tratamiento

El tratamiento de elección para la paragonimiasis es el praziquantel en la dosis de 75 mg/kg cada 24 horas, durante 3 días (Kashida *et al.*, 2018) o praziquantel 25 mg/kg cada 8 horas, por 3 días (Luo *et al.*, 2016; Wu y Wu 2019). El praziquantel ha mostrado ser casi 100% efectivo en el tratamiento de la paragonimiasis (Calvopiña *et al.*, 2017), sin embargo, no está disponible en Costa Rica para uso humano.

En los casos de paragonimiasis cerebral sin diagnóstico temprano la neurocirugía es el tratamiento de elección (Amaro *et al.*, 2016). Cuando la paragonimiasis cerebral se detecta temprano, el tratamiento recomendado es praziquantel en dosis de 35 mg/kg cada 24 horas por 4 días acompañado de la administración de prednisolona 1.5 mg/kg (Wang *et al.*, 2018), para prevenir reacciones adversas contra sustancias liberadas por los gusanos moribundos (Blair, 2014).

Paragonimiasis en Costa Rica

La paragonimiasis humana en Costa Rica se reportó por primera vez en dos niñas de cuatro y seis años, con paragonimiasis pulmonar, de las cuales una falleció (Morera, 1968). En 1982 Brenes y colaboradores reportaron 3 casos de parasitismo errático (paragonimiasis cerebral), en los cuales se produjo hemorragia cerebral. Dos de estos casos tuvieron un curso fatal, y el tercero requirió intervención quirúrgica de emergencia. En 1985, Brenes y colaboradores describieron el primer caso de paragonimiasis errática en el litoral atlántico de Costa Rica, correspondiente a un niño de seis años, vecino de Limón, con tumoración inguinoescrotal izquierda. En la lesión se observaron huevecillos típicos de *P. mexicanus*, además de cristales de Charcot-Leyden. También hubo reactividad a una prueba intradérmica que se realizó utilizando 0.1 ml del antígeno del parásito. La muestra del suero del paciente se envió al CDC en Atlanta, y resultó positivo en la prueba de fijación de complemento.

En 1976 Brenes y colaboradores reportaron un caso de paragonimiasis cerebral en un niño de doce años, procedente de Puriscal. Los exámenes coprológicos del paciente resultaron negativos, como esperado, mientras que el niño mostró una fuerte reacción en la prueba intradérmica.

Desde 1968 hasta la fecha se han reportado 28 casos de paragonimiasis en Costa Rica, donde un 90% de los casos se reportaron en niños provenientes de zonas rurales, y un 50% de los casos se presentaron en la forma pulmonar, 26% en la forma extrapulmonar (sobre todo en cerebro) y 24% de los casos con localización pulmonar y ectópica (pulmonar e inguinoescrotal; pulmonar y cerebral) (Brenes *et al.*, 1984; Brenes *et al.*, 1985; Ulate *et al.*, 2015).

En un estudio realizado por Ulate *et al.* (2015) con 100 niños en la comunidad indígena Katsi de Talamanca, un 23% reaccionó positivo a la prueba intradérmica con Ag S, mientras que 11 niños resultaron positivos en el inmunoblot con Ag ES, estableciéndose así 23 niños con exposición previa y 11 niños con una infección activa de *P. mexicanus*. Estos resultados contrastan con el número de casos de paragonimiasis reportados en Costa Rica desde 1968, sin embargo, están en concordancia con trabajos recientes, que han detectado el parásito en 8 de los 12 sitios de estudio investigados demostrando una amplia distribución de *P. mexicanus* en el país (Hernández-Chea, 2016).

Referencias Bibliográficas

- Ahn, C., Na, B., Chung, D., Kima, J., Kim, J., y Konga, Y. (2015). Expression characteristics and specific antibody reactivity of diverse cathepsin F members of *Paragonimus westermani*. *Parasitology International*, 64 (1),37-42.
- Acha, P. N., y Szyfres, B. (2003). Zoonoses and communicable diseases common to man and animals: Parasitoses (Vol.3). *Pan American Health Organization*, 3(3),140-45.
- Amaro, D., Cowell, A., Tuohy, M., Procop, G., Morhaime, J., y Reed, S. (2016). Case Report: Cerebral Paragonimiasis Presenting with Sudden Death. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(6), 1424-27.

- Blair, D., Nawa, Y., Mitreva, M., y Doanh, P. N. (2016). Gene diversity and genetic variation in lung flukes (genus *Paragonimus*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110 (1), 6-12. DOI: 10.1093/trstmh/trv101.
- Blair, D. (2014) Paragonimiasis. En R. Toledo (ed.) y B. Fried (ed.), *Digenetic Trematodes*, Vol 766. New York, USA: Springer New York. 115-152.
- Bowman, D. D., Hendrix, C. M., Lindsay, D.S., y Barr, S. C. (2002). *Feline Clinical Parasitology*, 1 era ed. Iowa, United States of America: Iowa State University Press.163-178.
- Brenes, R., Monge, E., Hangen, G., Vargas, G., y, Muñoz, G. (1985). Primer caso de Paragonimiasis errática humana en el litoral Atlántico de Costa Rica. *La Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 6(1).
- Brenes, R., Hangen, G., y Duarte, G. (1984). Revisión de *Paragonimus* y Paragonimiasis en Centroamérica y Panamá. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Costa Rica*, 19(2), 87-106.
- Brenes, R.; Rodríguez, G.; Vargas, G.; Monge, E. y Ruiz, P. (1982). Cerebral hemorrhagic lesions produced by *Paragonimus mexicanus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 198 (31), 522-526.
- Brenes, R. R., Zeledón, R., y Rojas, G. (1980). Biological cycle and taxonomy position of Costa Rican paragonimiasis and the present status of *Paragonimus* from the New World. *Brenesia*. 18:353.
- Brenes, R. R., Monte, E., Guevara, J., Valerio, J., y Rojas, G. (1976). Posible paragonimiasis humana del sistema nervioso. Resúmenes de trabajos libres, IV Congreso Latinoamericano de Parasitología, IV Congreso Centroamericano de Microbiología y Parasitología, III Congreso Nacional de Microbiología V Parasitología, San José, Costa Rica.
- Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Rendon, M., Takagi, H., y Sugiyama, H. (2018). *Hypolobocera guayaquilensis* (Decapoda: Pseudothelphusidae): A New Crab Intermediate Host of *Paragonimus mexicanus* in Manabí Province, Ecuador. *Korean Journal of Parasitology*, 56(32), 189-194.

- Calvopiña, M., Romero-Alvarez, D., Macias, R., Sugiyama, H. (2017). Severe Pleuropulmonary Paragonimiasis Caused by *Paragonimus mexicanus* Treated as Tuberculosis in Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(1), 97-99.
- Calvopiña, M., Romero, D., Castañeda, B., Hashiguchi, Y., y Sugiyama, H. (2014). Current status of *Paragonimus* and paragonimiasis in Ecuador. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 849-855.
- Chai, JY. (2013). Paragonimiasis. *Handbook of Clinical Neurology*, 114: 283–296.
- Chen, J., Chen, Z, Lin, J., Zhu, G., Meng, H., Cui, G., Wu, N., Hu, R., Pan, J., Zou, Y., y Feng, H. (2013). Cerebral paragonimiasis: A retrospective analysis of 89 cases. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115(5), 546-551.
- Diaz, J. (2013). Paragonimiasis Acquired in the United States: Native and Nonnative Species. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 493-504.
- Fischer, P., Curtis, K., Folk, S., Wilkins, P., Marcos, L., y Weil, G. (2013). Serological Diagnosis of North American Paragonimiasis by Western Blot Using *Paragonimus kellicotti* Adult Worm Antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1035-40.
- Friant, S., Brown, K., Saari, M. T., Segel, N. H., Slezak, J., Goldberg, T. L. (2015). Lungfluke (*Paragonimus africanus*) infects Nigerian red-capped mangabeys and causes respiratory disease. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 329-332.
- García-Márquez, L. J., Vázquez-García, J.L., Osorio-Sarabia, D., León-Régagnon, V., García-Prieto, L., Lamothe-Argumedo, R., y Constantino-Casas, F. (2010). Lung lesions in opossums (*Didelphis virginiana*) naturally infected by *Paragonimus mexicanus* in Colima, Mexico. *Veterinaria México*, 41(1), 65-69.
- Henry, T.S., Lane, M.A., Weil, G.J., Bailey, T.C. y Bhalla, S. (2012). Chest CT Features of North American Paragonimiasis. *American Journal of Roentgenology*, 198(5), 1076-83.

- Hernández-Chea, R., Jiménez-Rocha, A., Castro, R., Blair, D., Dolz, G. (2017). Morphological and molecular characterization of the metacercaria of *Paragonimus caliensis*, as a separate species from *P. mexicanus* in Costa Rica. *Parasitology International*, 66 (2), 26-133.
- Hernández-Chea, R.D., Tesis Magister Scientiae, Caracterización morfológica y molecular de *Paragonimus mexicanus* y *Paragonimus caliensis* en cangrejos de agua dulce de Costa Rica. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2016.
- Kalhan, S., Sharma, P., Sharma, S., Kakria, N., Dudani, S., y Gupta, A. (2015). *Paragonimus westermani* infection in lung: A confounding diagnostic entity. *Lung India*, 32(3): 265-267. Acceso 12 Diciembre, 2018, desde: http://www.lungindia.com/temp/LungIndia323265-4266114_115101.pdf .
- Kashida, Y., Niuro, M., D, Maruyama, H., y Hanaya, R. (2018). Cerebral paragonimiasis with hemorrhagic stroke in a developed country. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27 (10), 2648-2649.
- Kodama, M., Akaki, M., Tanaka, H., Maruyama, H., Nagayasu, E., Yokouchi, T., Arimura, Y., y Kataoka, H. (2014). Cutaneous paragonimiasis due to triploid *Paragonimus westermani* presenting as a non-migratory subcutaneous nodule: a case report. *Journal of Medical Case Report*, 8 (346).
- Kwon, Y.S., Lee, H.W., y Kim, H. J. (2019). *Paragonimus westermani* infection manifesting as a pulmonary cavity and adrenal gland mass: A case report. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25 (2019), 200-203.
- Lee, J., Lee, J., Kim, S., Yong, Tai-Soon. (2007). Molecular cloning and characterization of a major egg antigen in *Paragonimus westermani* and its use in ELISA for the immunodiagnosis of paragonimiasis. *Parasitology Research*, 100(4), 677-81. doi 10.1007/s00436-006-0324-7.
- Lee, E., Na, B., Bae, Y., Kim, S., Je, E., Ju, J., Cho, S., Kim, T., Kang, S., Cho, S. y Kong, Y. (2006). Identification of immunodominant excretory–secretory cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics*, 6, 1290-1300.

- Li, B., McNulty, S. C., Rosa, B.A., Tyagi, R., Zeng, Q.R., Gu, K., Weil, G.J., y Mitreva, M. (2016). Conservation and diversification of the transcriptomes of adult *Paragonimus westermani* and *P. skrjabini*. *Parasites & Vectors*, 9:497.
- Liu, Q., Wei, F., Liu, W., Yang, S., y Zhang, X. (2008). Paragonimiasis: an important food-borne zoonosis in China. *Trends in Parasitology*, 24(7), 318-23.
- Luo, J., Wang, M., Liu, D., Zhu, H., Yang, S., Liang, B., y Liang, Z. (2016). Pulmonary Paragonimiasis Mimicking Tuberculous Pleuritis. *Medicine*, 95(15).
- Lopez-Caballero, J., Ocegüera-Figuero, A., y Leon –Regagnon, V. (2013). Detection of multiple species of human *Paragonimus* from Mexico using morphological data and molecular barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1125-36.
- Mahmood, T., y Yang, P. (2012). Western Blot: Technique, Theory, and, Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429-34.
- McNulty, S. N., Fischer, P. U., Townsend, R. R., Curtis, K. C., Weil, G. J., y Mitreva, M. (2014). Systems biology studies of adult *Paragonimus* lung flukes facilitate the identification of immunodominant parasite antigens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (10), e3242. doi 10.1371/journal.pntd.0003242.
- Monge, E., Brenes, R., y Muñoz, G. (1985). Infección natural de *Ptychophallus tristani* (crustacea: decapoda) con metacercarias de *Paragonimus mexicanus* (trematoda) en Tabarcia de Mora, Costa rica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 27(1), 23-26.
- Morera, P. (1968). Trematodiasis Pulmonar: Estudio de dos casos encontrados en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, (11), 225-237.
- Morter, R., Adetifa, I., Antonio, M., Touray, F., Jong, B. C., Gower, C. M., Gehre, F. (2018). Examining human paragonimiasis as a differential diagnosis to tuberculosis in The Gambia. *BMC Research Notes*, 11:31.
- Muller, R. (2001). *Worms and human Disease*, 2da ed. New york, USA: CABI. 36-38
- Narain, K., Devi, K.R., y Mahanta, J. (2005). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human paragonimiasis. *Indian Journal of Medical Research*, 121(6), 739-46.

- Procop, G. (2009). North American Paragonimiasis (Caused by *Paragonimus kellicotti*) in the Context of Global Paragonimiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(3), 415–46.
- Roy, C., Praharaaj, S., Dubey, M. (2015). An unusual case of human paragonimiasis. *Medical Journal Armed Forces India*, 71(1), S60-S62. Acceso 15 Diciembre, 2016, desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mjafi.2013.02.008>.
- Singh, T. S., Sugiyama, H., y Rangsiruji, A. (2012). *Paragonimus* & paragonimiasis in India. *Indian Journal of Medical Research*, 136(2), 192-204. Acceso 15 Diciembre, 2016, desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461730/?report=printable>.
- Torgerson, P. R., Devleeschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A. L., y Kasuga, F. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Medicine*, 12(12), e1001920.
- Ulate, E. Implementación de un inmunoblot para el diagnóstico de la paragonimiasis humana, *Tesis Magister Scientiae*, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2000.
- Ulate, E., Rojas, B. G., Hernández-Cheaa, R., Jiménez-Rocha C., A., y Dolz G. (2015). Diagnosis of Human Paragonimiasis in Costa Rica using a Intradermal Test and Immunoblot. *Journal of Harmonized Research in Medical & Health Sciences*, 2(3), 122–131.
- Vargas-Arzola, J., Segura-Salvador, A., Reyes-Velasco, L., Diaz-Chiguer, D. L., Marquez-Navarro, A., Leon-Avila, G., y Noguera-Torres, B. (2014). Detection of *Paragonimus mexicanus* (Trematoda) metacercariae in crabs from Oaxaca, Mexico. *Acta tropica*, 137, 95–98.doi: 10.1016/j.actatropica.2014.05.004.
- Vélez, I., Velásquez, L., y Vélez, I. (2003). Morphological Description And Life Cycle Of *Paragonimus* sp. (Trematoda: Troglotremitidae): Causal Agent Of Human Paragonimiasis In Colombia. *Journal of Parasitology*, 89(4), 749-755
- Vélez, I. D., Ortega, J., Hurtado, M. I., Salazar, A. L., Robledo, S. M., Jimenez, J. N., y Velásquez, L. E. (2000). Epidemiology of paragonimiasis in Colombia.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 94(6), 661-663.

Wang, X., Zheng, X., y Huang, J. (2018). Cerebral paragonimiasis with subcutaneous paragonimiasis on the face: a case of ectopic paragonimiasis in a child. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 11(3), 2877-2881.

Wu, B. y Wu, Y. (2019). Large Pericardial Effusion Due to Paragonimiasis in a 4-Year-Old Chinese Boy. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(4): ofz145.

