



UNAP



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TESIS

SEROPOSITIVIDAD DE TOXOPLASMOSIS EN PACIENTES VIH  
EMPLEANDO UNIDADES ARBITRARIAS DE ANTICUERPOS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE

BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

CHRISTIAN ANDY GUERRA MANIHUARI

ASESORES:

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.

Blga. VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO, Dra.

Blga. KATTY MADELEINE ARISTA FLORES, T.Ú&E

IQUITOS, PERÚ

2023

# ACTA DE SUSTENTACIÓN



# UNAP

## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

### ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 020-CGT-UNAP-2023

En la ciudad de Iquitos, Departamento de Loreto, mediante Sala Presencial, a los 22 días del mes de agosto del 2023, a las 5:00 p.m. horas se dio inicio a la sustentación pública de la Tesis titulada: "SEROPOSITIVIDAD DE TOXOPLASMOSIS EN PACIENTES VIH EMPLEANDO UNIDADES ARBITRARIAS DE ANTICUERPOS", presentado por el Bachiller **CHRISTIAN ANDY GUERRA MANIHUARI**, autorizada mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 261-2023-FCB-UNAP, para optar el Título Profesional de **BIÓLOGO**, que otorga la UNAP de acuerdo a Ley 30220, su Estatuto y el Reglamento de Grados y Títulos vigente.

El Jurado Calificador y dictaminador designado mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 162-2023-FCB-UNAP, de fecha 19 de mayo de 2023, integrado por los siguientes Profesionales:

- |   |              |
|---|--------------|
| - Blga. MIRLE CACHIQUE PINCHE, Dra.           | - Presidente |
| - Blga. MARJORIE RAQUEL DONAYRE RAMÍREZ, Dra. | - Miembro    |
| - Blga. TERESA DE JESUS MORI DEL ÁGUILA, Dra. | - Miembro    |



Luego de haber escuchado con atención y formulado las preguntas, las cuales fueron absueltas:

Satisfactoriamente

El Jurado después de las deliberaciones correspondientes, llegó a las siguientes conclusiones:

La sustentación pública y la Tesis han sido Aprobada con la calificación de Muy Buena estando el Bachiller apto para obtener el Título Profesional de **BIÓLOGO**.



Siendo las 6:35 p.m. horas se dio por terminado el acto de sustentación.

Blga. MIRLE CACHIQUE PINCHE, Dra.  
Presidente

Blga. TERESA DE JESÚS MORI DEL ÁGUILA, Dra.  
Miembro

Blga. MARJORIE RAQUEL DONAYRE RAMÍREZ, Dra.  
Miembro

Blgo. JORGE LUÍS MARAÑÓN DEL ÁGUILA, Dr.  
Asesor

Blga. VIVIANA VANESSA PINEDO CANCINO, Dra.  
Asesora

Blga. KATTY MADELEINE ARISTA FLORES, M.Sc.  
Asesor

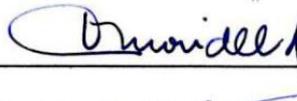
**JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR**



---

**Blga. Mirle Cachique Pinche, Dra.**

**Presidente**



---

**Blga. Teresa de Jesús Mori del Aguila, Dra.**

**Miembro**



---

**Blga. Marjorie Raquel Donayre Ramirez, Dra.**

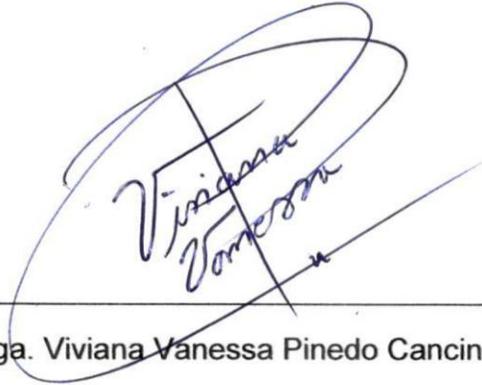
**Miembro**

## ASESORES



---

Blga. Jorge Luis Marapara del Aguila, Dr.



---

Blga. Viviana Vanessa Pinedo Cancino, Dra.



---

Blga. Katty Madeleine Arista Flores, MSc.

## RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD

Reporte de similitud

NOMBRE DEL TRABAJO

**FCB\_TESIS\_GUERRA MANIHUARI.pdf**

AUTOR

**CHRISTIAN ANDY GUERRA MANIHUARI**

RECuento de palabras

**6852 Words**

RECuento de caracteres

**37255 Characters**

RECuento de páginas

**43 Pages**

Tamaño del archivo

**1.9MB**

Fecha de entrega

**May 10, 2024 12:43 PM GMT-5**

Fecha del informe

**May 10, 2024 12:43 PM GMT-5**

### ● 17% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 13% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 11% Base de datos de trabajos entregados
- 1% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

### ● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

## DEDICATORIA



***Verónica Rosita Rodríguez Flores***

1998 - 2020



***A José Alcibíades Manihuari Caritimari***

1941 - 2021



***Con amor para Sean Anthony Power Videyra***

***un Biólogo en el cielo***

1996 – 2021

## **AGRADECIMIENTO**

- A la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana – UNAP, y la Facultad de Ciencias Biológicas - FCB, mi primera casa de estudios.
- A la Dra. Lastenia Ruiz Mesia, coordinadora del Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonia – LIPNAA, Centro de Investigación de Recursos Naturales - CIRNA.
- A la PhD. Viviana Vanessa Pinedo Cancino, MSc, coordinadora del laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, LIPNAA – CIRNA.
- Al Dr. Jorge Luis Marapara Del Aguila y Blga. Katty Madeleine Arista Flores, MSc, por ser pieza clave en el desarrollo de este trabajo, por sus consejos y palabras de aliento, por enseñarme y compartir sus conocimientos conmigo.
- A Andree Valles, gracias por el soporte estadístico, la paciencia y las clases brindadas.
- A la Dra. Maritza Calderón Sánchez y el Grupo de Investigación de Toxoplasmosis en Perú. Gracias por las capacitaciones. Laboratorio de Investigación de Enfermedades Infecciosas – LID, de la Universidad Peruana Cayetano Heredia – UPCH.
- Al Dr. Robert H. Gilman. Escuela de Salud Pública, Universidad Johns Hopkins – Estados Unidos de América. Muchas gracias por haber confiado en mí, y el apoyo brindado.
- A mi familia, mi abuelo en el cielo, José Alcibíades Manihuari Caritimari; mis padres, Elizabeth Manihuari Parana y Magin Guerra Yaicate. Mis hermanos, Jhon, Greysi, Alicia y Carol, el amor más bonito que me dio la vida, gracias por sus apoyos incondicionales en cada paso de mi

desarrollo personal y académico, por tener la paciencia y sabiduría para hacer de mi un hombre de bien.

- A la familia Videyra y amigos: Remy Rodríguez, Oliver Bocanegra, Omar Chempen, Néstor Canaquiri, Miguel Mavila, Baryan Portello, Jason Torres, Kent Vela, Pedro Vela, Marcela Urrelo, Mafer Romero, Maykel Marín, Anapaula Ruiz, María Vásquez, Saby Pinedo, Sory Vásquez, Marillyn Donayre, Rafael Saavedra, Susan Paredes, Seyer Mego, Irene Rengifo, Kelly Saravia, Alfredo Piña, Ramón Aguilar, Alexis Coblentz, Eduardo Velasco, Ligia Alvarado, Andrea Urrelo, Aldair Sánchez, Bruss Fernández, Eduardo Heredia, Saulo Gutiérrez, Josué López.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

PORTADA .....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR.....	iii
ASESORES.....	iv
RESULTADO DEL INFORME DE SIMILITUD .....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT .....	xvi
INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Bases teóricas .....	8
1.2.1. <i>Toxoplasma gondii</i> .....	8
1.2.2. Clasificación taxonómica.....	8
1.2.3. Epidemiología .....	8
1.2.4. Biología del parásito .....	9
1.2.5. Morfología de <i>Toxoplasma gondii</i> en modelo murino y línea celular..	12
1.2.6. Anticuerpo .....	15
1.2.7. Antígeno.....	16
1.2.8. Respuesta Inmunitaria adaptativa .....	16
1.2.9. Respuesta inmune en infección por <i>Toxoplasma gondii</i> . .....	17
1.2.10. Patología y patogenia.....	18
1.2.11. Enfoque matemático para analizar datos serológicos.....	21
1.3. Definición de términos básicos .....	23
<b>CAPÍTULO II: HIPOTESIS Y VARIABLES .....</b>	<b>24</b>
2.1. Formulación de la hipótesis.....	24
2.2. Variables, indicadores e índices .....	24
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA .....</b>	<b>25</b>
3.1. Área de estudio.....	25

3.2.	Tipo y diseño de estudio .....	25
3.3.	Diseño muestral.....	26
3.3.1.	Población .....	26
3.3.2.	Selección de la muestra.....	26
3.3.3.	Criterio de selección .....	26
3.4.	Material biológico y muestra control.....	27
3.4.1.	Procesamiento de la muestra sanguínea.....	27
3.4.2.	Obtención de las muestras control.....	27
3.4.3.	Obtención del Antígeno Lisado Total (ATL) de <i>Toxoplasma gondii</i> ....	28
3.4.4.	Medición de títulos de IgG .....	28
3.4.5.	Definición de seropositividad.....	29
3.4.6.	Método tradicional.....	30
3.4.7.	Método de Unidades Arbitrarias (UA) .....	30
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS .....</b>		<b>32</b>
4.1.	Establecimiento de una curva estándar.....	32
4.2.	Predicción de la curva estándar e intervalo de confianza. ....	32
4.3.	Distribución de anticuerpos .....	34
4.4.	Determinación de la seropositividad.....	36
4.5.	Clasificación serológica.....	38
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN .....</b>		<b>39</b>
<b>CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN .....</b>		<b>41</b>
<b>CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES .....</b>		<b>42</b>
<b>CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN .....</b>		<b>43</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>50</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> <i>Toxoplasma gondii</i> ciclo de vida. Márcia Attias et al, 2020 <sup>(24)</sup> .....	10
<b>Figura 2-</b> Ciclo biológico de <i>Toxoplasma gondii</i> en el hospedero definitivo. Márcia Attias et al, 2020 <sup>(24)</sup> .....	10
<b>Figura 3 -</b> Taquizoíto de <i>Toxoplasma gondii</i> . Márcia Attias et al, 2020 <sup>(24)</sup> ...	11
<b>Figura 4 -</b> Quiste tisular y bradizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> . Márcia Attias et al, 2020 <sup>(24)</sup> .....	11
<b>Figura 5 -</b> Secuencia de eventos de división por endodiogenia. Márcia Attias et al, 2020 <sup>(24)</sup> .....	12
<b>Figura 6 -</b> Quiste de <i>Toxoplasma gondii</i> en cerebro de ratón con tinción de giemsa. Christian A. Guerra-Manihuari, 2019.....	13
<b>Figura 7 -</b> Quiste tisular de <i>Toxoplasma gondii</i> en línea celular con tinción de giemsa. Christian A. Guerra-Manihuari,2019.....	13
<b>Figura 8 -</b> Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> lisando una línea celular. Christian A. Guerra-Manihuari, 2019. ....	14
<b>Figura 9 -</b> Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> en tinción de giemsa. Christian A. Guerra-Manihuari, 2019. ....	14
<b>Figura 10 -</b> Forma membranaria y secretada de los anticuerpos, Abbas et al, 2022 <sup>(25)</sup> .....	15
<b>Figura 11 -</b> Naturaleza de los determinantes antigénicos, Abbas et al, 2022 <sup>(25)</sup> .....	16
<b>Figura 12 -</b> Respuesta inmunitaria adaptativa. Abbas et al, 2022 <sup>(25)</sup> .....	17
<b>Figura 13 -</b> Invasión de Taquizoítos de <i>Toxoplasma gondii</i> a una célula huésped. Márcia Attias et al, 2020 <sup>(24)</sup> .....	20