Yi, D., Qiang, D., y Wenjie, C. (2014). Neuroimaging findings in a woman with brainstem paragonimiasis: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Report*, 36 (12).

Yu, S., Zhang, X., Chen, W., Zheng, H., Ai1, G., Ye1, N., y Wang, Y. (2016). Development of an immunodiagnosis method using recombinant PsCP for detection of *Paragonimus skrjabini* infection in human. *Parasitology Research*. Acceso 14 diciembre de 2018, desde: doi 10.1007/s00436-016-5300-2 .

Yun, D-H., Chung, J-Y., Chung, Y-B., Bahk, Y-Y., Kang, S-Y., Kong, Y., y Cho, S-Y. (2000). Structural and immunological characteristics of a 28-kilodalton cruzipain-like cysteine protease of *Paragonimus westermani* expressed in the definitive host stage. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(6), 932-39.

Xia, Y., Ju, Y., Chen, J., y You, C. (2014). Hemorrhagic stroke and cerebral paragonimiasis. *Journal of The American Heart Association*, 45(11), 3420-2.

Zeng, Z., Zhang, Gao-feng., Tian, C., Ran, Chun-yan., Li, Wen-fu, Wang, Ya-nan., y Zhang, Ti-jiang. (2016). MRI findings and differential diagnosis in children with cerebral paragonimiasis. *Radiology of Infectious Diseases*, 3(2), 54-59.

ARTÍCULO 1

Producción y caracterización de cisteína proteasas recombinantes de *Paragonimus westermani* para el diagnóstico de anticuerpos contra *Paragonimus mexicanus* en ratas y humanos

Resumen

La paragonimiasis es una zoonosis parasitaria transmitida por alimentos que se considera desatendida y subdiagnosticada en Costa Rica. Debido a que no se encuentra disponible una prueba diagnóstica inmunológica, el objetivo del presente estudio fue producir y caracterizar diferentes proteínas recombinantes del parásito, para utilizarlas posteriormente en pruebas inmunoenzimáticas. Se expresaron y purificaron diferentes cisteína proteasas recombinantes de *Paragonimus westermani* (CP4, CP7 y CP9), las cuales posteriormente se evaluaron mediante la técnica de inmunoblot con sueros de ratas positivas y negativas a *Paragonimus mexicanus* y sueros humanos positivos a *P. westermani*, *P. mexicanus*, fascioliasis, esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, toxocariasis, leishmaniosis, esparganosis, amebiasis y sueros humanos negativos a parasitosis. El antígeno CP7 resultó ser más específico que las otras dos proteínas evaluadas, ya que reaccionó con sueros de pacientes positivos a *P. westermani* y a *P. mexicanus*, no reaccionó con sueros negativos, y solamente presentó reacción débil con sueros de pacientes con fascioliasis, toxocariasis y esparganosis. Se recomienda utilizar este antígeno para implementar un ensayo inmunoenzimático.

Palabras claves: paragonimiasis, diagnóstico, cisteína proteasa 7, inmunoblot, reacciones cruzadas.

Abstract

Paragonimiasis is a foodborne parasitic zoonosis that is considered unattended and underdiagnosed in Costa Rica. An immunological diagnostic test for paragonimiasis is not available for humans, so the objective of the present study was to produce and characterize different recombinant proteins of the parasite, and to use them in an immunoenzymatic test. Different recombinant cysteine proteases of *Paragonimus westermani* (CP4, CP7 and CP9) were expressed and purified, which

were subsequently evaluated by the immunoblot technique with sera from rats positive and negative to *Paragonimus mexicanus* and human sera positive to *P. westermani*, *P. mexicanus*, fascioliasis, schistosomiasis, clonorchiasis, cysticercosis, toxocariasis, leishmaniasis, sparganosis, amebiasis and negative sera. The CP7 antigen showed a higher specificity than the other proteins, reacting with sera from patients positive to *P. westermani* and *P. mexicanus*, but not with negative sera, and showing only a weak reaction with sera from patients with fascioliasis, toxocariasis and sparganosis. It is recommended to use this antigen to implement an immunoenzymatic assay.

Keywords: paragonimiasis, diagnosis, cysteine protease 7, immunoblot, cross reactions.

1. Introducción

La paragonimiasis es una enfermedad parasitaria transmitida por alimentos ocasionada por trematodos del género *Paragonimus* (Quiu *et al.*, 2016). El hombre se infecta al ingerir cangrejos o camarones de río crudos o mal cocinados (Yu *et al.*, 2016; Itoh *et al.*, 2016). La prevalencia de la paragonimiasis a nivel mundial es difícil de estimar, debido a la dificultad de su diagnóstico, sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el año 2010 por lo menos 139 mil nuevos casos de paragonimiasis y 250 muertes causadas por la enfermedad en todo el mundo (Torgerson *et al.*, 2015).

Según la localización del parásito se distinguen dos presentaciones clínicas: la paragonimiasis pleuropulmonar o pulmonar y la paragonimiasis extrapulmonar o ectópica. El diagnóstico de la paragonimiasis pulmonar se realiza mediante detección de huevos del parásito en esputo y heces, lo cual no es posible en la paragonimiasis extra-pulmonar (Narain *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2016).

Sin embargo, un diagnóstico rápido y certero de la paragonimiasis cerebral es imprescindible, para iniciar tempranamente el tratamiento y evitar lesiones irreversibles o la muerte. En este sentido, las pruebas inmunológicas se consideran de vital importancia para apoyar el diagnóstico de la enfermedad (Wang *et al.*, 2018).

En los últimos años se han desarrollado gran cantidad de ensayos inmunológicos para el diagnóstico rutinario, que utilizan extracto crudo del parásito,

proteína excretor-secretor o proteínas recombinantes (incluyendo las cisteína proteasas) como antígenos (Blair, 2014).

La sensibilidad (Se) y especificidad (Es) de las técnicas inmunológicas dependerá del antígeno utilizado. Con el antígeno somático (Ag S) y antígeno excretor secretor (Ag ES) se han reportado Se de 100% para ambos antígenos y Es de 91.3% y 100%, respectivamente. El Ag S parece generar reacciones falsas positivas en pacientes con esquistosomiasis, pero también en pacientes con tuberculosis o personas sanas (Narain *et al.*, 2005). La caracterización de las proteínas excretoras secretoras de *Paragonimus westermani* determinó al menos 15 cisteínas proteasas (Lee *et al.*, 2006), siendo 11 catepsinas F (Blair *et al.*, 2016). Las cisteínas proteasas son enzimas claves cruciales en la biología de parásitos y han sido investigadas como marcadores serodiagnósticos, como también marcadores terapéuticos y vacunales (Shareef y Abidi, 2014). Las cisteínas proteasas de *P. westermani* cumplen un rol importante en la invasión, patogénesis y en la modulación inmune del hospedador (Yang *et al.*, 2004). Asimismo, tienen la capacidad de inducir respuesta de anticuerpos específicos, razón por la cual se utilizan como antígeno diagnóstico (Yun *et al.*, 2000; Ahn *et al.*, 2015). Las dificultades de contar con un parásito vivo y la purificación de estos antígenos han conducido a sintetizar las cisteínas proteasas mediante técnicas de ADN recombinante acortando el tiempo para la elaboración de antígenos para el desarrollo de pruebas diagnósticas para la enfermedad (Yun *et al.*, 2000; Pothong *et al.*, 2018).

En el 2013 Fischer *et al.* demostraron una reacción cruzada entre diferentes especies de *Paragonimus*, lo que posibilitó diagnosticar infecciones ocasionadas por *Paragonimus kellicotti*, utilizando antígenos de *P. westermani*.

En Costa Rica la paragonimiasis parece ser una enfermedad subdiagnosticada. Aunque desde 1968 hasta la fecha solo se han reportado 28 casos, sobre todo en niños de zonas rurales, un estudio realizado en el año 2000 estableció en una comunidad indígena en Talamanca a 23% de niños con exposición previa y 11% de niños con una infección activa de *Paragonimus mexicanus* (Ulate *et al.*, 2015). Los resultados anteriores están en concordancia con trabajos realizados recientemente por Hernández-Chea (2016), que encontró el parásito ampliamente distribuido en el país (66.6% de los sitios investigados). Debido a que en nuestro país y en

Latinoamérica no están disponibles técnicas de inmunodiagnóstico comerciales para la paragonimiasis, el objetivo del presente trabajo fue producir y caracterizar mediante inmunoblot diferentes antígenos de *P. westermani* (cisteínas proteasas 4 [CP4], 7 [CP7] y 9 [CP9]) para establecer su idoneidad en el diagnóstico de infecciones ocasionadas por *P. mexicanus*.

2. Materiales y métodos

2.1- Diseño del estudio

Se realizó un estudio experimental, observacional y descriptivo, el cual se desarrolló en dos fases: la primera fase del estudio consistió en la obtención de las cisteínas proteasas recombinantes 4, 7 y 9 de *P. westermani*, en la segunda fase se probaron las diferentes cisteínas proteasas en la técnica de inmunoblot, para determinar si reconocían sueros de ratas y humanos infectados con *P. mexicanus*.

2.2- Sueros a analizar

2.2.1 Sueros controles positivos

Se utilizaron dos sueros de ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) infectadas experimentalmente con metacercarias de *P. mexicanus*, las cuales eliminaron los huevos de *P. mexicanus* en heces 92 y 100 días post infección. De estos dos animales se tomaron muestras de sangre, se centrifugó a 748 g por 5 minutos y se utilizaron como sueros controles positivos durante el experimento. También se utilizaron dos sueros humanos infectados con *P. westermani* y dos sueros humanos infectados con *P. mexicanus*, los cuales fueron donados por el doctor Sugiyama Hiromu, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Tokio, Japón.

2.2.2 Sueros controles negativos

Se utilizaron como sueros controles negativos, dos sueros de ratas Wistar no infectadas y 8 sueros humanos negativos a *Paragonimus* spp. pero positivos a otras helmintiasis (fascioliasis, esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, toxocariasis, leishmaniosis, esparganosis, amebiasis) y un suero de un individuo sin parasitosis, los cuales también fueron donados por el doctor S. Hiromu, Tokio, Japón.

2.3 Obtención de las cisteínas proteasas recombinantes (CP4, CP7 y CP9) de *P. westermani*

2.3.1 Procedimiento de preparación de los plásmidos

La secuencia parcial de los genes que codifican para las proteínas de interés se obtuvieron de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), a saber, PwCP4 (AAB93494), PwCP7 (AAY81945), PwCP9 (AAY81947), para la producción de las proteínas CP4, CP7, CP9 recombinantes, respectivamente. Se utilizó el plásmido pET-28a(+) (Novagen, Madison, WI, USA), dirigido a la expresión inducible de proteínas recombinantes en *E. coli*, este plásmido posee un sistema de expresión basado en el promotor de la enzima RNA polimerasa del bacteriófago T7. Para que se pudiera realizar la purificación de las proteínas por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (Ni-NTA), se incluyó la secuencia codificante para 6 residuos de histidina tanto en el N- como en el C-terminal, que tienen afinidad por este metal. La secuencia de los genes se optimizó para su expresión en *E. coli* y fueron subclonados en el plásmido (Genscript, New Jersey, US).

2.3.2 Expresión de las proteínas de interés en *E. coli* BL21

Los plásmidos con los genes de interés (PwCP4-pET, PwCP7-pET y PwCP9-pET) fueron transformados en células *E. coli* BL21 (DE3) quimiocompetentes preparadas según el protocolo de cloruro de calcio y cloruro de magnesio (Sambrook y Russell, 2001). La transformación se realizó mediante choque térmico según las recomendaciones del fabricante (One Shot BL21(DE3) Chemically Competent Cells, Invitrogen, 2015), con las siguientes modificaciones: luego del choque térmico se añadieron 500 μ l de medio S.O.C. (caldo súper óptimo con represor catabólico, Invitrogen, 2015) y la incubación final se hizo a 37°C por 1 hora con agitación (225 rpm).

La inducción de la expresión de las proteínas en las bacterias transformadas se realizó con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, una vez que la densidad óptica del cultivo fue 0.8 (600 η m). Luego se incubó por 3 horas a 37°C con agitación, según el protocolo del fabricante pET System Manual (Novagen, 2005). El volumen final de cultivo fue de 300 ml.

2.3.3 Extracción de las proteínas producidas y evaluación de solubilidad

Las proteínas CP4, CP7 y CP9 se extrajeron de las bacterias utilizando el detergente no iónico B-PER Complete (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, 2013), en una proporción de 5 ml/g de biomasa, suplementado con 10 μ l de una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa libres de EDTA (Halt Protease and phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific), por cada ml de B-PER, para prevenir la proteólisis de las proteínas de interés.

Para la evaluación de la solubilidad de la proteína se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE) de las muestras de proteína soluble (PS), correspondiente a la fracción del sobrenadante obtenida por la lisis con B-PER complete. Se incluyó el agente reductor DTT (ditiotreitól) a una concentración final de 0.1 M, y el buffer de carga Laemmli concentración final 1X (Laemmli, 1970). Las muestras se calentaron a 85°C durante 2 minutos, y posteriormente se realizó la electroforesis en minigeles tris-glicina 4-20% a 225V por 40 minutos, según el protocolo del fabricante (Novex WedgeWell Tris-glycine Gels, Thermo Scientific). Se utilizó el marcador de peso molecular PageRuler Plus Prestained (Thermo Scientific).

2.3.4 Solubilización de las proteínas presentes en cuerpos de inclusión

Para la obtención de las proteínas CP4, CP7 y CP9, agregadas en forma insoluble en cuerpos de inclusión (CI), fue necesario la solubilización de estas utilizando urea como agente desnaturalizante. Los precipitados insolubles obtenidos en la extracción realizada con B-PER Complete se resolubilizaron con 500 μ l del buffer 1 (urea 2 M, tris 100 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM y Triton x-100 1%) y agitación en vortex, seguido por una centrifugación a 13148 g por 15 minutos a 10°C. Se guardó el sobrenadante para análisis en SDS-PAGE y se realizó el mismo procedimiento utilizando el buffer 2 (urea 2 M, tris 100 mM). Para la resuspensión de los CI se utilizó el buffer 3 (tris 100 mM, y urea 8 M), y se incubaron durante una hora con agitación orbital a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron a 13148 g por 15 minutos y se guardó el sobrenadante conteniendo las proteínas solubilizadas a -18°C para su posterior evaluación en SDS-PAGE y también para la purificación.

2.3.5 Purificación de las proteínas solubles

Las proteínas solubilizadas en buffer 3 se purificaron por cromatografía de afinidad utilizando columnas HisPur Ni-NTA (Thermo Scientific, 2015), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

2.4 Análisis cualitativo y cuantitativo de los antígenos recombinantes purificados

El análisis cualitativo de las eluciones de las proteínas (CP4, CP7 y CP9) purificadas con las columnas Ni-NTA se realizó mediante SDS-PAGE. Con el fin de determinar la pérdida o no de proteínas durante el proceso inicial de purificación, posterior a la incubación de la columna con las proteínas solubilizadas en buffer 3, se recolectó el filtrado post centrifugación de la columna de purificación y se almacenó a -20°C , para su posterior análisis por SDS-PAGE.

El análisis cuantitativo de las proteínas purificadas se realizó mediante el ensayo colorimétrico con el colorante azul brillante de Coomassie G-250 (Bradford, 1976), siguiendo las recomendaciones del fabricante (Coomassie Protein Assay Kit, Thermo Scientific).

El reactivo Coomassie se equilibró a temperatura ambiente una hora antes del inicio del ensayo. Se realizó el ensayo en microplaca, con un rango de detección de 100-1500 $\mu\text{g/ml}$. Se prepararon los estándares utilizando concentraciones decrecientes de albumina de suero bovina (BSA) desde 2000 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0 $\mu\text{g/ml}$ (blanco) en buffer (PBS 0.25X, imidazol 62.5 mM y urea 2 M). Las muestras de proteínas en buffer de elución (PBS 1X, imidazol 250 mM y urea 8 M) se diluyeron en agua destilada en una proporción 1:4, debido a que la concentración máxima de urea que es compatible con el ensayo de Bradford, según la indicación del fabricante es de 3 M. Se utilizaron 5 μl de la dilución de las proteínas y 250 μl del reactivo de Coomassie. Tanto las muestras como los estándares se analizaron por triplicado.

2.5. Implementación del inmunoblot utilizando los antígenos purificados

Se realizó una SDS-PAGE según descrito en la sección 2.3.3. Posterior al SDS-PAGE se lavó el gel con agua destilada y se incubó por 10 minutos en etanol 20% con el fin de mejorar la eficiencia de la electro-transferencia de las proteínas. La

electrotransferencia de proteínas se realizó con el sistema de electrotransferencia seco iBlot2 (Thermo Scientific) y utilizando membranas pre-activadas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con poro de 0,2 μm (iBlot 2 Transfer Stacks, Thermo Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante para proteínas de 28 kDa (6 minutos, 23 V, 1.4 A).

Finalmente, las membranas se tiñeron de forma reversible con Ponceau S (Sigma) con el fin de evaluar la eficiencia de la electrotransferencia de las proteínas, y para permitir el corte de las membranas en tiras de aproximadamente 3 mm de ancho, las cuales se destiñeron en agua destilada.

2.5.1 Inmunoblot con anticuerpo anti-His

Para el análisis de la presencia de residuos de histidina en las proteínas CP4, CP7 y CP9 sintetizadas y purificadas, se bloqueó la membrana PVDF con solución de bloqueo (PBS 1X, 0.05 % Tween-20, 0.2 % I-Block) 3 veces por 20 min cada una, con agitación orbital. Después, se incubó con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-His (THE His Tag mAb, GenScript) reconstituido en agua ultrapura a una concentración final de 0.5 mg/ml y diluido 1:5000 en solución de bloqueo por 16 horas a temperatura ambiente. Luego, se eliminó el anticuerpo primario, se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con buffer de bloqueo, y se incubó con el anticuerpo secundario policlonal de cabra anti-ratón IgG conjugado a la enzima peroxidasa alcalina (Thermo Scientific), reconstituido en glicerol al 50% a una concentración final de 0.3 mg/ml, y diluido 1:5000 en solución de bloqueo durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se eliminó el anticuerpo secundario y se realizaron 3 lavados de 20 minutos cada uno con buffer de lavado (TBS 1X y Tween-20 0.05%), y la reacción de detección se realizó con 5 ml del sustrato cromogénico BCIP/NBT (Novex, Invitrogen) durante 2 minutos. En caso de inmunoreactividad, se desarrolló una banda de aproximadamente 28 kDa, y la reacción se detuvo con agua destilada.

2.5.2 Inmunoblot con sueros de ratas

Para la evaluación de los sueros de ratas se realizó el mismo procedimiento que en la sección 2.5.1 con las siguientes modificaciones. Se incubaron las membranas cortadas en tiras de aproximadamente 3 mm de ancho con el anticuerpo primario (sueros de ratas) en una dilución de 1:50 en solución de bloqueo (PBS 1X,

Tween-20 0.05%, iBlock 0.4%), durante toda la noche a 4°C. Luego se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (policlonal de cabra anti-ratón IgG conjugado a la enzima peroxidasa alcalina) en una dilución de 1:10.000 en solución de bloqueo, durante 3 horas a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluó la presencia o ausencia de inmunoreactividad por medio de la lectura visual de la membrana con el sustrato NBT-BCIP. La reacción se detuvo con agua destilada. Sueros que mostraron bandas de aproximadamente 28 kDa se consideraron positivos.

2.5.3 Inmunoblot con sueros humanos

Para la evaluación de las proteínas CP4, CP7 y CP9 con sueros humanos se utilizó el mismo protocolo descrito en 2.5.2 con las siguientes modificaciones. Se utilizó PBS en vez de TBS en la solución de lavado, se utilizó el anticuerpo secundario de cabra anti-humano IgG conjugado a peroxidasa (Sigma Aldrich), diluído 1:10.000 en solución de bloqueo, y se empleó el sustrato diaminobencidina (DAB, 100 µl de DAB al 10% en DMSO (dimethyl sulfoxide) en 10 ml 0.01 M Tris pH 7.2, 200 µl H₂O₂ 3%). Se evaluaron sueros humanos positivos a *P. westermani*, *P. mexicanus*, fascioliasis, esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, toxocariasis, leishmaniosis, esparganosis, amebiasis y sueros humanos negativos. La reacción se detuvo con agua destilada. Sueros que mostraron bandas de aproximadamente 28 kDa se consideraron positivos.

3. Resultados

No se pudo detectar la presencia de abundante concentración de proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 (peso molecular 28 kDa) en la fracción de proteínas solubles (Figura 1).

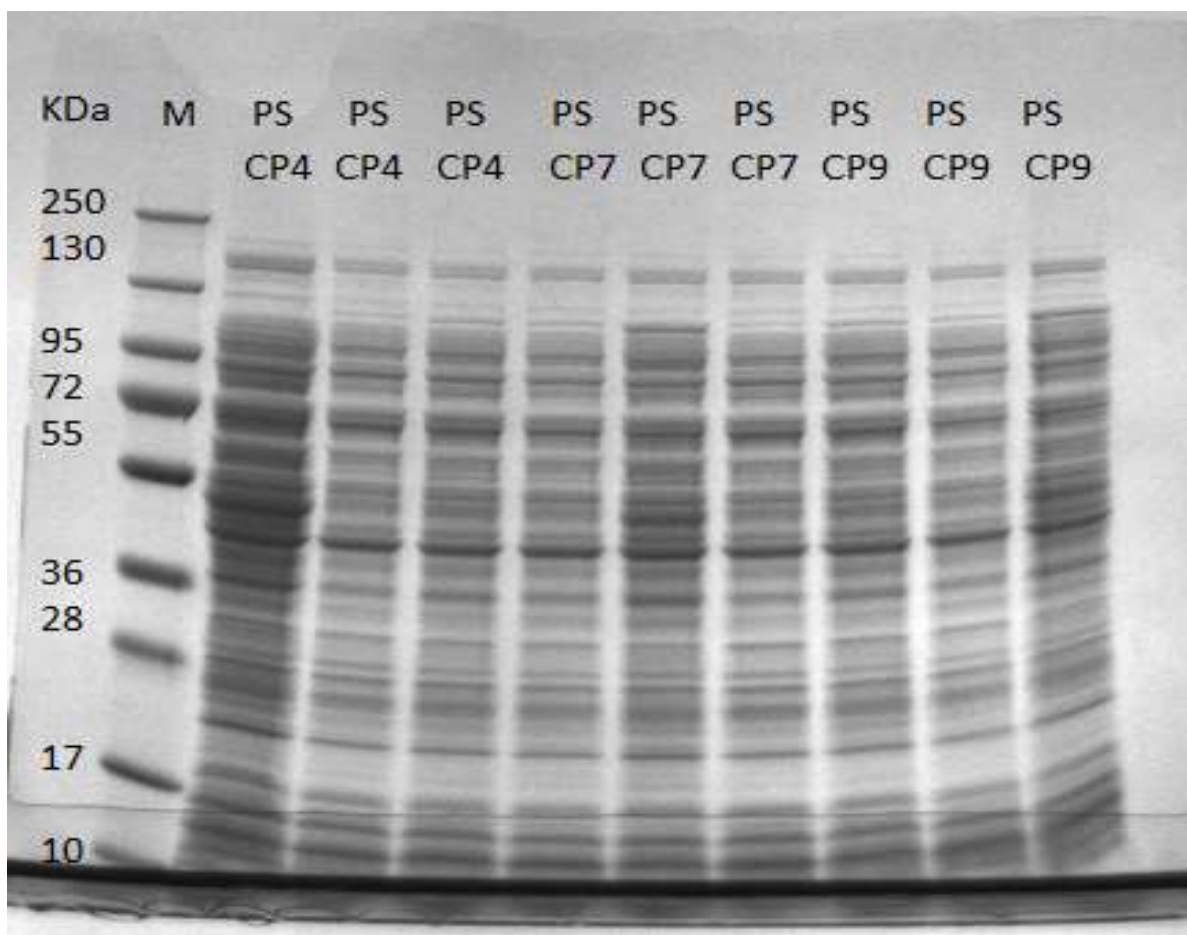
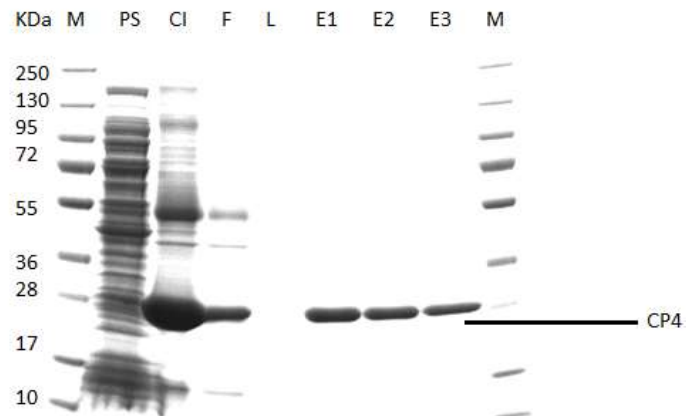


Figura 1. SDS-PAGE de la fracción soluble de proteínas recombinantes. M: PageRuler Plus Prestained; PS CP4, CP7 y CP9: proteínas solubles de la fracción del sobrenadante obtenida en la lisis con B-PER Complete para las extracciones de la CP4, CP7 y CP9, respectivamente.

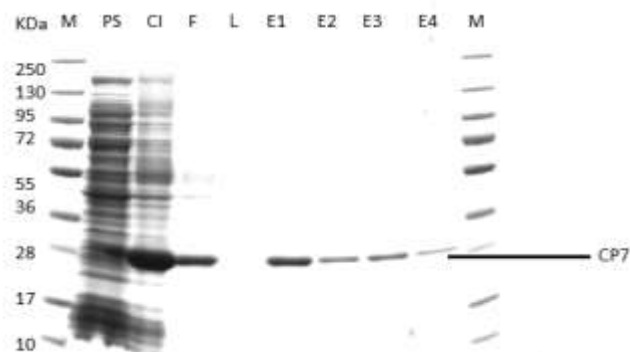
Mediante tratamiento de urea se logró solubilizar las proteínas recombinantes (Figura 2). En la figura 2, se muestran las fracciones solubles de cada proteína (PS), las fracciones solubilizadas de cada proteína (CI), el filtrado (F) posterior a la incubación de la columna de purificación con las proteínas solubilizadas en buffer 3, y el resultado de las tres eluciones (E1, E2 y E3). La proteína CP4 mostró fuertes bandas de 28 kDa después de la purificación y en las eluciones, indicando una purificación eficiente y específica. En el paso de lavado (L) no se detectó proteínas, indicando que no hubo pérdida de proteína recombinante (Figura 2A). Lo mismo se determinó para la proteína CP7 (Figura 2B). En contraste, en la proteína CP9 se observó pérdida de proteína recombinante en el filtrado (F) posterior a la incubación de la columna de purificación con las proteínas solubilizadas en buffer 3 y en el paso de lavado (L) (Figura 2C).

La cantidad de proteínas obtenidas en las eluciones E1, E2, E3 y E4 de CP4 varió en rangos de 51-157 $\mu\text{g/ml}$, para la CP7 entre 53-139 $\mu\text{g/ml}$, y para la CP9 entre 28-1329 $\mu\text{g/ml}$ (Cuadro 1).

A



B



C

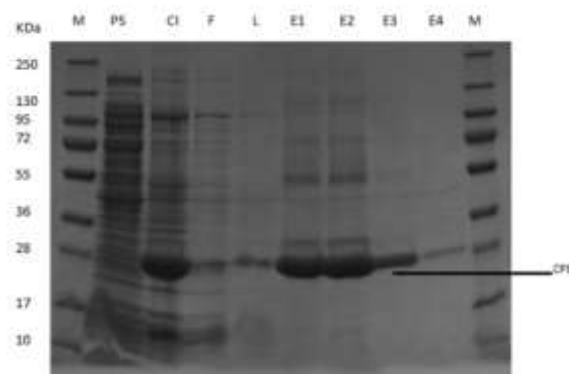


Figura 2. SDS-PAGE para el análisis de la purificación de la proteína recombinante CP4 (A), CP7 (B) y CP9 (C) mediante cromatografía de afinidad. M: PageRuler Plus Prestained; PS: proteína soluble; CI: proteínas solubilizadas con urea a partir de cuerpos de inclusión; F: filtrado post- incubación de la columna de purificación con las

proteínas CP4 solubilizadas, L: proteínas presentes en primer lavado; E1-E4: proteínas presentes en eluciones 1, 2, 3 y 4.

Cuadro 1. Cantidad de proteína CP4, CP7 y CP9 obtenidas en las diferentes eluciones (E1 a E4) de la cromatografía de afinidad, mediante el ensayo colorimétrico con el colorante azul brillante de coomassie G-250.

Proteína y elución	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
CP4 E1	157.807
CP4 E2	112.462
CP4 E3	57.024
CP4 E4	51.942
CP7 E1	139.940
CP7 E2	112.765
CP7 E3	65.637
CP7 E4	53.654
CP9 E1	1329.321
CP9 E2	1130.859
CP9 E3	188.691
CP9 E4	28.423

Cada una de las proteínas recombinantes (CP4, CP7 y CP9) producidas mostró reacción con el anticuerpo anti-His, indicando una adecuada marcación con los residuos de histidina. La reacción se evidenció por la presencia de una fuerte banda de 28 kDa (Figura 3).

En el inmunoblot con suero de ratas, se detectó reacción de la CP4, la CP7 y la CP9 con uno de los dos sueros de ratas infectadas experimentalmente con *P. mexicanus*, mostrando una banda tenue de 28 kDa, mientras que los dos sueros de ratas negativas no mostraron reacción con la CP4 (Figura 4A), o con las otras CPs (Figuras 4B y 4C).

En el inmunoblot con sueros humanos, la proteína CP4 reaccionó fuertemente con controles positivos de *P. westermani*, y muy débil con sueros controles positivos de *P. mexicanus*. Se observó además una débil reacción con sueros controles positivos de fascioliasis, esquistosomiasis, toxocariasis, leishmaniosis y amebiasis.

No hubo reacción de la proteína CP4 con los sueros positivos a clonorchiasis, cisticercosis, esparganosis o sueros negativos (Figura 5A).

En contraste, la proteína CP7 reaccionó fuertemente con sueros controles positivos de *P. westermani* y *P. mexicanus*, además se detectó una débil reacción con sueros controles positivos de fascioliasis, toxocariasis y esparganosis. No se detectó reacción de la proteína CP7 con sueros controles positivos de esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, amebiasis o sueros negativos (Figura 5B).