<b>Figura 14</b> - Interacción física y celular entre el SNC y <i>Toxoplasma gondii</i> . Oscar A. Méndez et al, 2017 <sup>(31)</sup> . .....	20
<b>Figura 15</b> - Mapa de la Región Loreto. Ramón Aguilar-Manihuari, 2023. ...	25
<b>Figura 16</b> - Modelo predictivo por placa para estimar UA .....	33
<b>Figura 17</b> - Control de calidad de réplicas con el coeficiente de variación intraplaca. ....	33
<b>Figura 18</b> - Regresión inversa para estimar valores de UA de la curva estándar y muestras problemas.....	34
<b>Figura 19</b> - Distribución lineal gaussiana de las UA .....	35
<b>Figura 20</b> - Distribución normal gaussiana de UA .....	35
<b>Figura 21</b> - Identificación de valores faltantes .....	36
<b>Figura 22</b> - Curva de probabilidad de clasificación predicha por el modelo de mezcla gaussiana de dos poblaciones .....	37

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1** – Calculo de las UA a partir de la dilución seriada. ....32

**Tabla 2** - Clasificación serológica.....38

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1</b> - Flujograma del ensayo de ELISA indirecto .....	50
<b>Anexo 2</b> - Guía de trabajo para la estimación de las unidades arbitrarias de anticuerpos .....	52
<b>Anexo 3</b> - Consentimiento Informado.....	61

## RESUMEN

*Toxoplasma gondii* es el parásito causante de la Toxoplasmosis, infección que por lo general aqueja a pacientes que presentan infección por VIH, lo que genera un desafío para su diagnóstico. En este sentido, se planteó el objetivo de determinar la seropositividad de pacientes con VIH empelando unidades arbitrarias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*. Se recolectaron un total de 100 muestras de sueros de pacientes con VIH, provenientes de las diferentes provincias de la región Loreto. Se midieron títulos de anticuerpos IgG mediante un Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA). Posteriormente, se utilizó dos enfoques matemáticos (método tradicional, métodos de unidades arbitrarias de anticuerpos) para definir un punto de corte únicamente basado en los datos analizados, y poder determinar la seropositividad de nuestra población (seronegativa, seropositiva). Se observó, que la seropositividad para el primer enfoque matemático tuvo resultados del 89% seropositivos y 11% seronegativos; Mientras que para el segundo enfoque se obtuvo un resultado del 95% seropositivos, 3% seronegativos y 2% indeterminados. En conclusión, se demostró que con ambos enfoques permiten determinar la seropositividad de una población. Sin embargo, la utilización de unidades arbitrarias de anticuerpos nos permite de manera general expresar resultados (seropositivos y seronegativos) sin la necesidad de tener una población no expuesta a la infección.

**Palabras clave:** *Toxoplasma gondii*, seropositivos, seronegativos, isotipos IgG.

## ABSTRACT

*Toxoplasma gondii* is the parasite that causes Toxoplasmosis, an infection that usually affects patients with HIV infection, which creates a diagnostic challenge. The aim of this study was to determine the seropositivity of HIV-infected patients by using arbitrary antibody units against *Toxoplasma gondii*. A total of 100 serum samples were collected from HIV-positive patients from the different provinces of the Loreto region. IgG antibody titers were measured using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Subsequently, two mathematical approaches (traditional method, and antibody arbitrary unit methods) were used to define a cut-off point based solely on the data analyzed, in order to determine the seropositivity of our population (seronegative, seropositive). It was observed that seropositivity for the first mathematical approach resulted in 89% seropositive and 11% seronegative; while the second approach resulted in 95% seropositive, 3% seronegative, and 2% indeterminate. In conclusion, both approaches were shown to determine the seropositivity of a population. However, the use of arbitrary antibody units allows us to generally express results (seropositive and seronegative) without the need to have a population not exposed to infection.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*, seropositive, seronegative, IgG isotypes.

## INTRODUCCIÓN

La Toxoplasmosis es una infección oportunista ocasionada por el protozoo intracelular obligado *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)<sup>(1)</sup>, que por lo general afecta a personas con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), especialmente a pacientes que no reciben la profilaxis adecuada, que desconocen de su seropositividad o que presentan células T CD4 menores a 100 células/mm<sup>3(2)</sup>.

En el mundo la prevalencia de *T. gondii* varían de acuerdo a las condiciones de sanidad, hábitos alimenticios, costumbre o método de detección<sup>(3)</sup>. En América Latina, Oriente, Medio Oriente, Europa Central, Sudeste Asiático y África las tasas de infección varían del 10 al 70 %, en los EE.UU y Reino Unido varia del 8 al 22%, en América central y Europa Continental la tasa de infección son del 30 al 90%<sup>(4)</sup>. Mientras que para el Perú se estima una tasa de exposición del 40 al 74% según investigación científica<sup>(5)</sup>.

Aunque la seroprevalencia de *T. gondii* es muy común en la población mundial, la incidencia de la Toxoplasmosis en la amazonia peruana es baja, complicando así la caracterización de sus factores de riesgo<sup>(6)</sup>; esta complicación se manifiesta con la respuesta inmune del huésped, es decir, etapa de eliminación o enquistamiento. Sin embargo, esta manifestación clínica tiende a variar en pacientes con VIH, porque la presencia de *T. gondii* en el SNC es considerado como el inicio del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Aunque muchos pacientes con SIDA no llegan a desarrollar Toxoplasmosis,

principalmente porque nunca han estado expuestos al parásito o porque la respuesta inmune del organismo infectado lo eliminó<sup>(7)</sup>.

Se sabe que el sistema inmunitario tiene la capacidad de bloquear la acción invasiva celular del parásito y evitar su replicación masiva. Dicha acción está relacionada estrechamente con la exposición al parásito; generando anticuerpos que brindan información sobre el estado serológico de la persona infectada (infección activa, latente o pasada). Datos que pueden ayudarnos a generar un diagnóstico presuntivo<sup>(8)</sup>.

No obstante, el diagnóstico como estándar de oro para la Toxoplasmosis en paciente VIH/SIDA siguen siendo las manifestaciones clínicas y tomografías. Al mismo tiempo, este diagnóstico tiene sus limitaciones, porque aproximadamente el 40% de pacientes VIH/SIDA tiene sospechas de Toxoplasmosis, lo que genera un desafío para su diagnóstico, control y erradicación<sup>(2)</sup>.

Hoy en día, el Perú no es ajeno a la realidad mundial, debido a que en nuestro país se vienen desarrollando investigaciones que buscan la detección de *T. gondii* en fase aguda, crónica o infecciones pasadas. Una de las técnicas que mayor se usa para la detección de *T. gondii* es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), asimismo, esta técnica presenta muchas desventajas; como el tiempo para dar resultados, además de los equipos y materiales con alto valor económico.

En consecuencia, es necesario la búsqueda de un diagnóstico rápido, confiable y sensible con base en la serología que permitan la detección de *T. gondii*. En este sentido, se planteó el objetivo de determinar la

seropositividad de pacientes con VIH empujando unidades arbitrarias de anticuerpos contra *Toxoplasma gondii*; Estimar los valores de absorbancia a unidades arbitrarias de anticuerpos y poder determinar la seropositividad de cada muestra problema. Finalmente comparar la seroprevalencia entre valores de absorbancia y unidades arbitrarias de anticuerpos. En donde, definimos un punto de corte únicamente a partir de los datos analizados aplicando un método estadístico de clasificación de mixtura de distribución gaussiana, para determinar la media y desviación estándar de nuestra población seronegativa y seropositiva.

## CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

### 1.1. Antecedentes

En 2023, se recolectaron 87 muestras de sangre de mujeres embarazadas que buscan atención prenatal en el Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario de Benha, Egipto; Con el objetivo de comparar Nano-Gold ELISA, ELISA y PCR para el diagnóstico de toxoplasmosis congénita utilizando el antígeno de superficie SAG1 de *Toxoplasma gondii*. Este estudio demostró que Nano-Gold ELISA tuvo una sensibilidad del 97.3% y una especificidad del 100%, versus 89.2% y 94% para ELISA, con una precisión del diagnóstico del 98.9% para Nano-Gold ELISA, y 91.95% para ELISA; respectivamente no hay diferencia estadística entre PCR y Nano-Gold ELISA<sup>(9)</sup>.

En 2022, un estudio retrospectivo evaluó 509 sueros de cordón umbilical y sangre periférica de bebés en el Departamento de Parasitología y Micología de la Universidad de Toulouse 3, Centro Hospitalario de la Universidad de Toulouse, Francia; Con el objetivo de precisar el diagnóstico de la Toxoplasmosis congénita y detectar anticuerpos IgA e IgM anti-*Toxoplasma*. Donde obtuvieron resultados de sensibilidad a IgA por ELISA del 60.57 % y 56.52%, y sensibilidad a IgM por ISAGA del 73.26% y 82.35, respectivamente el resultado no aumentó significativamente el diagnóstico serológico de la Toxoplasmosis congénita<sup>(10)</sup>.

En 2022, para este estudio se contó con la participación de un total de 81 participantes referidos al Hospital de Ahvaz, Irán, para la prueba de

Toxoplasmosis; Con el objetivo de terminar el estado serológico mediante Inmuno-PCR versus ELISA en la detección de IgG e IgM contra *T. gondii*. De las 81 muestras, 4 y 30 resultaron positivos para IgM e IgG por el método de ELISA, además, de las 81 muestras, 42 y 39 tuvieron IgG avidéz, mientras que el 59 de 81 fueron detectadas positivas mediante la técnica de IPCR. Donde el coeficiente de valor kappa, entre IPCR y ELISA mostró una fuerte concordancia (0,360, Valor de  $p < 0,001$ ). Con una sensibilidad del 66.0% y una especificidad del 60.0%. Estos valores demuestran una fuerte concordancia entre el método de IPCR y ELISA, sin embargo, se requiere de más investigación complementaria en este sentido<sup>(11)</sup>.