Finalmente, la proteína CP9 reaccionó fuertemente con sueros controles positivos de *P. westermani*, *P. mexicanus*, fascioliasis, cisticercosis, toxocaríasis, esparganosis, y amebiasis, mostró una débil reacción con sueros controles positivos de leishmaniosis y esquistosomiasis y no mostró reacción con sueros controles positivos de clonorchiasis y sueros negativos (Figura 5C).

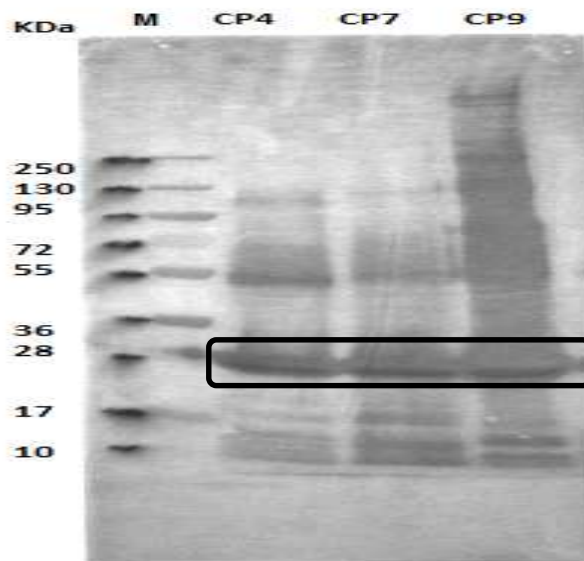


Figura 3. Reacciones de las proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 de *P. westermani* con el anticuerpo anti-His en inmunoblot. M: PageRuler Plus Prestained.

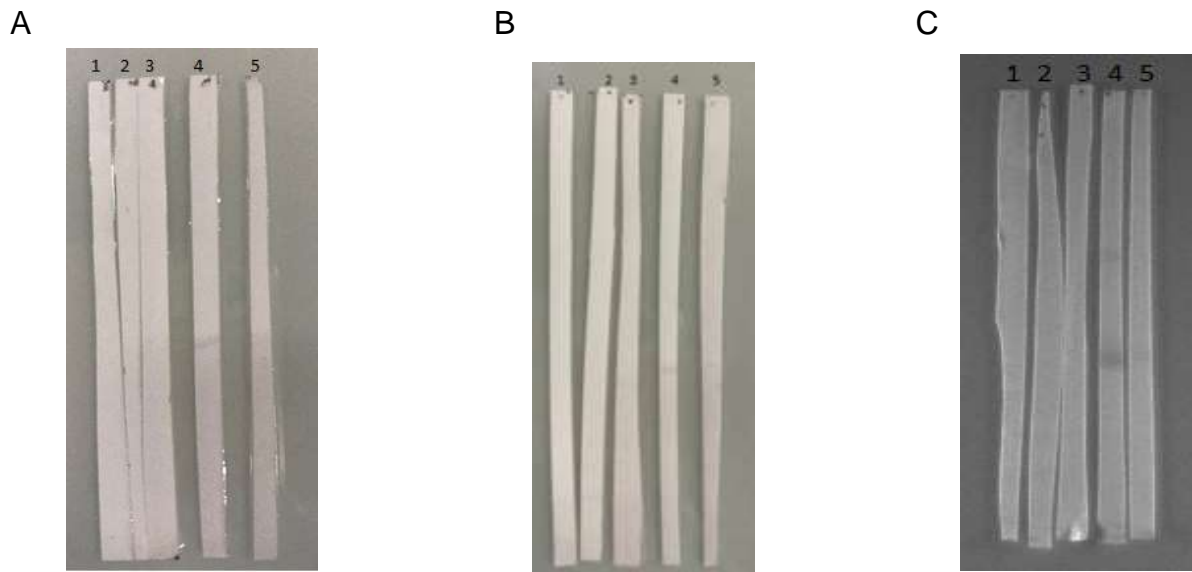
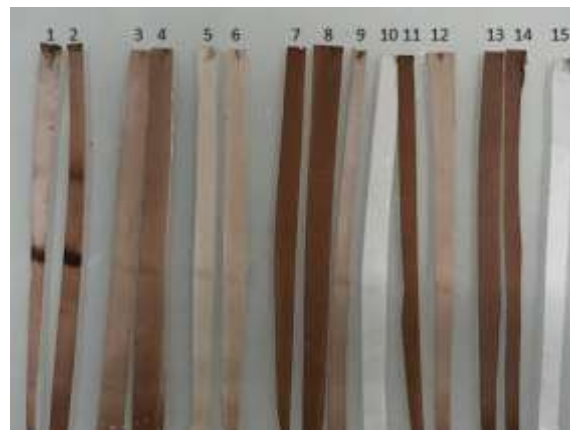


Figura 4. Reacciones de las proteínas recombinantes CP4 (A), CP7 (B) y CP9 (C) de *P. westermani* con sueros de ratas en inmunoblot. 1: Control de conjugado; 2: Suero de rata negativo 1; 3: Suero de rata negativo 2; 4: Suero de rata positivo 1; 5: Suero de rata positivo 2.

A



B



C



Figura 5. Reacciones de las proteínas recombinantes CP4 (A), CP7 (B) y CP9 (C) de *P. westermani* con sueros humanos controles positivos y negativos en inmunoblot. 1: *P. westermani*; 2: *P. westermani*; 3: *P. mexicanus*; 4: *P. mexicanus*. 5: *Fasciola hepatica*; 6: *Schistosoma japonicum*; 7: *Clonorchis sinensis*; 8: *Cisticerco*; 9: *Toxocara* sp.; 10: *Leishmania*; 11: *Spirometra erinaceieuropaei*; 12: *Entamoeba histolytica*. 13-15: sueros negativos a parásitos.

4. Discusión

Las proteínas CP4, CP7 y CP9 que se expresaron en la primera parte del presente estudio se obtuvieron desde la fracción insoluble (cuerpos de inclusión). Es importante destacar que no se realizaron exhaustivos cambios en el proceso de expresión para obtención de formas de expresión solubles, debido a que la formación de los cuerpos de inclusión (agregado proteico insoluble) no conlleva, necesariamente, desventajas al proceso, ya que las proteínas en cuerpos de inclusión están protegidas de la degradación proteolítica, y son agregados parcialmente puros de la proteína sobreexpresada (Sambrook y Russel, 2001).

El método de cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados permitió la obtención de proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 en concentraciones que variaron sobre todo entre las primeras dos y la última proteína, partiendo en todos los casos de 300 ml de cultivo inicial. Chen y colaboradores (2011) reportaron un rendimiento de 250 $\mu\text{g/ml}$ de la proteína recombinante de la catepsina B de *Clonorchis sinensis* empleando el plásmido pET-28a (+), y al igual que en el presente estudio obtuvieron proteínas insolubles en cuerpos de inclusión que tuvieron que solubilizarse con un agente desnaturante. Mientras que el estudio de Lee y colaboradores (2007) con el mismo tipo de plásmido, logró obtener 1015 $\mu\text{g/ml}$ de la

proteína recombinante de huevos de *P. westermani*, y no hubo reporte de formación de cuerpos de inclusión.

Se considera la sobreexpresión de proteínas recombinantes en *E. coli* como la causa de la deposición de estas en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión. Las proteínas que poseen residuos de cisteína, como las CPs, tienden a formar interacciones enlaces disulfuro intra e intermolecular resultando en la formación de cuerpos de inclusión (Dang *et al.*, 2012).

Las proteínas recombinantes, al formar cuerpos de inclusión, requieren de pasos extra para solubilizar la fracción insoluble, lo cual se logró utilizando un agente desnaturizante, con la desventaja de que generó más pérdidas de proteínas si se compara con el proceso de producción de una proteína soluble. Una recomendación para aumentar el rendimiento de las proteínas sería, estandarizar la producción en condiciones que permitan la no formación de los cuerpos de inclusión, y por lo tanto la obtención de proteínas solubles, por ejemplo, disminuyendo la concentración de IPTG utilizada durante la inducción o reduciendo la temperatura de inducción.

Las concentraciones de proteínas obtenidas en el presente estudio en la producción de las proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 son similares a los valores obtenidos en otros estudios de producción de proteínas recombinantes usando el sistema pET (Chen *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007). El inmunoblot anti-His de las proteínas CP4, CP7 y CP9 mostró que todas las proteínas producidas se etiquetaron correctamente con la cola de residuos de histidina, permitiendo el correcto uso del ensayo para purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.

Todas las proteínas recombinantes de *P. westermani* fueron reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de una rata infectada experimentalmente vía intraperitoneal con *P. mexicanus*, sin reaccionar con los sueros negativos de ratas no infectadas. La no reacción del suero de la segunda rata, también infectada experimentalmente vía intraperitoneal, puede deberse a que el animal no haya desarrollado un título de anticuerpos lo suficientemente alto para ser detectado en el inmunoblot o que los anticuerpos de *P. mexicanus* tengan menos afinidad por antígenos de *P. westermani* que los anticuerpos de *P. westermani*. En concordancia está lo que ocurre con los anticuerpos de *P. kelliottii*, que tienen más afinidad por antígenos de *P. kelliottii* que por antígenos de *P. westermani* (Fischer *et al.*, 2013).

Sin embargo, se demostró el potencial uso de estas proteínas recombinantes CP4, CP7 y CP9 de *P. westermani* para detectar anticuerpos de *P. mexicanus* en ratas.

En el inmunoblot con sueros humanos las tres proteínas fueron detectadas por anticuerpos presentes en sueros positivos a *P. westermani* y *P. mexicanus*, pero también por sueros positivos a otras parasitosis. La proteína CP7 resultó ser la más específica, ya que reaccionó fuerte con sueros positivos de *P. westermani* y *P. mexicanus*, y presentó reacción débil solamente con sueros positivos a fascioliasis, toxocariasis y esparganosis. La esparganosis humana es una enfermedad comúnmente endémica en países asiáticos, con casos esporádicos reportados en Sur América, África y Europa (Liu *et al.*, 2015), por lo que la reacción cruzada de la CP7 determinada en este estudio por esparganosis no tendría relevancia en la implementación del ensayo en el diagnóstico de la paragonimiasis en Costa Rica. Los signos clínicos y el historial de haber consumido cangrejos de río sería clave para diferenciar la paragonimiasis de la toxicocariasis o fascioliasis (Potong *et al.*, 2018). En un estudio anterior realizado por Ahn y colaboradores (2015) se sintetizaron 11 cisteína proteasas recombinantes de *P. westermani* (CP1 a CP11), con el fin de desarrollar una prueba diagnóstica para la paragonimiasis causada por *P. westermani*. Entre todas las 11 CPs evaluadas la CP7 fue la que obtuvo el mejor rendimiento diagnóstico, lo que coincide con los resultados del presente estudio. En ese estudio la proteína CP7 presentó reacción con sueros de paciente positivos a fascioliasis y esparganosis, pero no con sueros de pacientes con cisticercosis, clonorchiasis, esquistosomiasis, como en el presente estudio. Los resultados con los sueros de pacientes con toxocariasis y amebiasis, no se pueden comparar, ya que en el estudio mencionado no se probaron dichos sueros. La reacción cruzada de cisteínas proteasas recombinantes con sueros positivos a fascioliasis también se ha reportado en el estudio de Yun y colaboradores (2000) utilizando la proteína recombinante cruzipian-like de *P. westermani*. En base a los resultados obtenidos, se concluyó que la proteína CP7 parece ser un antígeno útil para utilizar en pruebas inmunológicas.

5. Conclusiones

- Se estableció que las cisteínas proteasas recombinantes CP4, CP7 y CP9 de *P. westermani* tienden a formar agregados insolubles durante la expresión reduciendo el rendimiento de la producción de la proteína purificada.
- Se demostró que las cisteínas proteasas de *P. westermani* son útiles para detectar anticuerpos contra *P. mexicanus* en ratas infectadas experimentalmente con *P. mexicanus*.
- El antígeno CP7 es el indicado para utilizar en el desarrollo de pruebas inmunológicas para la detección de la paragonimiasis en Costa Rica.

6. Recomendaciones

- Obtener antígenos solubles, utilizando temperaturas más bajas y diferentes concentraciones de IPTG durante el proceso de expresión de las proteínas.
- Utilizar la proteína CP7 como antígeno en una técnica inmunoenzimática para detectar anticuerpos contra *P. mexicanus*.

7. Referencias bibliográficas

- Ahn, C., Na, B., Chung, D., Kima, J., Kim, J., y Konga, Y. (2015). Expression characteristics and specific antibody reactivity of diverse cathepsin F members of *Paragonimus westermani*. *Parasitology International*, 64 (1),37-42.
- Blair, D., Nawa, Y., Mitreva, M., y Doanh, P. N. (2016). Gene diversity and genetic variation in lung flukes (genus *Paragonimus*). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 110 (1), 6-12. DOI: 10.1093/trstmh/trv101.
- Blair, D. (2014) Paragonimiasis. En R. Toledo (ed.) y B. Fried (ed.), *Digenetic Trematodes*, Vol 766. New York, USA: Springer New York. 115-152.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

- Chen, W., Wang, X., Li, X., Lv, X., Zhou C., Deng, C., Lei, H., Men, J., Fan, Y., Liang, C., y Yu, X. (2011). Molecular characterization of cathepsin B from *Clonorchis sinensis* excretory/secretory products and assessment of its potential for serodiagnosis of clonorchiasis. *Parasites & Vectors*, 149 (4).
- Dang, S., Hong, T., Bu, D., Tang, J., Fan, J., y Zhang W (2012). Optimized refolding and characterization of active C-terminal ADAMTS-18 fragment from inclusion bodies of *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82 (1), 32-36.
- Fischer, P., Curtis, K., Folk, S., Wilkins, P., Marcos, L., y Weil, G. (2013). Serological Diagnosis of North American Paragonimiasis by WesternBlot Using *Paragonimus kellicotti* Adult Worm Antigen. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 88(6), 1035-40.
- Hernández-Chea, R.D., Tesis Magister Scientiae, Caracterización morfológica y molecular de *Paragonimus mexicanus* y *Paragonimus caliensis* en cangrejos de agua dulce de Costa Rica. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2016.
- Invitrogen (2015). BL21 Star™(DE3) One Shot® pLysS Chemically Competent Cells, *Life technologies*, California, USA.
- Invitrogen (2015). S.O.C. medium, Invitrogen Corporation, California, USA.
- Itoh, N., Tsukahara, M., Yamasaki H., Morishima, Y., Sugiyama, H., y Kurai, H. (2016). *Paragonimus westermani* infection mimicking recurrent lung cancer: A case report. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22, 815-818.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680.
- Lee, J., Lee, J., Kim, S., Yong, Tai-Soon. (2007). Molecular cloning and characterization of a major egg antigen in *Paragonimus westermani* and its use in ELISA for the immunodiagnosis of paragonimiasis. *Parasitology Research*, 100(4): 677-81. doi 10.1007/s00436-006-0324-7.
- Lee, E., Na, B., Bae, Y., Kim, S., Je, E., Ju, J., Cho, S., Kim, T., Kang, S., Cho, S. y Kong, Y. (2006). Identification of immunodominant excretory–secretory

- cysteine proteases of adult *Paragonimus westermani* by proteome analysis. *Proteomics*, 6, 1290-1300.
- Liu, Q., Li, M.W., Wang, Z.D., Zhao, G.H., y Zhu, X.Q. (2015). Human sparganosis, a neglected food borne zoonosis. *The Lancet Infectious Diseases*.15(10): 1226-1235. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00133-4.
- Narain, K., Devi, K.R., y Mahanta, J. (2005). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human paragonimiasis. *Indian Journal of Medical Research*, 121(6), 739-46.
- Novagen pET System Manual,11 ma ed. (2005). *Biosciences*, Darmstadt, Germany.
- Pothong, K., Komalamisra, C., Kalambaheti, T., Watthanakulpanich, D., Yoshino, T. P., y Dekumyoy, P. (2018). ELISA based on a recombinant *Paragonimus heterotremus* protein for serodiagnosis of human paragonimiasis in Thailand. *Parasites & Vectors*, 11(322).
- Qiu, X., Nakamura-Uchiyama, F., Nawa, Y., y Itoh, M. (2016). A tool for mass-screening of paragonimiasis: an enzyme-linked immunosorbent assay with urine samples. *Tropical Medicine and Health*, 44(19), Acceso 12 Diciembre, 2016, desde: doi 10.1186/s41182-016-0019-4.
- Sambrook, J., y Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3ra ed. New York, United States of America: Cold Spring Harbor.142-144.
- Shareef, P., y Abidi, S. (2014). Cysteine protease is a major component in the excretory/secretory products of *Euclinostomum heterostomum* (*Digenea: Clinostomidae*), *Parasitology Research*, 113(1), 67-71.
- Thermo Scientific (2015). HisPur™ Ni-NTA Purification Kit, Rockford,USA.
- Thermo Scientific (2016). Imperial™ Protein Stain, Rockford,USA.
- Thermo Scientific (2015). B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent, Rockford,USA.
- Thermo Scientific (2015). Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Rockford,USA.
- Thermo Scientific (2017). Novex™ WedgeWell™ Tris-Glycine Gels, Rockford,USA.