En 2020, un total de 30 muestras de suero de ratones fueron evaluadas frente a antígenos excretados y secretados de *Toxoplasma gondii*, en el Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria, Ramas de Ciencia e Investigación, Universidad Islámica Azad, Teherán, Irán; Con la finalidad de diseñar un Nano kit-ELISA de diagnóstico de Toxoplasmosis de alta sensibilidad y especificidad. Los resultados obtenidos demostraron que la sensibilidad y especificidad del Nano kit – ELISA fue del 80 y 86.66 %, respectivamente, posterior a eso ambas mejoraron a 93.33%. Esto reveló la mejora significativa de la sensibilidad y especificidad utilizando nanopartículas de oro en el diseño de kit de ELISA<sup>(12)</sup>.

En 2015, este estudio desarrollo y validó una prueba de ELISA interno para el diagnóstico de Toxoplasmosis en el Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Peradeniya, Sri

Lanka; Con un total 130 pacientes analizados mediante ELISA interno y ELISA kit, además de una prueba de avidéz. Los resultados para este estudio demostraron que los valores de corte óptimo para ELISA interno estaban dentro del rango de 0.85 a 0.98, con una sensibilidad del 95.3% y una especificidad del 98.3%. Estos valores mostraron una fuerte correlación entre ambas pruebas<sup>(13)</sup>.

En 2015, este estudio tuvo como objetivo desarrollar un nuevo método de captura de antígeno basado en nanopartículas de microesferas magnéticas cubiertas de anticuerpos policlonales IgG, llevado a cabo en el Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias, Universidad del Cairo, Egipto. Los resultados de estudio demostraron que el método tuvo una sensibilidad del 98% y una especificidad del 96.4%, valor predictivo positivo del 96% y un valor predictivo negativo del 98.1% superior a la prueba de ELISA tipo Sándwich. Demostrando que el uso nanopartículas de microesferas magnéticas ofrece la ventaja potencial de mejorar las pruebas de diagnóstico de las toxoplasmosis<sup>(14)</sup>.

En 2010, con el fin de contribuir en el diagnóstico erróneo de los casos sospechosos de toxoplasmosis, el Instituto de Medicina Tropical, Universidad de Sao Paulo, Brasil, evaluó la eficiencia de ELISA empleando péptidos derivados de antígenos excretados-secretados de *T. gondii*, denominados SAG-1, GRA-1 y GRA-7. El estudio utilizó péptidos individuales como combinados con el objetivo de establecer un perfil confiable para la toxoplasmosis agua/reciente con una sola muestra de suero. En donde obtuvieron resultados de una mejor

discriminación utilizando la combinación de péptidos, lo cual pueden ser utilizados como marcadores serológicos, mejorando la eficiencia del ensayo para la fase aguda/reciente de la toxoplasmosis<sup>(15)</sup>.

En 2008, el Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud, Estados Unidos de América; Demostró datos reproducibles con el método de diluciones de muestras mediante adición de sueros estándar diluido en serie a cada placa de ELISA. Método que proporciona un título de anticuerpo confiable con menos mano de obra que otros métodos con el objetivo de apoyar el desarrollo de vacunas futuras<sup>(16)</sup>.

Todo estos antecedentes han motivado a varios investigadores en la última década, quienes han desarrollado investigaciones basados en modelos matemáticos y enfoques estadísticos utilizados en el análisis de datos de anticuerpos para demostrar una reducción constante de la carga de infecciones en el mundo, debido a que varios países apunta a la eliminación de la enfermedad en un futuro cercano; y para superar este problema, las medidas alternativas basadas en anticuerpos contra antígenos específicos han ganado interés en la epidemiología, lo que permite estimar la exposición a la enfermedad en ausencia de individuos infectados; Y para poder determinar esto, los anticuerpos IgG juegan un papel fundamental en la lucha contra una infección. En partículas los isotipos de IgG cumple la función de controlar la enfermedad y proporcionar nuevos conocimientos sobre el desarrollo de estrategias de control y comprensión de la transmisión<sup>(8,17)</sup>.

## 1.2. Bases teóricas

### 1.2.1. *Toxoplasma gondii*

En los años 1908 Nicolle y Manceaus reportaron en el tejido de un roedor africano "*Ctenodactylus gundi*" la presencia de *Toxoplasma gondii*. El género de este parásito hace referencia a su forma arqueada que viene del griego "toxon" y "plasma" que significa vida; en cuanto al nombre de la especie se lo relacionó con el nombre vulgar del roedor "gundi"<sup>(18)</sup>. Este parásito es la causa de la enfermedad crónica que perturba al sistema nervioso central; por lo general asintomático en individuos inmunocompetentes. Mientras que en individuos inmunocomprometidos conduce a una enfermedad grave o letal, especialmente pacientes VIH/SIDA<sup>(19)</sup>.

### 1.2.2. Clasificación taxonómica

Filo : Apicomplexa  
Clase : Sporozoea  
Subclase : Coccidia  
Orden : Eucoccidida  
Suborden : Eimeriina  
Familia : Sarcocystidae  
Subfamilia : Toxoplasmatinae  
Género : *Toxoplasma*  
Especie : *Toxoplasma gondii*<sup>(18)</sup>.

### 1.2.3. Epidemiología

*Toxoplasma gondii* tiene una distribución cosmopolita debido a sus múltiples vías de transmisión. En continentes como América del norte, Europa y Asia, la principal forma de transmisión se da por el consumo

de carne poco o mal cocida; mientras que en los continentes de América central, América del Sur y África la infección se transmite mediante la contaminación fecal del suelo con heces de gatos que eliminan ooquistes<sup>(20)</sup>. Sin embargo, la prevalencia de *Toxoplasma gondii* en pacientes VIH es diferente según geografía. En países en vía de desarrollo es del 34 y 55 %, y en países desarrollados es del 26%. Estos datos nos llevan a colocar a la toxoplasmosis como la causa más común de lesión cerebral y la más importante en temas de morbilidad y mortalidad<sup>(2,21,22)</sup>.

#### 1.2.4. Biología del parásito

El ciclo de vida de *Toxoplasma gondii* está dividido en dos etapas: la primera etapa se da en el hospedero definitivo y la segunda en el hospedero accidental (figura 1).

En cuanto a sus formas infectantes *Toxoplasma gondii* presenta 3 formas. 1) Ooquistes presentes en la fase sexual que se desarrollan en el intestino del gato (figura 2). 2) Taquizoítos (multiplicación rápida) (figura 3), y 3) bradizoítos (multiplicación lenta que forma quistes tisulares), este estadio se puede encontrar en cualquier tejido del organismo parasitado, además se lo considera como el estadio de latencia (figura 4)<sup>(23,24)</sup>.

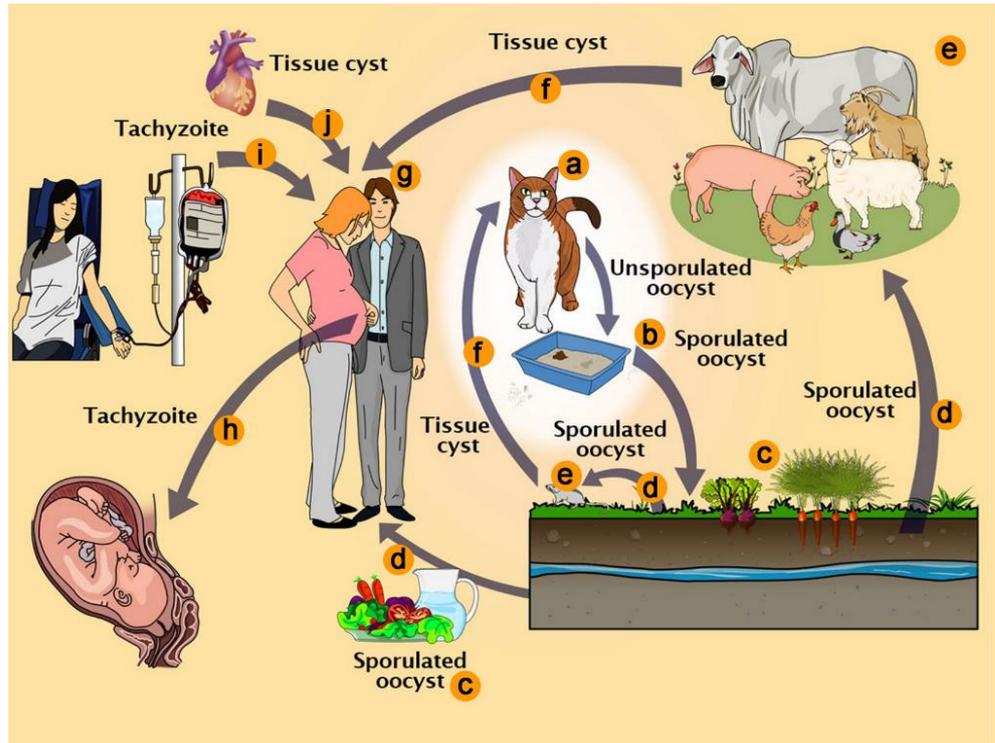


Figura 1- *Toxoplasma gondii* ciclo de vida. Márcia Attias et al, 2020<sup>(24)</sup>.

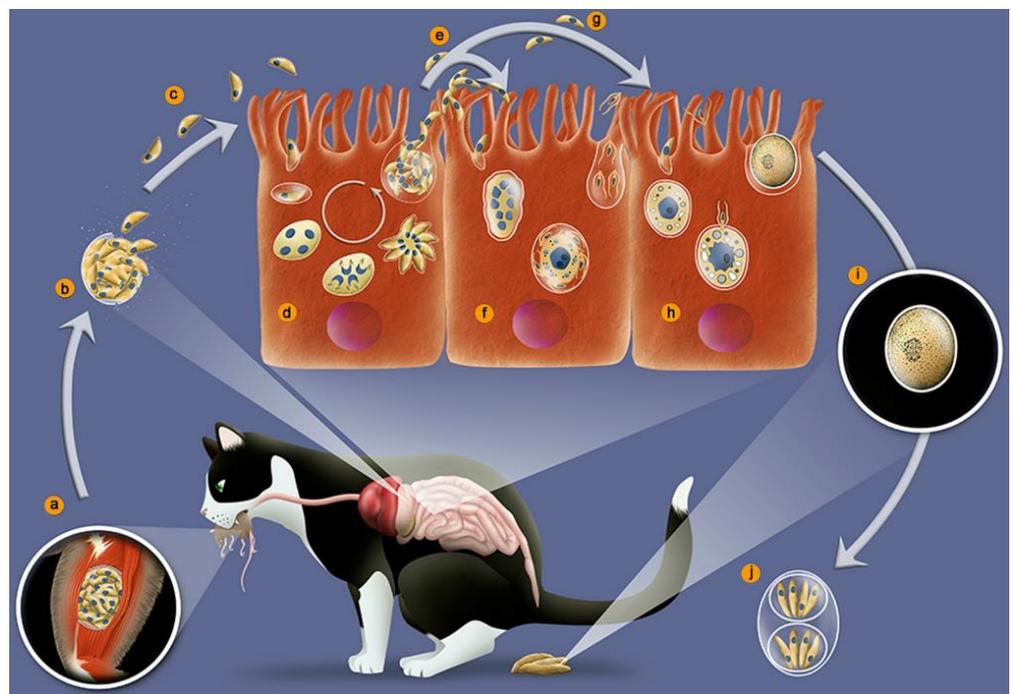
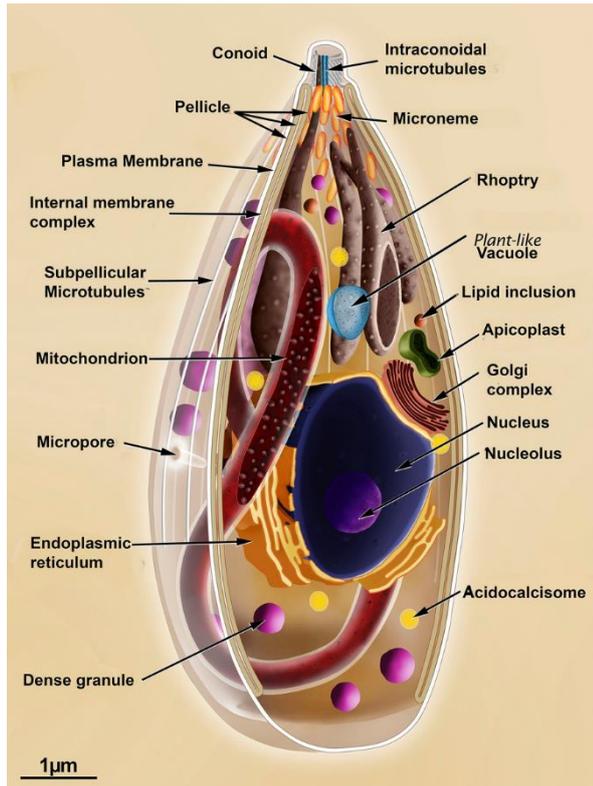
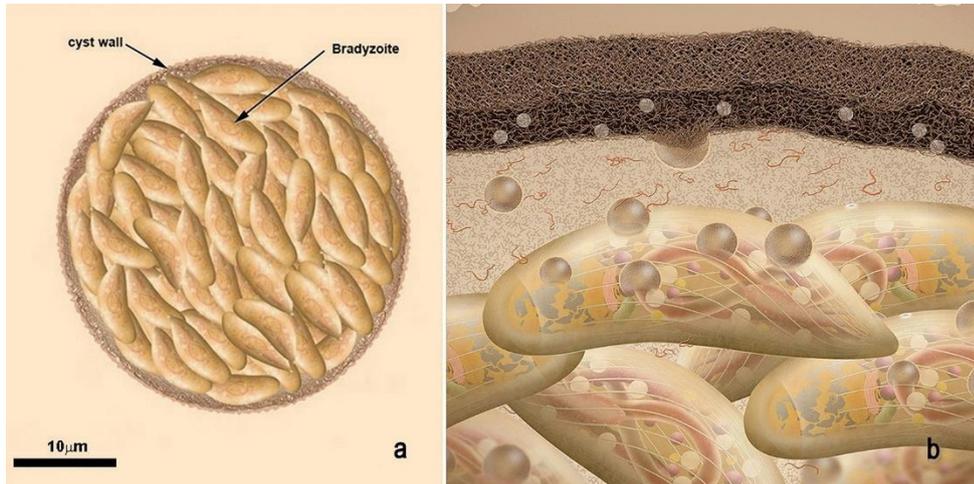


Figura 2- Ciclo biológico de *Toxoplasma gondii* en el hospedero definitivo.

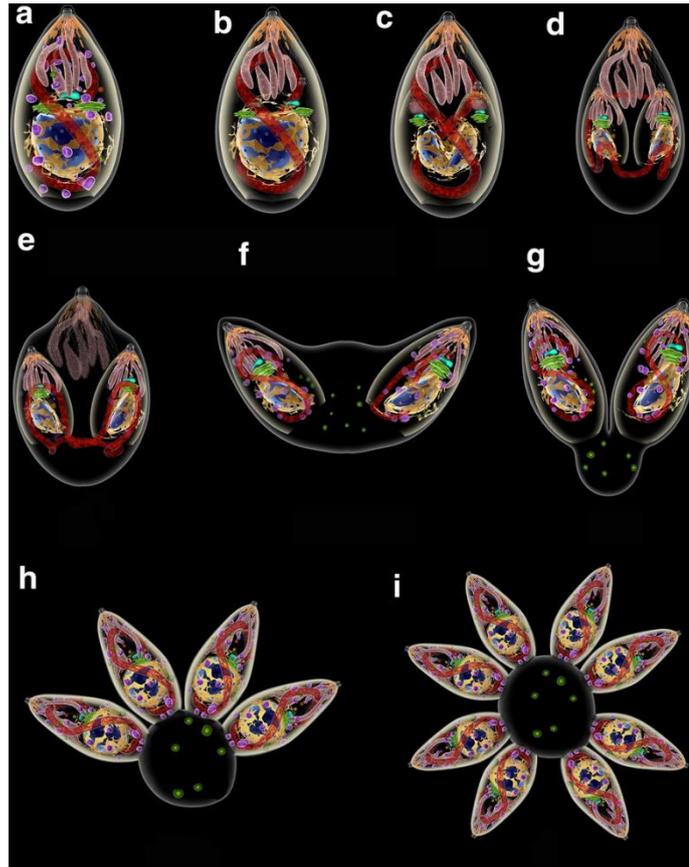
Márcia Attias et al, 2020<sup>(24)</sup>.



**Figura 3** - Taquizoítos de *Toxoplasma gondii*. Márcia Attias et al, 2020<sup>(24)</sup>.



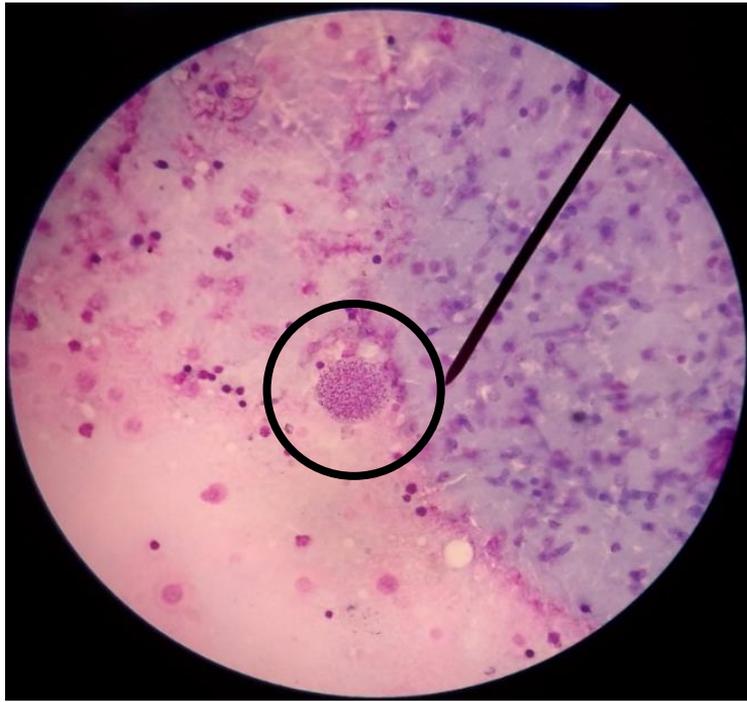
**Figura 4** - Quiste tisular y bradizoítos de *Toxoplasma gondii*. Márcia Attias et al, 2020<sup>(24)</sup>.



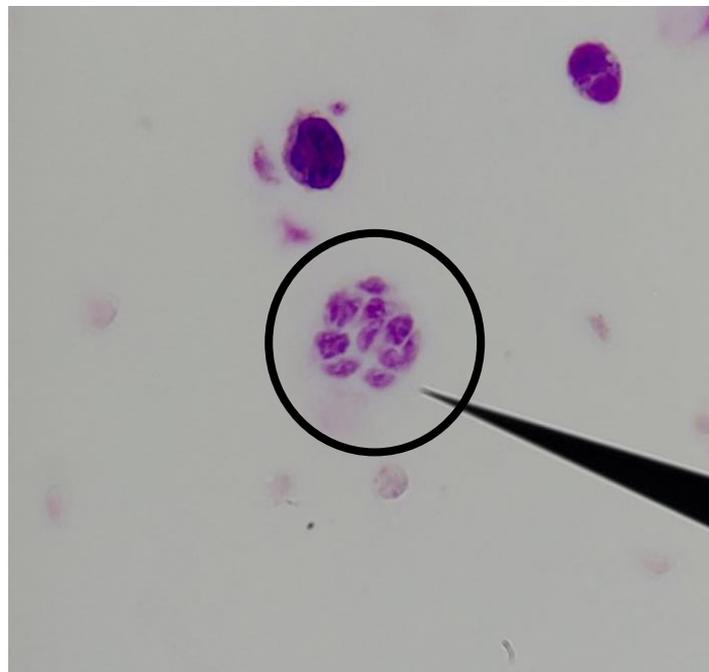
**Figura 5** - Secuencia de eventos de división por endodiogenia. Márcia Attias *et al*, 2020<sup>(24)</sup>.

Por otro lado, la fase asexual (endodiogenia) (figura 5) puede originarse en cualquiera de los hospedadores intermediarios cuando éstos entran en contacto con el material fecal (ooquistes esporulados) del hospedero definitivo o por la ingestión de bradizoítos albergados en quistes tisulares de otros hospedadores intermediarios (figura 1)<sup>(23,24)</sup>.