- Torgerson, P. R., Devleesschauwer, B., Praet, N., Speybroeck, N., Willingham, A. L., y Kasuga, F. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Medicine*, 12(12), e1001920.
- Ulate, E., Rojas, B. G., Hernández-Cheaa, R., Jiménez-Rocha C., A., y Dolz G. (2015). Diagnosis of Human Paragonimiasis in Costa Rica using a Intradermal Test and Immunoblot. *Journal of Harmonized Research in Medical & Health Sciences*, 2(3), 122–131.
- Wang, X., Zheng, X., y Huang, J. (2018). Cerebral paragonimiasis with subcutaneous paragonimiasis on the face: a case of ectopic paragonimiasis in a child. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 11(3), 2877-2881.
- Yang, S., Park, J., Lee, J., Jeon, B., Kim, W., Yum, K., Jeong, E., y Lee, K.. (2004). Cloning and characterization of a new cysteine proteinase secreted by *Paragonimus westermani* adult worms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(1), 87-92.
- Yu, S., Zhang, X., Chen, W., Zheng, H., Ai1, G., Ye1, N., y Wang, Y. (2016). Development of an immunodiagnosis method using recombinant PsCP for detection of *Paragonimus skrjabini* infection in human. *Parasitology Research*. Acceso 14 Diciembre de 2016, desde: doi 10.1007/s00436-016-5300-2.
- Yun, D-H., Chung, J-Y., Chung, Y-B., Bahk, Y-Y., Kang, S-Y., Kong, Y., y Cho, S-Y. (2000). Structural and immunological characteristics of a 28-kilodalton cruzipain-like cysteine protease of *Paragonimus westermani* expressed in the definitive host stage. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(6), 932-39.

ARTÍCULO 2

Implementación de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) utilizando la cisteína proteasa recombinante 7 de *Paragonimus westermani* para la detección de anticuerpos contra *Paragonimus* spp. en humanos.

Resumen

La paragonimiasis es una importante trematodiasis de transmisión alimentaria causada por parásitos del género *Paragonimus*. La enfermedad en Costa Rica es causada por parásitos de la especie *Paragonimus mexicanus*. En nuestro país y en Latinoamérica, sin embargo, no existen ni están disponibles técnicas inmunológicas para diagnosticar la parasitosis en humanos. Estudios previos, que utilizaron la cisteína proteasa 7 (CP7) recombinante de *Paragonimus westermani* como antígeno, mostraron resultados prometedores en el diagnóstico de anticuerpos de *P. mexicanus* en inmunoblot. El objetivo del presente trabajo fue utilizar la CP7 de *P. westermani* en la estandarización de la técnica inmunoenzimática de ELISA para detectar anticuerpos contra *Paragonimus* spp. Una vez estandarizada la técnica, se analizaron sueros humanos positivos a *P. westermani*, *P. mexicanus*, y sueros humanos infectados con otras helmintiasis (fascioliasis, esquistosomiasis, clonorchiasis, cisticercosis, toxocariasis, leishmaniosis, esparganosis, amebiasis), como también sueros de humanos sin infecciones parasitarias. La sensibilidad del ELISA fue de 71.4%, la especificidad de 100.0%, el valor predictivo positivo de 100.0% y el valor predictivo negativo de 77.8%. Este representa el primer reporte del desarrollo de un ELISA para el diagnóstico de *Paragonimus* spp. en Costa Rica y Centroamérica. Se recomienda evaluar el desempeño de un antígeno recombinante de *P. mexicanus* para utilizar en este ELISA.

Palabras clave: *Paragonimus mexicanus*, CP7, sensibilidad, especificidad, valor predictivo.

Abstract

Paragonimiasis is an important food-borne trematodiasis caused by parasites of the genus *Paragonimus*. The disease in Costa Rica is caused by parasites of the species *Paragonimus mexicanus*. Immunological techniques to diagnose

paragonimiasis in humans are not available in our country and Latinamerica, however, previous studies, which used recombinant cysteine protease 7 (CP7) of *P. westermani*, showed promising results in the diagnosis of antibodies of *P. mexicanus* in inmunoblot. The objective of the present study was to use *P. westermani* CP7 for the detection of antibodies against *Paragonimus* spp. by the ELISA immunoenzymatic technique. Once the ELISA was standardized, *P. westermani* and *P. mexicanus* positive human sera, human sera infected with other helminthiasis (fascioliasis, schistosomiasis, clonorchiasis, cysticercosis, toxocariasis, leishmaniasis, sparganosis, amoebiasis) and sera from humans without parasitic infections were analyzed. The sensitivity and specificity of the standardized ELISA was 71.4% and 100.0%, respectively, the positive and negative predictive value was 100.0% and 77.8%, respectively. This represents the first report of an ELISA for the diagnosis of human paragonimiasis developed in Costa Rica and Central America. It is recommended to evaluate the performance of a recombinant *P. mexicanus* antigen to use in this ELISA.

Keywords: *Paragonimus mexicanus*, CP7, sensitivity, specificity, predictive value.

1. Introducción

La paragonimiasis es una importante parasitosis transmitida por alimentos causadas por trematodos del género *Paragonimus*, además se considera una enfermedad desatendida, pero emergente a nivel global (Sah *et al.*, 2017; Morter *et al.*, 2018). La enfermedad es ocasionada por el consumo de crustáceos crudos o mal cocinados conteniendo las metacercarias infectantes, y es la enfermedad alimentaria trasmitida por trematodos que más afecta a las personas, causando un estimado de 1 millón de años de vida ajustados por discapacidad a nivel mundial (Torgerson *et al.*, 2015).

La especie *Paragonimus mexicanus* se considera la especie patogénica de Sur y Centroamérica, la cual ocasiona infecciones ectópicas, siendo el sistema nervioso central el más comúnmente afectado (Calvopiña *et al.*, 2018; Bahr *et al.*, 2017).

Debido a que la paragonimiasis no cursa con signos clínicos muy específicos, y como presenta una amplia variedad de hallazgos radiológicos, es muy común un diagnóstico erróneo. Cuando el tamaño de la lesión pulmonar es grande se confunde

en humanos con tuberculosis o neoplasias malignas (Kwon *et al.*, 2019; Luo *et al.*, 2016). El diagnóstico definitivo de la paragonimiasis se basa en la detección de huevos dorados y operculados, en heces, esputo, fluidos aspirados o biopsias, sin embargo la sensibilidad del diagnóstico de huevecillos por microscopia es baja (28-38%) (Oey *et al.*, 2018; Sahn *et al.*, 2017), sobre todo, porque en la mayoría de los casos no hay eliminación de huevos en heces o esputo, lo que imposibilita el diagnóstico por microscopia (Chen *et al.*, 2013). En estos casos ectópicos o extrapulmonares ocurre la migración del parásito a diferentes tejidos del hospedador, con afectación del cerebro, que es la forma más común y seria, u otras formas clínicas de difícil diagnóstico (Friant *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). La imposibilidad de realizar un diagnóstico mediante microscopia en la paragonimiasis ectópica y en el período prepatente de la paragonimiasis pulmonar, convierte el inmunodiagnóstico en una importante herramienta para el diagnóstico de la parasitosis (Pothong *et al.*, 2018).

Hasta la fecha se han utilizado tres pruebas inmunológicas: la intradérmica, el inmunoblot y el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Chai, 2013). La prueba intradérmica es la menos utilizada, debido a que la reacción puede perdurar por muchos años después de la eliminación del parásito y debido a su baja especificidad por reacciones cruzadas con otros trematodos, especialmente si el antígeno no ha sido purificado (Blair, 2019). Las pruebas de inmunoblot y de ELISA son las más utilizadas, destacándose la última, que en la actualidad es reconocida como una de las herramientas diagnósticas más útiles para el diagnóstico de helmintiasis, incluyendo la paragonimiasis (Chai, 2013). Sin embargo, la sensibilidad y especificidad del ELISA depende del tipo de antígeno utilizado, de su concentración, de las diluciones del suero y la concentración del conjugado, que deben de ser estandarizados correctamente (Narain *et al.*, 2005).

Para el diagnóstico de la paragonimiasis mediante pruebas inmunológicas se han utilizado diferentes antígenos: extractos crudos del parásito, proteínas excretoras-secretoras del parásito, y proteínas recombinantes (incluyendo las cisteína proteasas) (Blair, 2019). El uso de extractos crudos del parásito como antígeno, tienen la desventaja de que no son muy específicos, ya que presentan reacciones cruzadas con otros parásitos, que comparten antígenos similares (Yu *et al.*, 2016). El uso de antígenos purificados, especialmente las cisteínas proteasas del parásito han

demostrado incrementar la sensibilidad y especificidad diagnóstica (Kim *et al.*, 2002). Las cisteínas proteasas se conocen por participar en un amplio rango de procesos biológicos: invasión y migración a través de los tejidos del huésped, y modulación del sistema inmune y absorción de nutrientes (Yun *et al.*, 2000).

En estudios previos se utilizaron los antígenos excretorios-secretorios producidos mediante infección experimental de animales y cultivo de los parásitos *in vitro*, obteniéndose, sin embargo, una baja cantidad de proteínas (Intapan *et al.*, 2013; Ulate *et al.*, 2015). Con el objetivo de reducir el tiempo para la obtención de estas proteínas y evitar los experimentos con animales, se han utilizado técnicas recombinantes, que logran producir gran cantidad de proteínas de alta calidad en un corto tiempo (Kim *et al.*, 2002; Potong *et al.*, 2018). Hasta la fecha se han sintetizado diferentes tipos de cisteína proteasas recombinantes, las cuales han sido utilizadas en el inmunodiagnóstico de la paragonimiasis. La catepsina L recombinante de *Paragonimus pseudoheterotremos* mostró en ELISA una sensibilidad y especificidad de 100% y 95.6%, respectivamente (Yoonuan *et al.*, 2016); mientras que las cisteína proteasas recombinantes de *Paragonimus skrjabini* mostraron una sensibilidad y especificidad de 95.5% y 100%, respectivamente (Yu *et al.*, 2016), y las 11 catepsinas F de *Paragonimus westermani* (cisteínas proteasas PwCP 1-11) sensibilidades y especificidades de 38.4–84.5% y 87.2–100%, respectivamente (Ah *et al.*, 2015). Otra ventaja es, que las cisteínas proteasas son altamente conservadas por lo que la mayoría de las especies del género *Paragonimus* poseen antígenos compartidos, lo que facilita diagnosticar una especie con el antígeno de otra especie (Potong *et al.*, 2018).

En Costa Rica la paragonimiasis parece ser una enfermedad subdiagnosticada (Ulate *et al.*, 2015, Hernández-Chea, 2016), con el agravante, de que no existen técnicas inmunológicas para diagnosticar esta parasitosis. Resultados previos demostraron que la proteína recombinante cisteína proteasa 7 (CP7) de *P. westermani* es un antígeno útil para detectar anticuerpos contra *P. mexicanus*, por lo que el presente estudio tuvo como objetivo implementar una prueba de ELISA utilizando este antígeno, lo que permitiría diagnosticar la paragonimiasis en forma temprana en pacientes de Costa Rica.

2. Materiales y métodos

2.1 Obtención y cuantificación de la CP7 de *P. westermanni*

La secuencia parcial del gen que codifica para la proteína PwCP7 (AAY81945), se obtuvo en el Centro Nacional de Información Biotecnológica. Para la producción de esta proteína recombinante CP7, se utilizó el plásmido pET-28a (+) (Novagen, Madison, WI, USA), dirigido a la expresión inducible de proteínas recombinantes en *E. coli*, este plásmido posee un sistema de expresión basado en el promotor de la enzima RNA polimerasa del bacteriófago T7. Para realizar la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (Ni-NTA), se marcó la proteína con una secuencia de aminoácidos histidina en los extremos N- y C-terminal, los cuales tienen afinidad por este metal. La secuencia del gen se optimizó para su expresión en *E. coli* y se subclonó en el vector de expresión (Genscript, New Jersey, US). Se utilizó el plásmido original para la expresión de la proteína de interés en *E. coli* BL21 (DE3).

Después de la cuantificación del plásmido (PwCP7-pET), se realizó una dilución 1:10 en Tris (pH 8), para que la concentración del ADN plásmidico fuera de aproximadamente 10 ng/μl. Se prepararon las bacterias competentes *E. coli* BL21 usando el protocolo de cloruro de calcio y cloruro de magnesio (Sambrook y Russell, 2001). Las bacterias competentes se transformaron mediante choque térmico 30 segundos a 42°C, con incubación previa de 30 minutos a 0°C, para incorporar el plásmido siguiendo las recomendaciones del protocolo BL21 Star (DE3) One Shot pLysS Chemically Competent Cells (Invitrogen, 2016), con las siguientes modificaciones: se añadieron 500 μl de medio S.O.C (caldo súper óptimo con represor catabólico, Invitrogen, 2016) y la incubación final se hizo a 37°C por 1 hora con agitación constante.

La inducción de la expresión de la proteína en las bacterias transformadas se realizó según el protocolo del fabricante pET System Manual (Novagen, 2005). El volumen final de cultivo fue de 300 ml. La proteína CP7 expresada, se extrajo de las bacterias, utilizando el detergente no iónico B-PER Complete (Bacterial Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific, 2016), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Como la proteína CP7 no estaba en la fracción soluble, se procedió a eliminar proteínas y sustancias insolubles, y se solubilizó la proteína de interés utilizando el agente desnaturizante urea (8M). Los botones obtenidos en la extracción realizada con B-PER Complete se limpiaron con 500 µl del buffer 1 (urea 2 M, Tris 100 mM, EDTA 5 mM, DTT 5 mM y Triton-X100 1%), se vortexeó para eliminar impurezas asociadas a los cuerpos de inclusion (CI), y se centrifugaron a 13148 g por 15 minutos a 10°C, guardando el sobrenadante para análisis en SDS-PAGE. Este proceso se repitió utilizando el buffer 2 (urea 2 M, Tris 100 mM) para eliminar remanentes de DTT y Triton X-100, lo cuales son incompatibles con la cromatografía de afinidad. Para la resuspensión de los CI se utilizó el buffer 3 (Tris 100 mM, urea 8 M), se incubó durante una hora a temperatura ambiente con agitación, se centrifugó a 13148 g por 15 minutos y se guardó a -20°C el sobrenadante conteniendo la proteína solubilizada en urea 8 M y Tris 100 mM para la evaluación de la muestra en SDS-PAGE y también para la purificación. La proteína solubilizada se purificó por cromatografía de afinidad utilizando columnas HisPur Ni-NTA, siguiendo las recomendaciones del ensayo HisPur Ni-NTA Purification Kit (Thermo Scientific, 2016), con algunas modificaciones.