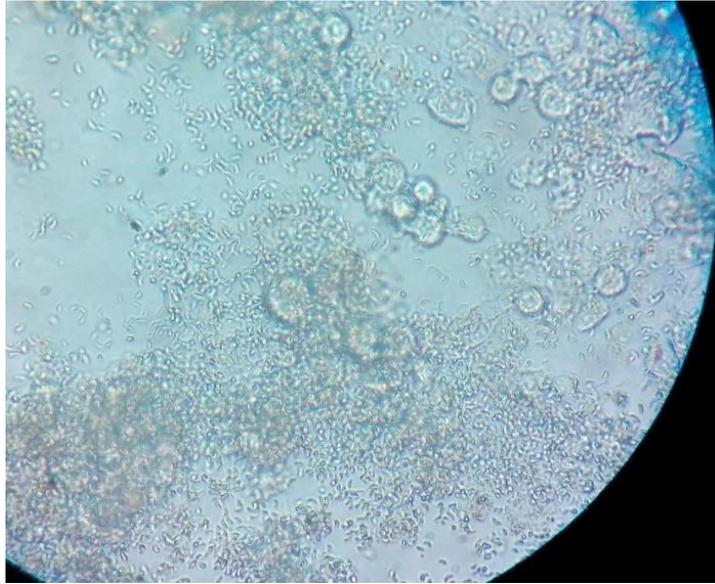
#### 1.2.5. Morfología de *Toxoplasma gondii* en modelo murino y línea celular.



**Figura 6** - Quiste de *Toxoplasma gondii* en cerebro de ratón con tinción de giemsa. Christian A. Guerra-Manihuari, 2019.

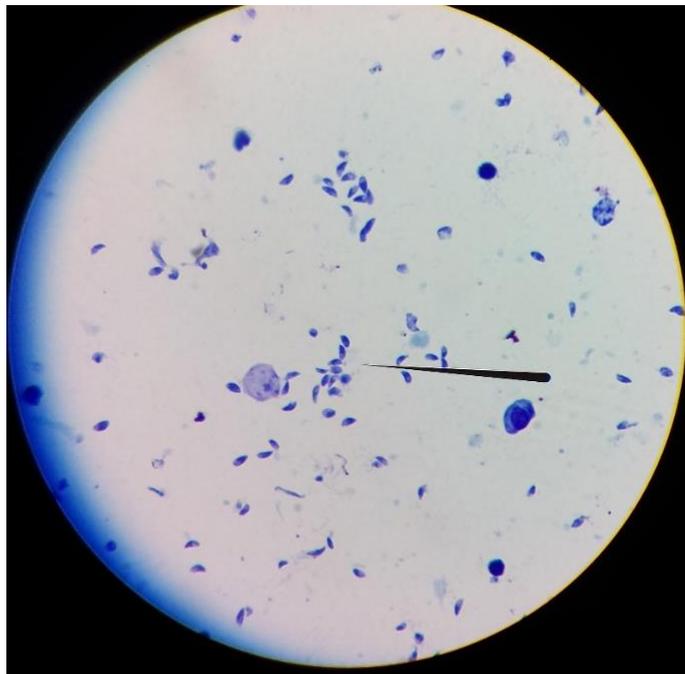


**Figura 7** - Quiste tisular de *Toxoplasma gondii* en línea celular con tinción de giemsa. Christian A. Guerra-Manihuari, 2019.



**Figura 8** - Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* lisando una línea celular.

Christian A. Guerra-Manihuari, 2019.



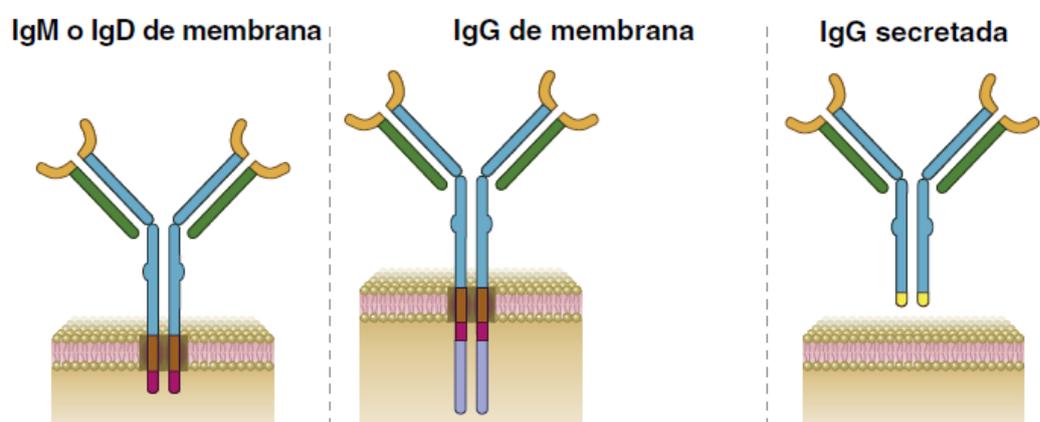
**Figura 9** - Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* en tinción de giemsa. Christian

A. Guerra-Manihuari, 2019.

### 1.2.6. Anticuerpo

Proteína circulante, producida en respuesta a la exposición a estructuras extrañas conocidas como antígenos, que son mediadores de la inmunidad humoral frente a todas las clases de microbios. Constituyen aproximadamente el 20% de la proteína total del plasma sanguíneo, puesto que, la sangre contiene tres tipos de globulinas,  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ , en función de su tasa de migración electroforética<sup>(25,26)</sup>.

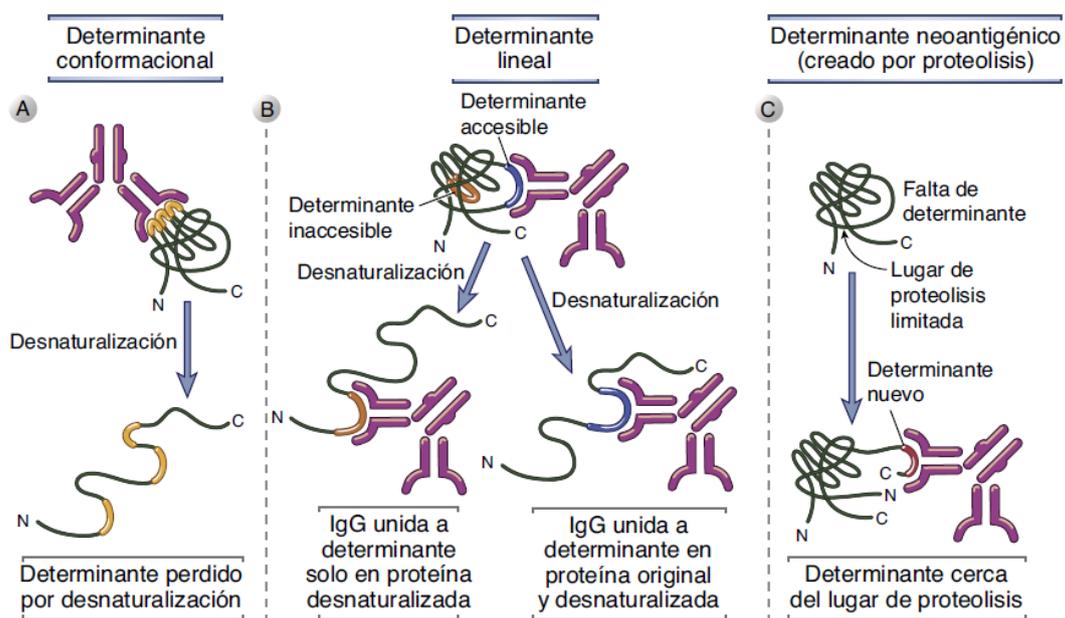
Los anticuerpos son gama ( $\gamma$ ) globulina y existen cinco clases: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. La función más importante de los anticuerpos es neutralizar toxinas y virus, opsonizar microorganismos y facilitar la fagocitosis, activar el sistema de complemento y prevenir la adhesión de los microorganismos a la mucosa. Los anticuerpos solo son sintetizados por células B y existen en dos formas: los anticuerpos unidos a la membrana en la superficie, que actúan como receptores de antígenos, y los anticuerpos secretados, que sirven para la defensa frente a organismos patógenos<sup>(25,26)</sup>.



**Figura 10** - Forma membranaria y secretada de los anticuerpos, Abbas *et al*, 2022<sup>(25)</sup>.

### 1.2.7. Antígeno

Cualquier sustancia que pueda unirse específicamente a una molécula de anticuerpo o al receptor de células T (TCR). Los antígenos son reconocidos por anticuerpos, y pueden ser cualquier tipo de molécula biológica, como metabolitos intermediarios simples, azúcares, lípidos, autacoides y hormonas, así como macromoléculas, glúcidos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas<sup>(25)</sup>.

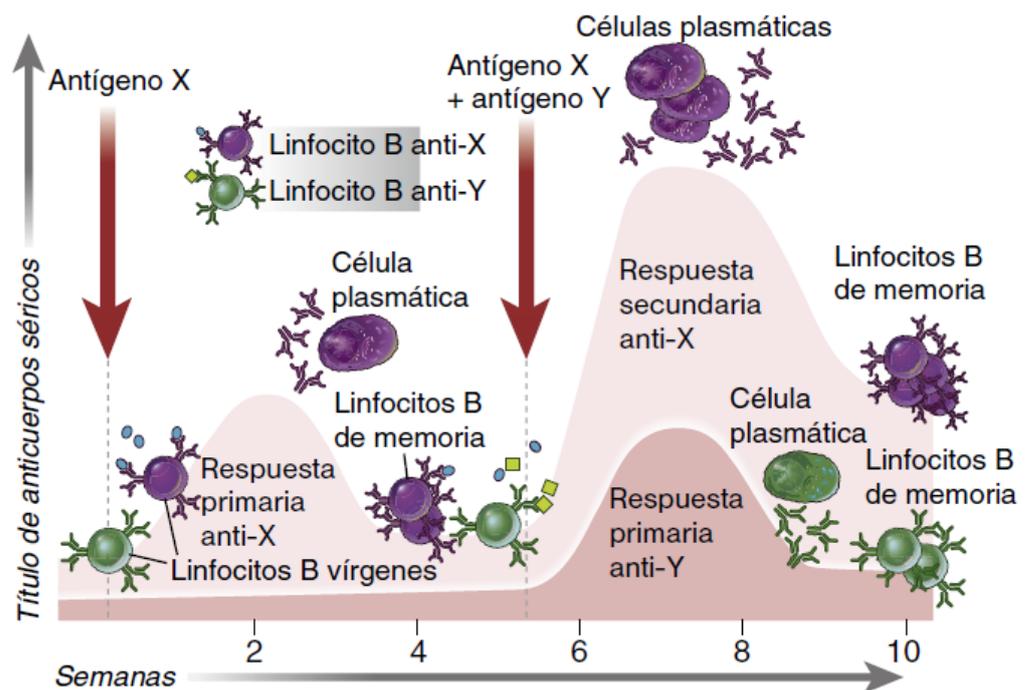


**Figura 11** - Naturaleza de los determinantes antigénicos, Abbas *et al*, 2022<sup>(25)</sup>.

### 1.2.8. Respuesta Inmunitaria adaptativa

La respuesta inmunitaria adaptativa esta mediada por células denominadas linfocitos y sus productos. Los linfocitos expresan receptores muy diversos capaces de reconocer un enorme número de antígenos. Existen dos poblaciones principales de linfocitos, linfocitos B y T, que median diferentes tipos de respuesta inmunitaria adaptativa. Pero para proteger al individuo con eficiencia, el sistema inmunitario

debe satisfacer cuatro necesidades principales. La primera es el reconocimiento inmunitario: es necesario detectar la presencia de una infección. La segunda tarea es contener la infección y de ser posible eliminarla, lo que pone en marcha la función efectora inmunitaria; al mismo tiempo, la respuesta inmunitaria debe de mantenerse controlada de que no dañe por si misma al organismo. De esta manera el organismo tiene la capacidad de regularizarse o autorregularse. La cuarta y última tarea es proteger al organismo contra enfermedades recurrentes de los mismos patógenos y generar una memoria inmunitaria exitosa<sup>(25,27)</sup>.



**Figura 12** - Respuesta inmunitaria adaptativa. Abbas *et al*, 2022<sup>(25)</sup>.

#### 1.2.9. Respuesta inmune en infección por *Toxoplasma gondii*.

Los huéspedes que albergan el parásito, desarrollan respuesta inmune de tipo celular como humoral, y hay protección contra la reinfección. La inmunidad se logra en la infección inicial, mediante la actividad

reproductiva intracelular y destrucción celular del parásito. A medida que se genera la respuesta inmune, y mediante la síntesis de anticuerpos, se lisan los parásitos y estimulan la producción de quistes tisulares; en este momento los Taquizoítos son lisados por la acción de los anticuerpos y sistema de complemento, pero no destruyen los bradizoítos intracelulares en fibroblastos, fibra muscular, células hepáticas y neuronas. Por otro lado, la destrucción de parásito también se genera tras la respuesta de los macrófagos, por la vía metabólica oxidativa, donde el interferón gama estimula a los fagocitos para liberar peróxido, lo que genera la lisis del parásito. Sin embargo, en los macrófagos no se activa el sistema, ya que el parásito genera una vacuola parasitófora, lo que le permite evadir la respuesta inmune, y cuando existe una baja de inmunidad, se rompen los quistes y se produce reacción inflamatoria de tipo celular, mediada por los linfocitos T y macrófagos<sup>(28)</sup>.

#### 1.2.10. Patología y patogenia

La severidad del síndrome clínico es determinada por el grado de necrosis celular y de la reacción inflamatoria<sup>(29)</sup>.

##### 1.2.10.1. *Toxoplasma gondii* y los Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos aumentan de tamaño, hay hiperplasia de las células reticulares, semejante a un granuloma, a veces con células epitelioides, principalmente en los folículos germinativos. Además, se observan grupos de macrófagos con citoplasma eosinófilico. Rara vez se encuentra el parásito en cortes histológicos<sup>(28,30)</sup>.

#### 1.2.10.2. *Toxoplasma gondii* en Músculos, pulmones e hígado

En el corazón y músculo esqueléticos se da invasión celular intersticial y fibras musculares, con destrucción de las células en fase aguda o formación de quistes en la fase crónica. Cuando hay diseminación a los pulmones, los macrófagos alveolares y otras células pueden estar parasitadas, y aparecen focos de necrosis, pero no se forman abscesos o cavidades. Por último en el hígado invade cualquier línea celular presente, lo que genera toxoplasmosis hepática<sup>(28,30)</sup>.

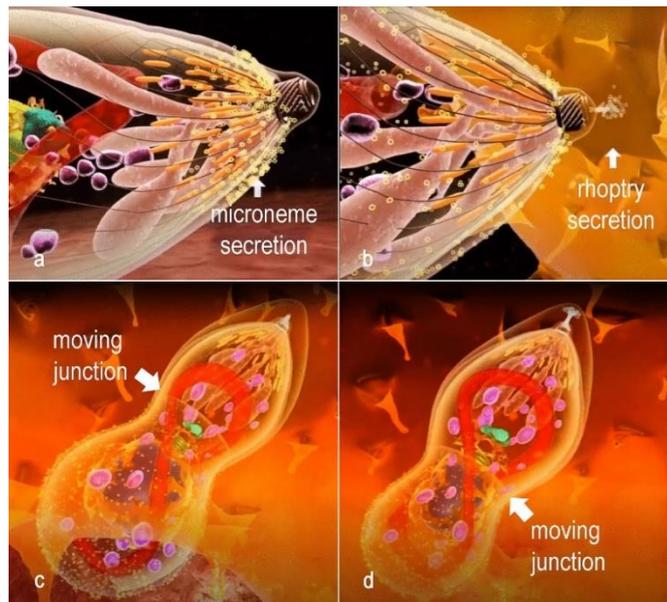
#### 1.2.10.3. *Toxoplasma gondii* en sistema ocular

Es considerado una de las localizaciones más importantes y frecuentes del parásito. Donde se produce retinocoroiditis o uveítis anterior granulomatosa, intensa inflamación de la retina, presencia de quistes y varios grados de necrosis<sup>(28,30)</sup>.

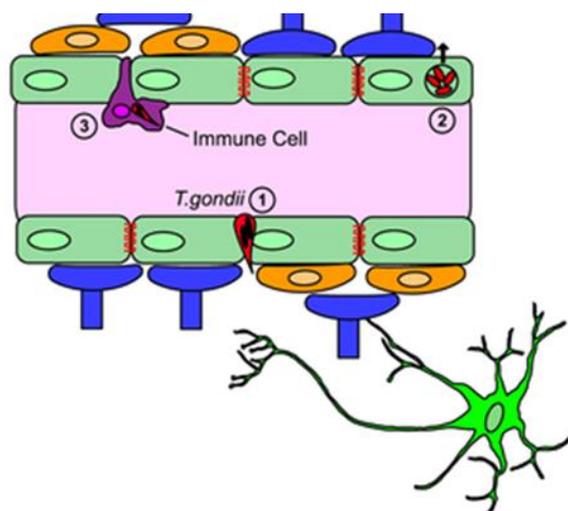
#### 1.2.10.4. *Toxoplasma gondii* y el Sistema Nervioso Central

Diferentes investigaciones indican que *T. gondii* cruza la barrera hematoencefálica del sistema nervioso central a través de diferentes métodos celulares. La barrera Hematoencefálica está formada de microvasos rodeados por una capa celular endotelial con alianzas estrechas, donde los pericitos envuelven las uniones estrechas y los astrocíticos proporcionan la capa final. Sin embargo *T. gondii* no posee cilios y flagelo, pero es capaz de impulsarse utilizando motores de antina - miosina lo que genera movimiento "motilidad deslizante" (figura 7). Ante esta suposición, se han presentado modelos de ingreso de *T. gondii* al SNC. Primer modelo, entrada paracelular: en la que *T. gondii* migra directamente a través de las uniones estrechas de la capa

celular endotelial. Segundo modelo, entrada trascelular: en la que *T. gondii* infecta células endoteliales, se replican y luego salen por el otro lado basolateral de las células endoteliales (lisando célula huésped), y tercer modelo, “Caballo de Troya”: mediante el cual *T. gondii* infecta una célula inmunitaria y se infiltra en el SNC, luego lisa la célula y entra al parénquima cerebral (figura 8)<sup>(31)</sup>.



**Figura 13** - Invasión de Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* a una célula huésped. Márcia Attias *et al*, 2020<sup>(24)</sup>.



**Figura 14** - Interacción física y celular entre el SNC y *Toxoplasma gondii*.

Oscar A. Méndez *et al*, 2017<sup>(31)</sup>.

### 1.2.11. Enfoque matemático para analizar datos serológicos

Para determinar el estado serológico de un individuo utilizamos dos enfoques.

#### 1.2.11.1. Enfoque matemática tradicional

Se manipula una muestra de un individuo no expuesto para determinar la distribución de los títulos de anticuerpos en una población seronegativa subyacente. Estadísticamente, los títulos de anticuerpos son transformados logarítmicamente para tener una aproximación de distribución gaussiana de los datos; entonces, se define la clasificación serológica de la muestra por la regla de 3 desviaciones estándar para determinar el rango de los títulos de anticuerpos bajo el supuesto de una variable aleatoria gaussiana de los datos. En dónde se clasifica como seropositivos si los títulos de anticuerpos exceden la media más 3 desviaciones estándar, de lo contrario los individuos se consideran seronegativos<sup>(8)</sup>.

#### 1.2.11.2. Enfoque matemático de Unidades Arbitrarias (UA)

Asumimos que la muestra está compuesta por una mezcla de seronegativos y seropositivos latentes; dónde se analizan muestras mediante el modelo gaussiano de mezclas de dos poblaciones; valor promedio ( $\mu_0$ ) y desviación estándar ( $\sigma_0$ ) para los seronegativos, y valor promedio ( $\mu_1$ ) y desviación estándar ( $\sigma_1$ ) para los seropositivos, la distribución de muestreo se describe mediante la siguiente ecuación<sup>(8)</sup>:

$$f(\{x_i\} | \mu_0, \mu_1, \sigma_0, \sigma_1, \pi) = \prod_{i=1}^n \left[ (1 - \pi) f_{N(\mu_0, \sigma_0)}(x_i) + \pi f_{N(\mu_1, \sigma_1)}(x_i) \right]$$

Dónde  $X_i$  es el nivel de anticuerpos del número de individuos;  $f_{N(\mu_0, \sigma_0)}$

$f_{N(\mu_1, \sigma_1)}^{(X_i)}$  son probabilidades de poblaciones seronegativas y

seropositivas, y  $\pi$  es la probabilidad de muestrear un individuo seropositivo de la población. A partir de este punto la probabilidad de clasificación de un individuo con títulos  $x$  de anticuerpos como seropositivo o seronegativo es en base a la siguientes fórmulas<sup>(8)</sup>:

$$p_{+|x} = \frac{\pi f_{N(\mu_1, \sigma_1)}(x)}{(1 - \pi) f_{N(\mu_0, \sigma_0)}(x) + \pi f_{N(\mu_1, \sigma_1)}(x)},$$

$$p_{-|x} = 1 - p_{+|x}.$$

Y la clasificación final de los individuos en la población se describe de la siguiente manera:

$$C_i = \begin{cases} \text{seronegative,} & \text{if } x_i \leq c^- \\ \text{indeterminate,} & \text{if } c^- < x_i < c^+ \\ \text{seropositive,} & \text{if } x_i \geq c^+, \end{cases}$$

Donde  $C^-$  y  $C^+$  son valores de corte de anticuerpos que aseguran una clasificación mayor al 95%; sin embargo, aquellos individuos con títulos de anticuerpos entre  $C^-$  y  $C^+$  son considerados indeterminados<sup>(8)</sup>.