Para eliminar proteínas de *E. coli* que no contenían residuos His, se realizaron 3 lavados, seguidos de cuatro eluciones para recuperar la proteína ligada a la columna. La eliminación de la urea 8 M de las eluciones se realizó mediante diálisis, siguiendo el protocolo incluido en el ensayo Zeba Spin Desalting Columns (Thermo Scientific, 2016), utilizando 10 mM Tris HCl, pH 8 y 1 mM de EDTA como solución de diálisis. Se realizó la diálisis para la remoción de la urea y del imidazol de las eluciones de la proteína recombinante CP7 antes de su uso en el ELISA, ya que estos componentes, principalmente la urea, pueden afectar las reacciones antígeno-anticuerpo (Bata *et al.*, 1964).

El análisis de la proteína CP7 purificada con la columna HisPur Ni-NTA y dializada se realizó mediante SDS-PAGE y la cuantificación de la proteína se realizó con el ensayo colorimétrico Coomassie Protein Assay Kit (Thermo Scientific, 2016).

2.2. Uso de la proteína recombinante CP7 como antígeno en un ELISA indirecto

2.2.1. Sueros analizados

Como sueros controles positivos se utilizaron 8 sueros de humanos infectados naturalmente con *P. westermani* y 6 sueros de humanos infectados naturalmente con *P. mexicanus*, los 14 sueros fueron donados por el doctor Sugiyama Hiromu, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Tokio, Japón.

Como sueros controles negativos se utilizaron 11 sueros humanos negativos a *Paragonimus* spp. pero positivos a otras helmintiasis (*Cysticercus* [1], *Leishmania* sp. [1], *Entamoeba histolytica* [1], *Clonorchis sinensis* [1], *Shistosoma japonicum* [1], *Toxocara* sp. [1], *Toxocara canis* [1], *Fasciola* sp. [2], y *Spirometra erinaceieuropaei* [2]) y 3 sueros de individuos sin parasitosis, los cuales también fueron donados por el doctor S. Hiromu, Tokio, Japón.

2.2.2. Estandarización del ELISA

Se utilizaron las placas de microtitulo para ELISA Corning 2592 (Massachusetts, EUA), las cuales se sensibilizaron con diferentes concentraciones de la proteína recombinante CP7 (1 µg a 0.48 ng/100 µl) diluída en solución de carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9.6) o en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) por 16 horas a 4°C. Después de la adsorción del antígeno se procedió a lavar 3 veces con solución de lavado (PBS, Tween-20 0.05 %), y a bloquear con diferentes soluciones (10 % leche polvo descremada, 10% caseína hidrolizada, 10 % albumina bovina, 10 % suero fetal bovino) durante 16 horas a 4°C. Se eliminó la solución de bloqueo, seguidamente se procedió a añadir los sueros, los cuales se diluyeron en la solución de incubación, la cual consistió de PBS, Tween-20 0.05% y agente bloqueador al 5% (leche descremada, caseína hidrolizada, albumina bovina, suero fetal bovino). Se probaron diferentes diluciones de sueros (1:100, 1:200, 1:400), y se incubaron durante una hora a 37°C, seguidamente se procedió a lavar como descrito arriba.

Se utilizó el conjugado anti-humano IgG-Peroxidasa producido en cabra (Sigma Aldrich, 2017), el cual se diluyó en solución de incubación y se incubó 30 minutos a 37°C. Se probaron 3 diferentes diluciones del conjugado (1:10 000, 1: 20

000 y 1:40 000). Los pozos se volvieron a lavar tres veces, seguidamente se agregó el sustrato 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma Aldrich, 2017) y se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 10 minutos. La reacción se detuvo con 50 μ l de H₂SO₄ 2 M. La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm en el lector de placas (Multiskan Ex, Thermo scientific). Una vez optimizada la prueba se analizaron los sueros positivos y negativos por cuatuplicado. Obtenidas las densidades ópticas, los resultados se expresaron como media de la absorbancia de los cuatuplicados multiplicado por 1000, lo que se denominó Unidades de ELISA (UE). Finalmente, se estableció el cociente P/N, la división de las UE del suero control positivo (P) entre las UE del suero control negativo (N).

El punto de corte se calculó utilizando la media de las UE de los sueros negativos más tres desviaciones estándar (DS). Sueros cuyos UE fueron mayores al punto de corte se consideraron positivos. La sensibilidad (Se), la especificidad (Es), el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) de la prueba se determinaron utilizando una tabla de contingencia de 2x2, y el programa de análisis estadístico WinEpi 2.0.

3. Resultados

La proteína CP7 mostró fuertes bandas de 28 kDa después de la purificación en las eluciones E1, E2, E3 y E4, indicando una purificación eficiente y específica (Figura 1). La cantidad de proteínas obtenidas en las eluciones E1 y E2 de CP7, posterior a diálisis, fue de 200 μ g/ml, obteniéndose un total de 400 μ g.

El utilizar el tampón de PBS para adsorber el antígeno CP7 a la placa de microtítulo resultó más favorable, que el tampón de carbonatos, ya que mostraron mayores diferencias en el cociente de unidades de ELISA (UE) en sueros control positivo y negativo (P/N) (Figura 2).

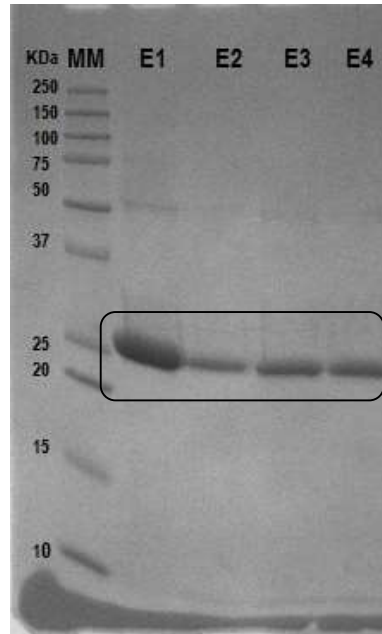


Figura 1. SDS-PAGE para el análisis de la purificación de la proteína recombinante CP7 mediante cromatografía de afinidad. M: Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained; E1, E2, E3, E4 proteínas presentes en eluciones 1, 2, 3 y 4.

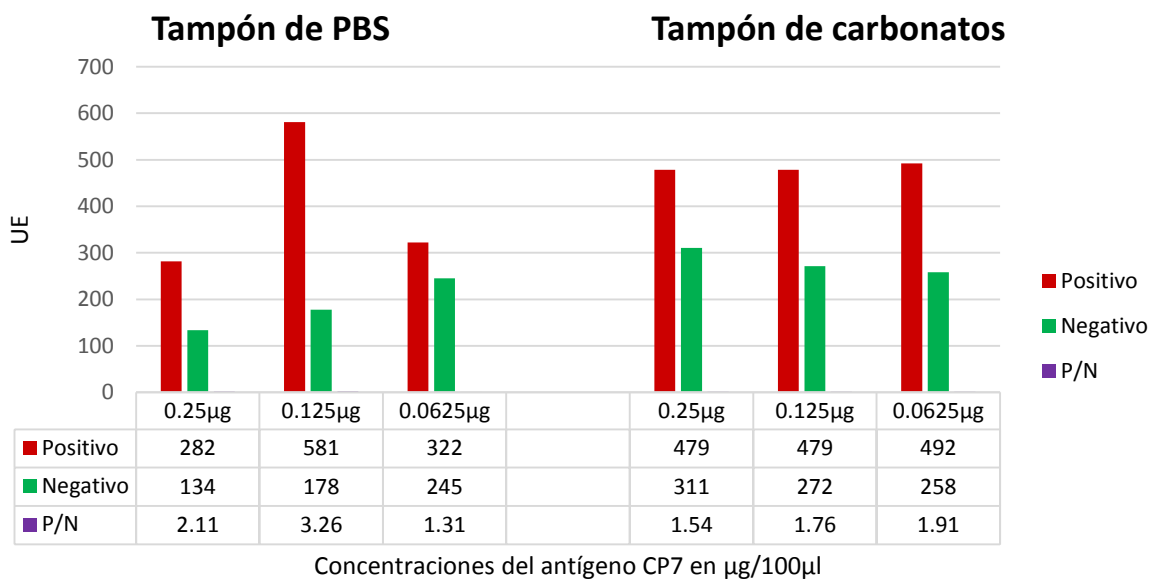


Figura 2. Resultados del ELISA utilizando diferentes soluciones (PBS o tampón de carbonatos) para adsorber el antígeno a las placas de microtítulo y diferentes concentraciones del antígeno CP7 (en µg por pozo). Bloqueo con leche polvo descremada al 10% en PBS, dilución 1:100 de los sueros, y 1:40.000 del conjugado. UE: Unidades de ELISA; Positivo: suero control positivo; Negativo: Suero control negativo; P/N: cociente de UE Positivo y UE Negativo.

La titulación del antígeno CP7 en PBS se muestra en la Figura 3. Las concentraciones de 1 μg hasta 0.062 μg antígeno por pozo mostraron las mayores diferencias P/N. Como la limitante de este ensayo es el antígeno se decidió utilizar la concentración de 0.125 μg CP7 por pozo.

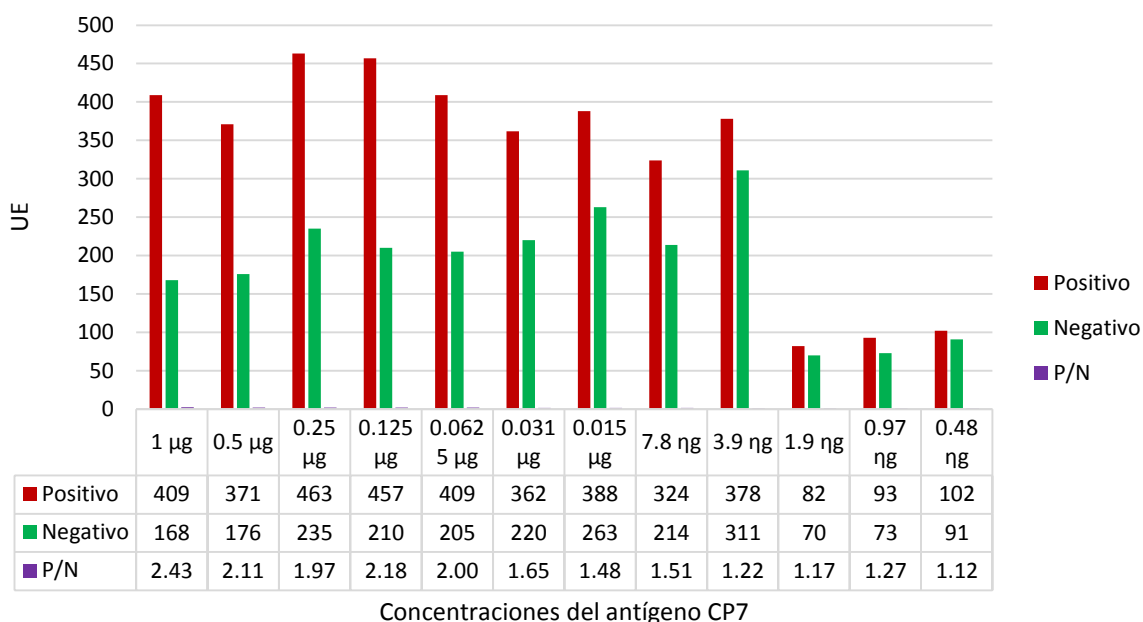


Figura 3. Resultados del ELISA utilizando diferentes concentraciones del antígeno CP7 (en μg o ng por pozo) en PBS. Bloqueo con leche polvo descremada al 10% en PBS, dilución 1:100 de los sueros, y 1:40.000 del conjugado. UE: Unidades de ELISA; Positivo: suero control positivo; Negativo: Suero control negativo; P/N: cociente de UE Positivo y UE Negativo.

Cuando se analizaron las diferentes soluciones bloqueadoras (leche descremada, caseína hidrolizada, albumina bovina, suero fetal bovino), todas en concentraciones del 10%, la albumina bovina presentó la mayor diferencia P/N, sin embargo, la leche descremada tuvo valores negativos más bajos y mostró valores P/N similares a la albumina bovina, además por su bajo costo, se decidió utilizar como solución bloqueadora la leche descremada diluída en PBS (Figura 4).

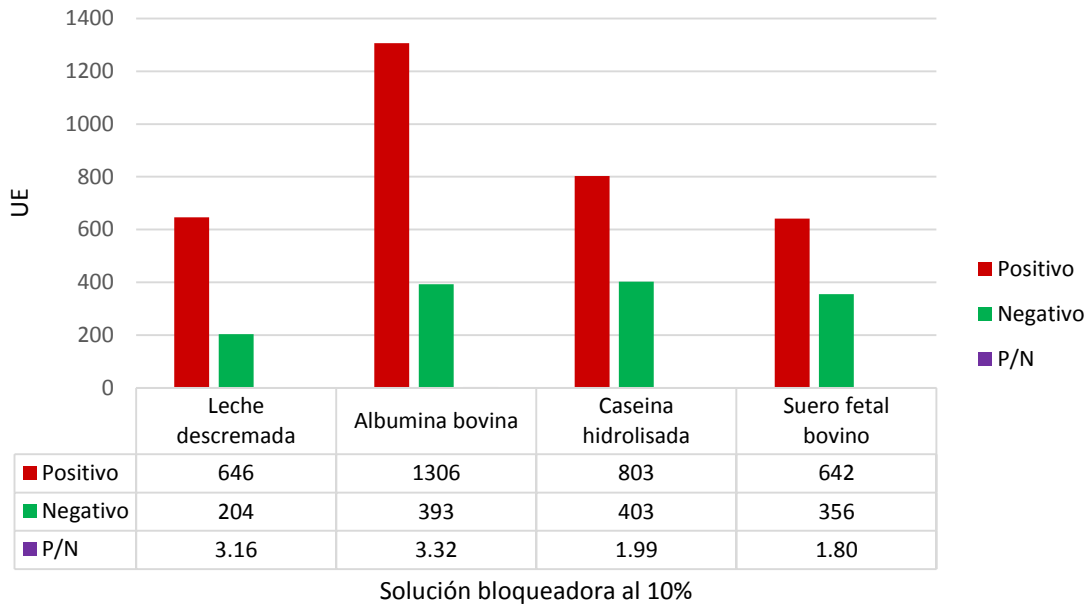


Figura 4. Resultados del ELISA utilizando diferentes soluciones bloqueadoras (leche descremada, albumina bovina, caseína hidrolisada, suero fetal bovino) al 10% en PBS. Antígeno CP7 0.125 μg por pozo en PBS, dilución 1:100 de los sueros, y 1:40.000 del conjugado. UE. Unidades ELISA; Positivo: suero control positivo; Negativo: Suero control negativo; P/N: cociente de UE Positivo y UE Negativo.