### 1.3. Definición de términos básicos

- **Seropositividad:** Resultado de una prueba de laboratorio que indica la presencia de un marcador específico, por lo común un anticuerpo, en la sangre(32).
- **ELISA:** Ensayo de Inmunoadsorción ligado a Enzimas. Es un ensayo serológico para determinar anticuerpos séricos en muestras de suero o plasma(32).
- **ISAGA:** Ensayo de aglutinación inmunoabsorbente. Es un ensayo serológico que permite de manera cualitativa ver la reacción entre antígeno y anticuerpo<sup>(10)</sup>.
- **IMB-ELISA:** El ensayo de nanodiagnóstico perla inmunomagnética, es una prueba serológica que permite la captura de antígeno mediante nanotecnología magnética<sup>(14)</sup>.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa. Técnica molecular que permite la amplificación *in vitro* de una muestra de ADN de interés en varias copias idénticas<sup>(5)</sup>.
- **Anticuerpo:** proteína sérica de defensa que se genera frente a una respuesta inmune del hospedero infectado(25).
- **Antígeno:** proteína extraña que provoca una respuesta inmunitaria(25).
- **Respuesta inmunitaria:** capacidad del organismo en reconocer lo propio y lo no propio frente a una infección o respuesta primaria(25).

## CAPÍTULO II: HIPOTESIS Y VARIABLES

### 2.1. Formulación de la hipótesis

Empleando Unidades Arbitrarias de Anticuerpos podemos determinar la seropositividad de una población con VIH expuesta o no expuesta a *Toxoplasma gondii*.

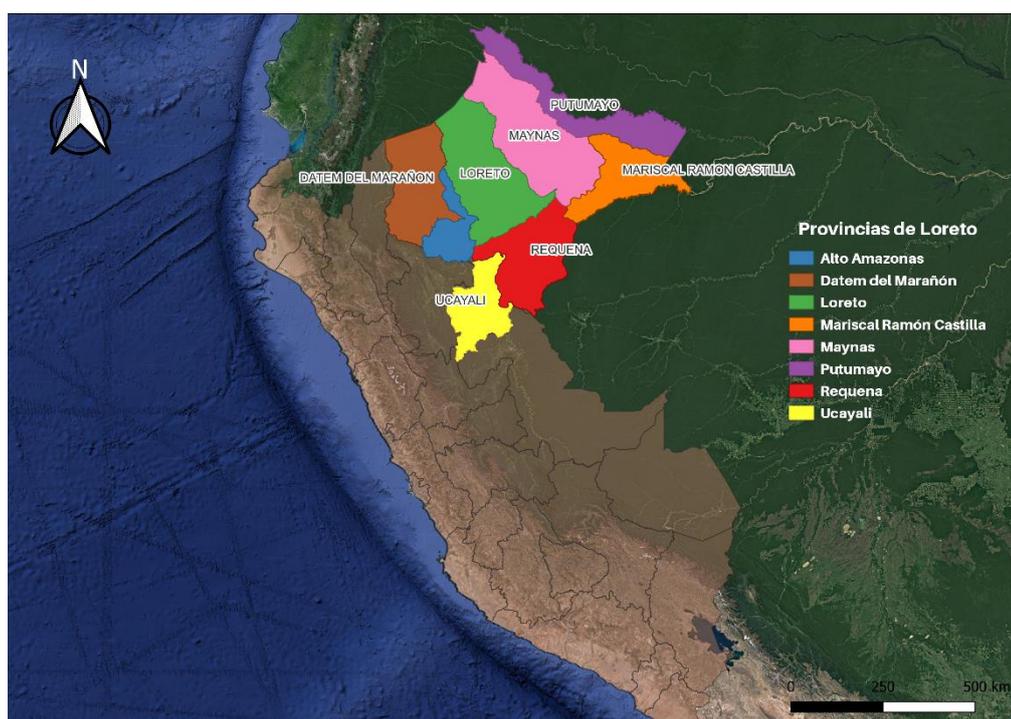
### 2.2. Variables, indicadores e índices

Variable	Definición	Tipo por su naturaleza	Indicador	Índices	Escala de medición	Valores
Seropositividad	Presencia de un marcador específico en respuesta a una sustancia extraña producida por un organismo patógeno(32).	Cuantitativo	Positivo	Unidades arbitrarias de anticuerpos	Razón	> 1 – 2048 UA
			Negativo		Razón	< 1 UA

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Área de estudio

El estudio se realizó en la región Loreto ( $18^{\circ} 45' 49'' S$   $73^{\circ} 16' 18'' W$ ), que se encuentra dividido en 8 provincias: Maynas, Putumayo, Mariscal Ramón Castilla, Loreto, Requena, Ucayali, Alto Amazonas y Datem del Marañón. Ubicada al nororiente del Perú.



**Figura 15** - Mapa de la Región Loreto. Ramón Aguilar-Manihuari, 2023.

### 3.2. Tipo y diseño de estudio

El estudio fue de tipo no experimental descriptivo, con alcance analítico, de corte transversal y retrospectivo, desarrollado en el Centro de Investigación de Recursos Naturales - CIRNA, Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología, ubicado en la ciudad de Iquitos, provincia de Maynas, departamento de Loreto.

### 3.3. Diseño muestral

#### 3.3.1. Población

La población de estudio estuvo constituida por los participantes enrolados entre los años 2019 y 2022 en el Hospital Regional de Loreto “Felipe Santiago Arriola Iglesias” provenientes del proyecto: “Diagnóstico Novedoso de Nanopartículas para el Estudio de Toxoplasmosis y Chagas cerebral en pacientes con VIH que viven en América Latina”. El estudio incluyó tres grupos: pacientes hospitalizados con síndromes neurológicos, pacientes hospitalizados sin síndromes neurológicos, e individuos asintomáticos que acuden a consulta ambulatoria.

#### 3.3.2. Selección de la muestra

Un total de 100 muestras de sangre fueron colectadas (previo consentimiento informado del participante o tutor del mismo) utilizando el protocolo bajo la aprobación ética del Hospital Regional de Loreto (anexo 3), ubicado en la ciudad de Iquitos, distrito de Punchana, provincia de Maynas, departamento de Loreto.

#### 3.3.3. Criterio de selección

##### 3.3.3.1. Criterios de Inclusión

- Pacientes que contaron con consentimiento informado del proyecto “Diagnostico Novedoso de Nanopartículas para el estudio de Toxoplasmosis y Chagas en pacientes VIH que viven en América Latina.

- Pacientes seropositivos a VIH mayores de 18 años que fueron atendidos en el Hospital Regional de Loreto “Felipe Santiago Arriola Iglesias”

#### 3.3.3.2. Criterio de exclusión

- Pacientes que no participaron del proyecto: “Diagnostico Novedoso de Nanopartículas para el estudio de Toxoplasmosis y Chagas en pacientes VIH que viven en América Latina.
- Pacientes seronegativos a VIH y menores de 18 años.

#### 3.4. Material biológico y muestra control

##### 3.4.1. Procesamiento de la muestra sanguínea

Se colectó 6 ml de sangre venosa en un tubo colector con activador de coágulo, luego se procedió a centrifugar la muestra a 3250 RPM por 10 minutos a 20 °C. Posterior a eso se separó el suero del coágulo en diferentes viales de 1.5 ml, y guardados a – 20°C hasta su posterior uso<sup>(33)</sup>.

##### 3.4.2. Obtención de las muestras control

Las muestras de sueros control (positivo y negativo) que se obtuvieron de pacientes con PCR en tiempo real (qPCR) positivo o negativo al gen repetitivo 529 (REP529) en líquido cefalorraquídeo, e IgG positivo o negativo a *Toxoplasma gondii* (previa revisión del consentimiento informado y la autorización del uso futuro de muestras biológicas del paciente)<sup>(34)</sup>.

#### 3.4.3. Obtención del Antígeno Lisado Total (ATL) de *Toxoplasma gondii*

Se obtuvo ATL de Taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa referencial internacional RH) por parte del Laboratorio de Biología Molecular - 116 del Instituto de Investigación en Enfermedades Infecciosas, en colaboración con la Universidad Peruana Cayetano Heredia, y el Centro de Investigación en Recursos Naturales de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

#### 3.4.4. Medición de títulos de IgG

Se realizó un Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos IgG anti – *Toxoplasma gondii*.

Se diluyó el ATL con una solución salina tamponada de Bicarbonato Carbonato (BBC) (marca Teknova) hasta una concentración final de 1µg/ml y se añadió 100 µl de la dilución a cada pozo de las placas inmunoabsorbente (marca Nunc). Posterior a esto, se dejó incubando durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron cinco veces en rotación constante por 5 minutos con solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7,4 (marca Sigma), que contenía Tween 20 (marca Merck) al 0,05 % (PBS-T). A continuación, las placas se bloquearon con una solución de bloqueo (PBS 1x que contenía leche desnatada al 5 %) durante 2 h. Culminado el tiempo se procedió a lavar cinco veces con PBS-T. Luego, se diluyeron los sueros problemas en concentración de 1:500 con solución de lavado (Tween 20 al 0,05 %, PBS 1X) que contenía leche desnatada al 1 % antes de añadir 100 µl a cada pozo de la placa por duplicado e incubarse durante 1 hora a 37°C. Culminado el tiempo de incubación, se lavó cinco veces la placa con solución de

lavado para eliminar los anticuerpos residuales. A continuación, se incubó una dilución de 1:10000 de anticuerpos secundarios anti-humanos de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (marca Southern Biotech) y se añadió 100 µl a cada pozo de la placa e incubado durante 1 h a 37°C. Después de la incubación, las placas se lavaron tres veces con solución de lavado para eliminar los anticuerpos secundarios restantes y dos veces con PBS 1X. Luego, se agregó 50 µl de 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (marca Sigma) a los pozos para detectar la presencia de anticuerpos secundarios. Después de 3 minutos de incubación, esta reacción se detuvo mediante la adición de 50 µl de HCl 0,25 M. Finalmente se realizó la lectura mediante densidades ópticas (DO) a 450 nanómetros (nm) utilizando un lector de placas (OSYS MR DINEX). Todas las muestras se evaluaron por duplicado, y en cada placa se tuvo un grupo de sueros de control positivo compuesto por 15 muestras positivas para IgG específicas a *Toxoplasma gondii* y se diluyó en proporciones establecidas de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200, 1:6400, 1:12800, 1:25600, 1:51200 y 1:102,400, así como tres controles negativos de residentes sanos, Perú (n=2) y EE. UU. (n = 1) que nunca han estado expuestos a *Toxoplasma gondii* (anexo 1)<sup>(17,35-38,38-40)</sup>.

#### 3.4.5. Definición de seropositividad

Todo este análisis se realizó en el programa R estudio, utilizando el paquete “placa” que permite convertir los datos en forma de placa (fácil de pensar) en datos ordenados (fácil de analizar), disminuir errores sistemáticos y estimar las Unidades Arbitrarias de Anticuerpos a partir

de densidad óptica, con el fin de mantener la calidad de las muestras, eliminar réplicas y reducir observaciones<sup>(41)</sup>.