Los resultados de la titulación de los sueros (control positivo y control negativo) y del conjugado se muestran en las Figuras 5 y 6, respectivamente. La dilución 1:100 de los sueros fue la que presentó mayor diferencia P/N, (Figura 5), por lo que fue la que se utilizó en el ELISA, mientras que la dilución 1:40.000 del conjugado fue la que presentó mayor diferencia P/N y los valores negativos más bajos (Figura 6), por lo que se decidió utilizar esa dilución.

En el ELISA estandarizado las muestras positivas a la prueba fueron las muestras que presentaron valores de unidades de ELISA superiores al valor de corte (798), y las negativas valores inferiores al valor de corte. Por lo tanto, todos los controles negativos salieron negativos a la prueba (Cuadro 1, Figura 7), y de los 14 controles positivos probados, 4 (2 *P. mexicanus* y 2 *P. westermani*) no salieron positivos a la prueba (Cuadro 2, Figura 7).

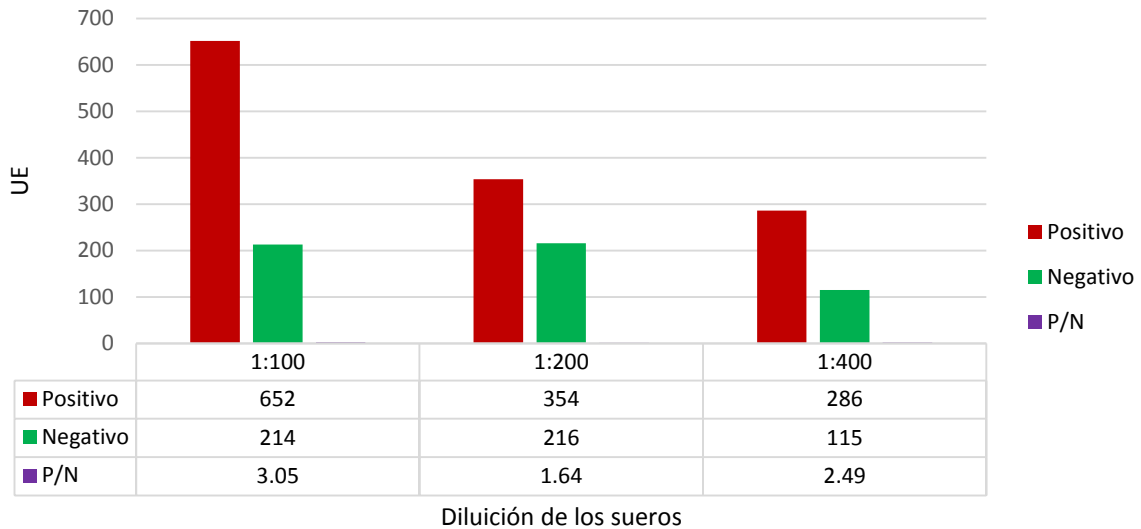


Figura 5. Resultados del ELISA utilizando diferentes diluciones de los sueros. Bloqueo con leche polvo descremada al 10% en PBS, antígeno CP7 0.125 µg por pozo en PBS, y dilución 1:40.000 del conjugado. UE. Unidades ELISA; Positivo: suero control positivo; Negativo: Suero control negativo; P/N: cociente de UE Positivo y UE Negativo.

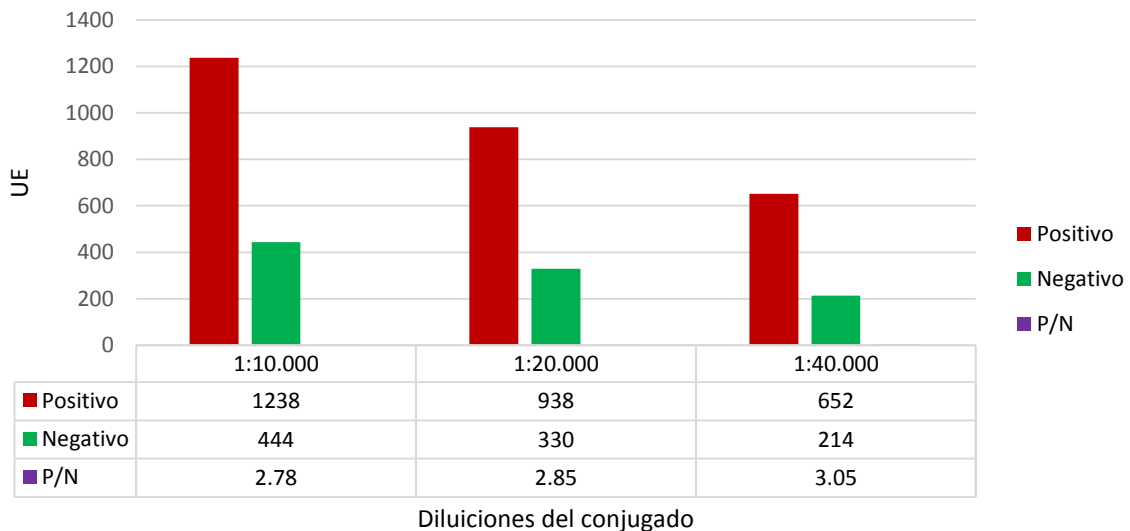


Figura 6. Resultados del ELISA utilizando diferentes diluciones del conjugado. Bloqueo con leche polvo descremada al 10% en PBS, antígeno CP7 0.125 µg por pozo en PBS, y dilución 1:100 del suero. UE. Unidades ELISA; Positivo: suero control positivo; Negativo: Suero control negativo; P/N: cociente de UE Positivo y UE Negativo.

El ELISA se estandarizó de la siguiente forma: el antígeno CP7 se diluyó en PBS y se adsorbió en una concentración de 0.125 µg/100µl a la placa de microtítulo.

Después de una incubación de 16 horas a 4°C, la placa se lavó 3 veces (PBS, Tween-20 0.05 %), se bloqueó por 16 horas a 4°C con leche descremada al 10%, y se procedió a eliminar el bloqueo sin lavar la placa. Los sueros se diluyeron 1:100 en solución de incubación (PBS, Tween-20 0.05% y leche descremada al 5%), se incubaron por 1 hora a 37°C, se lavaron los pozos 3 veces y se agregó el conjugado diluido 1:40.000 en solución de incubación, incubando 30 minutos a 37°C, lavando otra vez tres veces y añadiendo el sustrato TMB, el cuál se incubó a temperatura ambiente en oscuridad por 10 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de H₂SO₄ 2 M. La lectura de la absorbancia se realizó a 450 nm. Los sueros positivos y negativos se analizaron por cuatriplicado.

Los 14 sueros controles negativos analizados en ELISA arrojaron UE entre 120 y 650. La media de los sueros negativos y la desviación estándar de estos sueros se muestran en el Cuadro 1. Como punto de corte del ensayo se estableció 798 UE. Sueros con UE mayores a 798 se consideraron positivos a *Paragonimus* spp. De los 14 sueros negativos, once eran de pacientes con otras parasitosis, todos resultaron negativos en el ELISA (Cuadro 1, Figura 7), mientras que de los 14 sueros positivos a *Paragonimus* spp. diez se determinaron como positivos y cuatro como negativos (2 *P. mexicanus* y 2 *P. westermani*) (Cuadro 2, Figura 7).

Se estableció una sensibilidad del ELISA de 71.4%, una especificidad de 100%, un valor predictivo positivo (VPP) de 100% y un valor predictivo negativo (VPN) de 77.8%.

Cuadro 1. UE, media, desviación, punto de corte, y resultado determinado con los sueros negativos analizados en ELISA.

Tipo suero	UE	Resultado ELISA
Sano 1	290	negativo
Sano 2	220	negativo
Sano 3	300	negativo
<i>Cysticercus</i>	330	negativo
<i>Leishmania</i> sp.	120	negativo
<i>Entamoeba histolytica</i>	210	negativo
<i>Clonorchis sinensis</i>	470	negativo
<i>Schistosoma japonicum</i>	240	negativo
<i>Toxocara</i> sp.	260	negativo
<i>Toxocara canis</i>	360	negativo
<i>Fasciola</i> sp. 1	380	negativo
<i>Fasciola</i> sp. 2	650	negativo
<i>Spirometra erinaceieuropaei</i> 1	400	negativo
<i>Spirometra erinaceieuropaei</i> 2	650	negativo
<p>UE= Unidades de ELISA Media (\bar{X}) = 348.57 Desviación (s) = 149.75 Punto de corte ($\bar{X} + 3s$) = 797.84</p>		

Cuadro 2. UE y resultado determinado con los sueros positivos analizados en ELISA.

Tipo suero	UE	Resultado ELISA
<i>P. mexicanus</i> 1	930	positivo
<i>P. mexicanus</i> 2	2590	positivo
<i>P. mexicanus</i> 3	1490	positivo
<i>P. mexicanus</i> 4	2100	positivo
<i>P. mexicanus</i> 5	440	negativo
<i>P. mexicanus</i> 6	350	negativo
<i>P. westermani</i> 1	810	positivo
<i>P. westermani</i> 2	590	negativo
<i>P. westermani</i> 3	2080	positivo
<i>P. westermani</i> 4	1700	positivo
<i>P. westermani</i> 5	900	positivo

<i>P. westermani</i> 6	1360	positivo
<i>P. westermani</i> 7	1090	positivo
<i>P. wesermani</i> 8	590	negativo

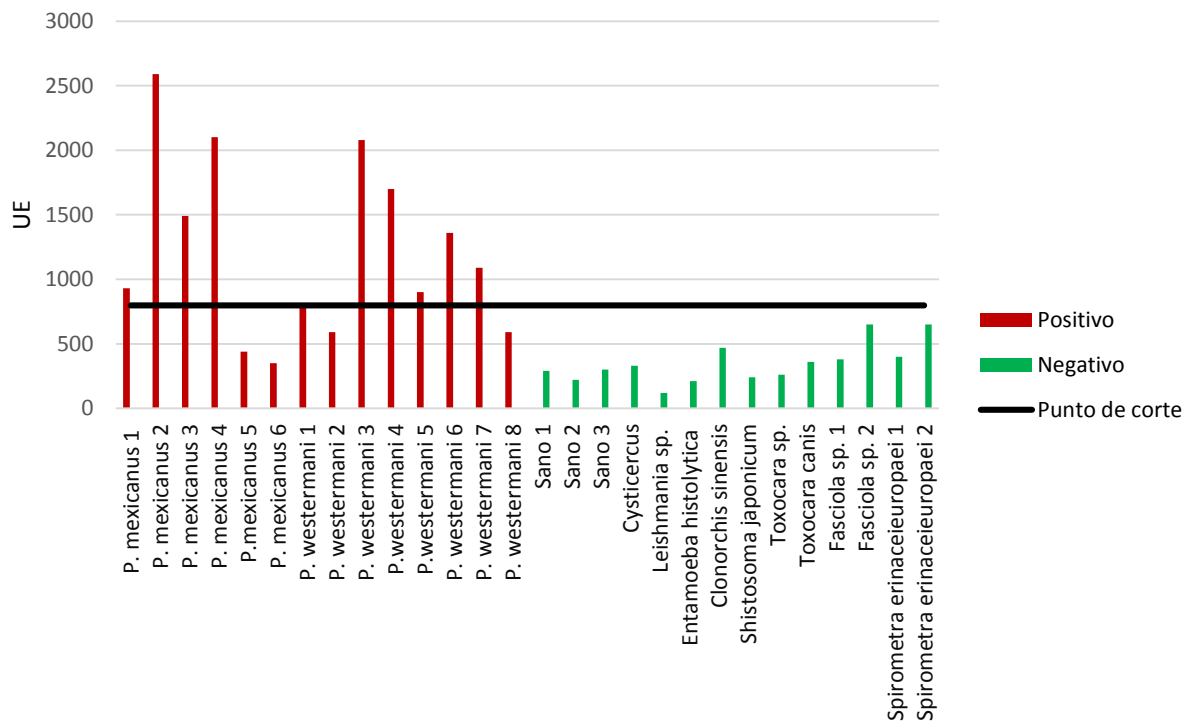


Figura 7. Resultados de los sueros analizados en el ELISA. Los sueros controles positivos se presentan en color rojo mientras que los sueros controles negativos se presentan en color verde.

4. Discusión

El uso exitoso de las cisteína proteasas recombinantes de *P. westermani* como antígeno diagnóstico ha sido reportado en la literatura (Ah *et al.*, 2015), por lo que se produjo y purificó la CP7 de *P. westermani* para emplearla en un ELISA para evaluar sueros humanos positivos a *Paragonimus spp.* El rendimiento de la producción de la CP7 fue de 200 mg/l de cultivo inicial, lo que representa un total de 400 µg de proteína purificada y libre de sales a partir de 300 ml de cultivo inicial. Como el ELISA estandarizado utiliza 0.125 µg de proteína por pozo se podrían evaluar 3200 sueros con este antígeno. Otro estudio realizado en condiciones similares utilizando el vector de expresión pET28a (+) en *E. coli* BL21, reportó un rendimiento de 6 mg/l en la producción de la proteína ribosómica S4 de las plántulas de trigo (Yadaiah *et al.*, 2012), y no hubo reporte de la formación de proteínas insolubles. Mientras que el

estudio de Imani y colaboradores (2017) también en condiciones similares al presente estudio, reportó un rendimiento de 4 g/l en la producción de la fragaceatoxina C, una toxina proteica de anémona de mar. Las diferencias entre los valores de rendimiento que se obtuvieron en los diferentes estudios, pueden estar relacionados a la solubilidad de las proteínas producidas o a la mayor superexpresión de la proteína (Zhu *et al.*, 2013).

Al estandarizar el presente ELISA se siguió el protocolo descrito por Yu *et al.*, (2016). Sin embargo, aunque se probaron PBS y tampón de carbonato, se decidió utilizar el PBS que funcionó mejor para adsorber el antígeno. Lo anterior en concordancia con la recomendación de la literatura de que, en la fase de estandarización de un ELISA, es recomendado probar tanto las soluciones de carbonatos (pH 9.6), así como el PBS (pH 7.4) ya que el pH puede influir en la capacidad de la proteína en ligarse y la forma más adecuada de encontrar la mejor condición de pH es probando las dos soluciones (Willian, 2002). Otro criterio para definir la solución de adsorción de antígeno adecuada, es determinando el punto isoeléctrico de la proteína utilizada como antígeno. Se ha establecido, que la solución de adsorción más indicada, es la que tiene un valor de pH dos puntos arriba del valor del punto isoeléctrico de la proteína (Crowther, 2001). La proteína CP7 tuvo un punto isoeléctrico 7, y funcionó mejor con PBS en pH 7.4 que en solución de carbonatos, lo que no concuerda con Crowther (2001), pero sí esta acorde a lo que reportó Willian (2002). La concentración del antígeno utilizado fue de 0.125 µg/100 µl, más baja que la concentración de cisteína proteasa recombinante de *P. scrabini* (0.2 µg/ 100 µl), utilizada por Yu *et al.* (2016), lo que demuestra la elevada reactividad del antígeno obtenido.

La sensibilidad y especificidad del ELISA fue de de 71.4% y de 100.0%, respectivamente, comparable a los valores obtenidos por Potong *et al.* (2018), los cuales utilizaron una proteína recombinante de 35 KDa de *P. heterotremus* para detectar anticuerpos en pacientes con paragonimiasis causada por *P. westermani* (sensibilidad 88.9% y especificidad de 95.5%). A pesar de que las proteínas de diferentes especies de *Paragonimus* compartan una gran cantidad de epitopos, existen limitaciones al utilizar la proteína (antígeno) de una especie para diagnosticar otra especie (Potong *et al.*, 2018), lo que podría explicar la baja sensibilidad obtenida en el ELISA desarrollado en el presente trabajo. Otra razón podría ser, que los niveles

de anticuerpos en los sueros analizados fueran de bajo título, lo que conduce a resultados falsos negativos (Yu *et al.*, 2016).

No se detectaron reacciones falsas positivos por reacción cruzada con otras parasitosis (*Cysticercus*, *Leishmania* sp., *Entamoeba histolytica*, *Clonorchis sinensis*, *Shistosoma japonicum*, *Toxocara* sp., *Toxocara canis*, *Fasciola* sp., y *Spirometra erinaceieuropaei*), lo que concuerda con los resultados obtenidos por Yu *et al.* (2016) cuando utilizó la cisteína proteasa de *P. skrjabini*. Los autores no reportaron reacciones cruzadas con *Echinococcus granulosus*, *Taenia solium*, *Schistosoma japonicum* y *Trichinella spiralis*. Sin embargo, hay otros estudios que han utilizado cisteína proteasas como antígeno diagnóstico para la paragonimiasis y han reportado reacciones cruzadas con *Schistosoma*, *Fasciola* (Yun *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2015), *Clonorchis* (Yang *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2015), y con cestodos como *Echinococcus*, *Cysticercus* y *Spirometra* (Ahn *et al.*, 2015).

Este es el primer reporte del desarrollo de un ELISA para diagnosticar paragonimiasis en Costa Rica y Centro América, que utiliza un antígeno recombinante, y mostró buena sensibilidad y especificidad. Se recomienda evaluar el uso de un antígeno de *P. mexicanus* para intentar aumentar la sensibilidad de la prueba.

5. Conclusiones

- La prueba de ELISA estandarizada que utilizó el antígeno CP7 de *P. westermani* para la detección de anticuerpos de *Paragonimus* spp. mostró una alta especificidad ya que no presentó reacciones cruzadas con otros parásitos como: *Cysticercus*, *Leishmania* sp., *Entamoeba histolytica*, *Clonorchis sinensis*, *Shistosoma japonicum*, *Toxocara* sp., *Toxocara canis*, *Fasciola* sp., y *Spirometra erinaceieuropaei*.
- El ELISA mostró una adecuada sensibilidad capaz de detectar la paragonimiasis causada por *P. westermani* y *P. mexicanus*.

6. Recomendaciones

- Evaluar el desempeño de un antígeno recombinante del tipo cisteína proteasa de *P. mexicanus* con el fin de incrementar la sensibilidad de la prueba de ELISA.
- Utilizar diferentes sueros controles positivos (positivo fuerte y positivo débil) en la estandarización de un ELISA.

7. Referencias Bibliográficas

- Ahn, C., Na, B., Chung, D., Kima, J., Kim, J., y Konga, Y. (2015). Expression characteristics and specific antibody reactivity of diverse cathepsin F members of *Paragonimus westermani*. *Parasitology International*, 64 (1),37-42.
- Bahr, N.C., Trotman, R. L., Samman, H., Jung, R.S., Rosterman, L.R., Weil, G. J., y Hinthorn, D.R. (2017). Eosinophilic Meningitis Due to Infection With *Paragonimus kellicotti*. *Clinical Infectious Diseases*, 64(9):1271-1274.
- Bata, J. E., Gyenes, L., y Sehon, A. H. 1964. The effect of urea of antibody-antigen reactions. *Immunochemistry*, 1 (4): 289-293.
- Blair, D. (2019) Paragonimiasis. En R. Toledo (ed) y B. Fried (ed.). *Digenetic Trematodes*. Vol 1154. Basel, Switzerland: Springer Nature Switzerland. 105-138.
- Calvopina, M., Romero-Alvarez, D., Rendon, M., Takagi, H., y Sugiyama, H. (2018). *Hypolobocera guayaquilensis* (Decapoda: Pseudothelphusidae): A New Crab Intermediate Host of *Paragonimus mexicanus* in Manabí Province, Ecuador. *Korean Journal of Parasitology*, 56(32), 189-194.
- Chai, JY. (2013). Paragonimiasis. *Handbook of Clinical Neurology*, 114, 283–296.
- Chen, J., Chen, Z, Lin, J., Zhu, G., Meng, H., Cui, G., Wu, N., Hu, R., Pan, J., Zou, Y., y Feng, H. (2013). Cerebral paragonimiasis: A retrospective analysis of 89 cases. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 115(5), 546-551.
- Crowther, J., R., (2001). Stages in ELISA. *The ELISA Guidebook* (pp. 45-82). Totowa, New Jersey: Humana Press.

- Friant, S., Brown, K., Saari, M. T., Segel, N. H., Slezak, J., Goldberg, T. L. (2015). Lungfluke (*Paragonimus africanus*) infects Nigerian red-capped mangabeys and causes respiratory disease. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 329-332.
- Hernández-Chea, R.D., Tesis Magister Scientiae, Caracterización morfológica y molecular de *Paragonimus mexicanus* y *Paragonimus caliensis* en cangrejos de agua dulce de Costa Rica. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica, 2016.
- Imani, M., Jaliani, H. Z., Kheirandish, M. H., Azadpour, M. (2017). Recombinant production and affinity purification of the FraC pore forming toxin using hexa-His tag and pET expression cassette. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(4), 380-385.
- Intapan, P., Sanpool, O., Janwan, P., Laummaunwai, P., Morokote, N., Kong, Y., y Maleewong. (2013). Evaluation of IgG4 subclass antibody detection by peptide-based ELISA for the diagnosis of human paragonimiasis heterotrematode. *Korean Journal of Parasitology*, 51 (6), 763-766.
- Invitrogen (2016). BL21 Star™(DE3) One Shot® pLysS Chemically Competent Cells, *Invitrogen Corporation*, California, USA.
- Invitrogen (2016). S.O.C. medium, *Invitrogen Corporation*, California, USA.
- Kim, T. Y., Joo, I. J., Kang, S. Y., Cho, S. Y., Kong, Y., Gan, X. X., Sukomtason, K., Sukomtason, K., y Hong, S. J. (2002). Recombinant *Paragonimus westermani* yolk ferritin is a useful serodiagnostic antigen. *The Journal of Infectious Diseases*. 185(9), 1373-5.
- Kwon, Y.S., Lee, H.W., y Kim, H. J. (2019). *Paragonimus westermani* infection manifesting as a pulmonary cavity and adrenal gland mass: A case report. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 25 (2019), 200-203.
- Luo, J., Wang, M., Liu, D., Zhu, H., Yang, S., Liang, B., y Liang, Z. (2016). Pulmonary Paragonimiasis Mimicking Tuberculous Pleuritis. *Medicine*, 95(15).

- Morter, R., Adetifa, I., Antonio, M., Touray, F., Jong, B. C., Gower, C. M., Gehre, F. (2018). Examining human paragonimiasis as a differential diagnosis to tuberculosis in The Gambia. *BMC Research Notes*, 11(31).
- Narain, K., Devi, K.R., y Mahanta, J. (2005). Development of enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of human paragonimiasis. *Indian Journal of Medical Research*, 121(6), 739-46.
- Novagen pET System Manual, 11 ma ed. (2005). *Biosciences*, Darmstadt, Germany.
- Pothong, K., Komalamisra, C., Kalambaheti, T., Watthanakulpanich, D., Yoshino, T. P., y Dekumyoy, P. (2018). ELISA based on a recombinant *Paragonimus heterotremus* protein for serodiagnosis of human paragonimiasis in Thailand. *Parasites & Vectors*, 11(322).
- Oey, H., Zakrzewski, M., Narain, K., Devi, K. R., Agatsuma, T., Nawaratna, S., Gobert, G. N., Jones, M. K., Ragan, M. A., McManus, D. P., y Krause, L. (2018). Whole-genome sequence of the oriental lung fluke *Paragonimus westermani*. *Gigascience*, 8(1),1-8.
- Sah, R. y Khadka, S. (2017). Case series of paragonimiasis from Nepal. *Oxford Medical Case Reports*. 2017(11), 218-222.
- Sambrook, J., y Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3ra ed. New York, United States of America: Cold Spring Harbor.142-144.
- SIGMA-ALDRICH (2017). Anti-Human IgG (whole molecule)-Peroxidase, Misuri, USA.
- SIGMA-ALDRICH (2017).3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), Misuri, USA.
- Thermo Scientific (2016). Zeba™ Spin Desalting Columns, Rockford, USA.
- Thermo Scientific (2016). B-PER™ Bacterial Protein Extraction Reagent, Rockford, USA.
- Thermo Scientific (2016). Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit, Rockford, USA.
- Thermo Scientific (2016). HisPur™ Ni-NTA Purification Kit, Rockford, USA.
- Ulate, E., Rojas, B. G., Hernández-Cheaa, R., Jiménez-Rocha C., A., y Dolz G. (2015). Diagnosis of Human Paragonimiasis in Costa Rica using a Intradermal Test

- and Immunoblot. *Journal of Harmonized Research in Medical & Health Sciences*, 2(3), 122–131.
- Wang, X., Zheng, X., y Huang, J. (2018). Cerebral paragonimiasis with subcutaneous paragonimiasis on the face: a case of ectopic paragonimiasis in a child. *International journal of clinical and experimental medicine*. 11(3), 2877-2881.
- Willian, J. (2002). Antigen Measurement Using ELISA. In: W. John M., ed., *The Protein Protocols Handbook*, 2nd ed. Totowa, New Jersey: Humana Press, pp.1083-1088.
- Yadaiah, M., Rao, P. N., Sudhamalla, B., Ramakrishna, D., Yasin, U., M., Bhuyan, A., K. (2012). Cloning, Escherichia coli expression, purification, characterization, and enzyme assay of the ribosomal protein S4 from wheat seedlings (*Triticum vulgare*), *Protein Expression and Purification*, 81(1), 55-62.
- Yang, S., Park, J., Lee, J., Jeon, B., Kim, W., Yum, K., Jeong, E., y Lee, K.. (2004). Cloning and characterization of a new cysteine proteinase secreted by *Paragonimus westermani* adult worms. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(1), 87-92.
- Yoonuan, T., Nuamtanong, S., Dekumyoy, P., Phuphisut, O., y Adisakwattana, P. (2016). Molecular and immunological characterization of cathepsin L-like cysteine protease of *Paragonimus pseudoheterotremus*. *Parasitology Research*, 115(12), 4457-70. Acceso 14 Diciembre de 2018, desde: doi: 10.1007/s00436-016-5232-x.
- Yu, S., Zhang, X., Chen, W., Zheng, H., Ai1, G., Ye1, N., y Wang, Y. (2016). Development of an immunodiagnosis method using recombinant PsCP for detection of *Paragonimus skrjabini* infection in human. *Parasitology Research*. Acceso 14 Diciembre de 2017, desde: doi 10.1007/s00436-016-5300-2.
- Yun, D-H., Chung, J-Y., Chung, Y-B., Bahk, Y-Y., Kang, S-Y., Kong, Y., y Cho, S-Y. (2000). Structural and immunological characteristics of a 28-kilodalton cruzipain-like cysteine protease of *Paragonimus westermani* expressed in the definitive host stage. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 7(6), 932-39.
- Zhu, S., Gong C, Ren, L., Li, X., Song, D., y Zheng, G. (2013). A simple and effective strategy for solving the problem of inclusion bodies in recombinant protein technology: His-tag deletions enhance soluble expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 837-45.

Discusión general

En la primera parte del presente estudio se produjeron las proteínas cisteínas proteasas CP4, CP7 y CP9 recombinantes, lo que permitió la expresión de proteínas de alta calidad en muy corto tiempo, y evitó la captura y muerte de cangrejos o la infección experimental y muerte de animales de laboratorio, para aislar los parásitos adultos, y así obtener las proteínas del parásito. Estas ventajas en el uso de antígenos recombinantes han sido mencionadas por otros autores (Yu *et al.*, 2016 y Potong *et al.*, 2018).

El antígeno CP7 resultó superior en el inmunodiagnóstico de la paragonimiasis mediante inmunoblot comparado a los antígenos CP4 y CP9, lo que estaría acorde a los resultados obtenidos por Ahn *et al.*, (2015) donde el antígeno CP7 presentó la mayor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de anticuerpos contra *P. westermani*. Se reporta, además, por primera vez, la detección de anticuerpos de *P. mexicanus* mediante el antígeno CP7 de *P. westermani*.

En la segunda parte del estudio se produjo y se purificó la proteína CP7 para emplearla en el diagnóstico de *Paragonimus* spp. mediante ELISA. El ELISA estandarizado mostró una alta especificidad (100%) ya que no presentó reacciones cruzadas con otros parásitos (*Cysticercus*, *Leishmania* sp., *Entamoeba histolytica*, *Clonorchis sinensis*, *Shistosoma japonicum*, *Toxocara* sp., *Toxocara canis*, *Fasciola* sp., y *Spirometra erinaceieuropaei*), lo que concuerda con el estudio de Yu *et al.*, 2016 una aceptable sensibilidad, probablemente por el uso de antígeno heterólogo (Potong *et al.*, 2018)

Se reporta por primera vez en Costa Rica y Centroamérica la estandarización de un ELISA utilizando la proteína CP7 recombinante de *P. westermani* para la detección de anticuerpos contra *Paragonimus* spp. con alta especificidad y adecuada sensibilidad.

Conclusiones generales

- Se estableció que CP4, CP7 y CP9 tienden a formar cuerpos de inclusión (forma insoluble) al expresarse, necesitando pasos adicionales para la solubilización de las proteínas.
- Las cisteínas proteasas CP4, CP7 y CP9 de *P. westermani* lograron detectar anticuerpos de *P. mexicanus* en sueros de ratas infectadas mediante inmunoblot.
- La proteína CP7 mostró ser el antígeno más indicado para el desarrollo de una prueba inmunodiagnóstica, ya que no mostró tantas reacciones cruzadas contra otras parasitosis como sí lo generaron las proteínas CP4 y CP9.
- La prueba de ELISA estandarizada, que utilizó el antígeno CP7 de *P. westermani* para la detección de anticuerpos de *Paragonimus* spp., mostró una alta especificidad (100.0%) ya que no presentó reacciones cruzadas con otros parásitos como *Cysticercus*, *Leishmania* sp., *Entamoeba histolytica*, *Clonorchis sinensis*, *Shistosoma japonicum*, *Toxocara* sp., *Toxocara canis*, *Fasciola* sp., y *Spirometra erinaceieuropaei*.
- El ELISA estandarizado mostró una adecuada sensibilidad, capaz de detectar la paragonimiasis causada por *P. westermani* y *P. mexicanus*.
- Se reporta por primera vez la utilidad del antígeno CP7 de *P. westermani* en el inmunodiagnóstico (inmunoblot y ELISA) de la paragonimiasis humana causada por *P. mexicanus*.

Recomendaciones generales

- Optimizar la producción de proteínas recombinantes para su uso como antígenos para obtener proteínas solubles, lo que permitiría una mayor cantidad de proteínas y acortaría el tiempo de procesamiento.

- Evaluar si el uso de proteínas de *P. mexicanus* como antígeno podría incrementar la sensibilidad del ELISA.
- Estudiar si el antígeno de *P. mexicanus* es capaz de detectar la paragonimiasis ocasionada por otras especies como *P. westermani* y *P. kellicoti*.