#### 3.4.6. Método tradicional

Definimos la población seronegativa de una muestra, además de las de interés a analizar, es decir, una población de individuos no expuestos. Dónde definimos positivos si se exceden de la media más tres desviaciones estándar (SD) de la población seronegativa utilizando la densidad óptica en escala logarítmica, siempre y cuando se tenga la población de individuos no expuestos(anexo 2)<sup>(8,17,42)</sup>.

#### 3.4.7. Método de Unidades Arbitrarias (UA)

Se optimizó las lecturas de densidad óptica (OD) obtenidas mediante el ensayo de ELISA para poder convertir OD en UA. En dónde cada placa tuvo una dilución seriada en la fila A, y a cada dilución seriada se le otorgó una unidad arbitraria de anticuerpo, la cual se determinó de acuerdo a su dilución conocida. Se extrajo el recíproco de la dilución inicial para ser dividida con el recíproco final (factor final entre la dilución), y a partir de esa fracción se calculó las UAA a parte de la muestra problema por duplicado, blanco, y controles (positivos y negativos). A partir de este modelo creamos una curva estándar usando las OD y las UAA de la dilución seriada, mediante un modelo log – logístico de cuatro parámetros con el paquete drc. Posteriormente, se creó el control de calidad de las réplicas con el coeficiente de variación intraplaca y se usó la curva estándar para estimar los valores de UAA para cada muestra problema (valor puntual e intervalo de confianza), y con estos valores poder clasificar positivos y negativos mediante la

distribución de UAA, usando curva de distribución normal “modelo de mixtura de distribución gaussiana”(anexo 2)<sup>(8,17,42)</sup>.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1. Establecimiento de una curva estándar

Utilizando la metodología de *Sepúlveda et al, 2015, Miura et al, 2008*.

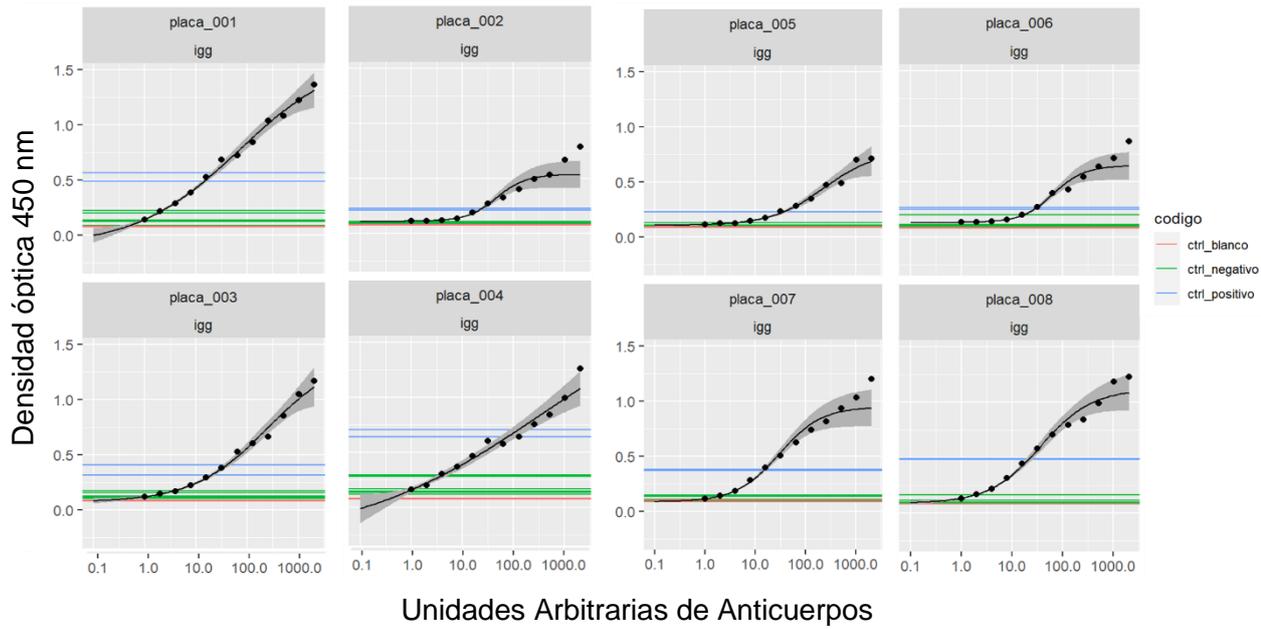
Para poder determinar unidades arbitrarias de anticuerpos, se realizó 12 veces la dilución seriada de un pool de muestras positivas, y a partir de esa fracción se calculó las unidades arbitrarias (Tabla 1).

**Tabla 1** – Calculo de las UA a partir de la dilución seriada.

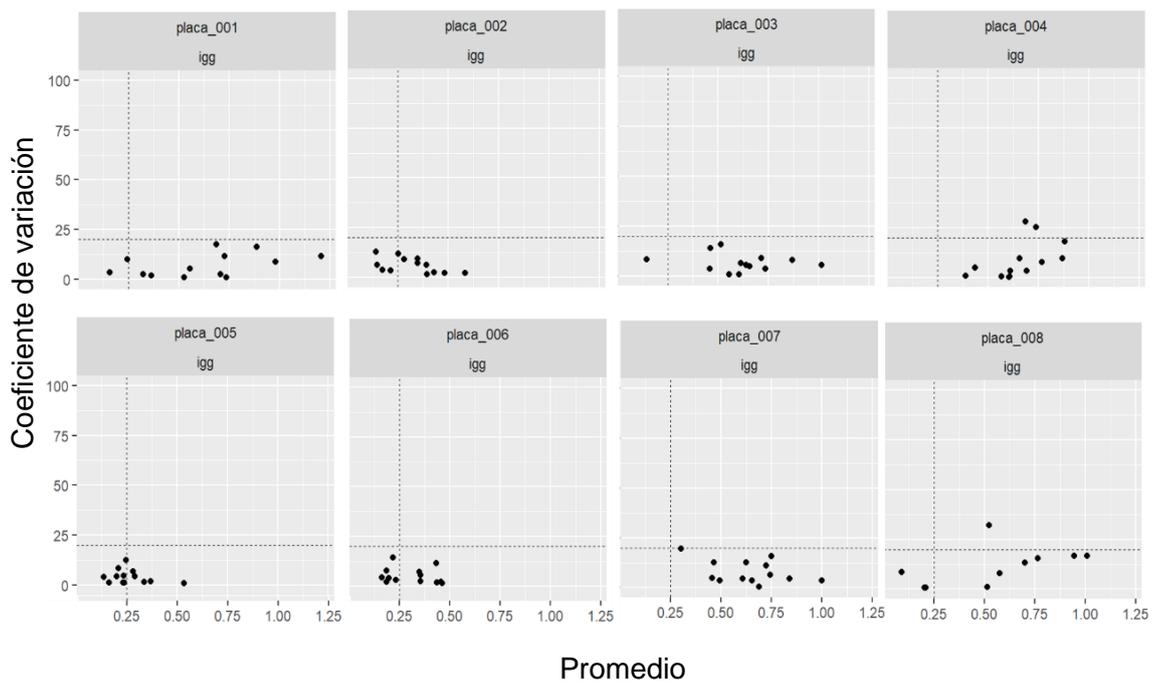
Dilución	Recíproco de dilución	Factor	UA
STD 1/50	50	102400/50	2048
STD 1/100	100	102400/100	1024
STD 1/200	200	102400/200	512
STD 1/400	400	102400/400	256
STD 1/800	800	102400/800	128
STD 1/1600	1600	102400/1600	64
STD 1/3200	3200	102400/3200	32
STD 1/6400	6400	102400/6400	16
STD 1/12800	12800	102400/12800	8
STD 1/25600	25600	102400/25600	4
STD 1/51200	51200	102400/51200	2
STD 1/102400	102400	102400/102400	1

### 4.2. Predicción de la curva estándar e intervalo de confianza.

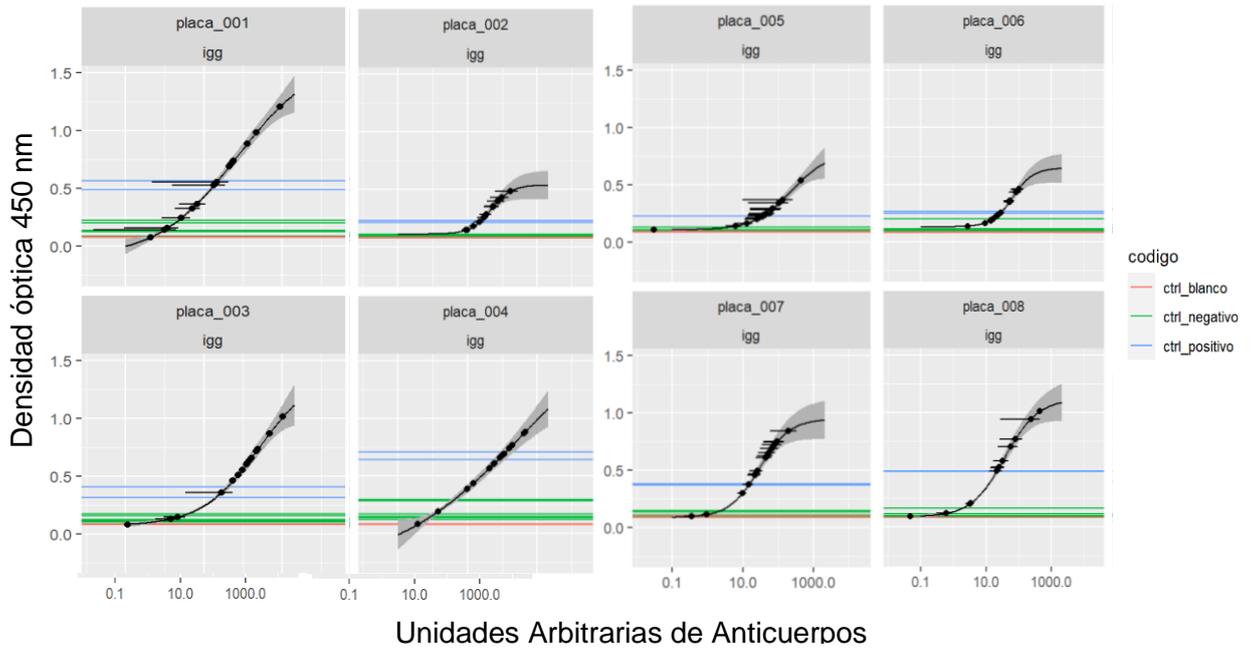
Las unidades arbitrarias se estimaron a partir de la densidad óptica (eje Y) de una dilución seriada con referencia a una curva estándar que se personifica en el eje X (figura 9). Para luego realizar el control de calidad de réplicas con el coeficiente de variación intraplaca (figura 10); De esta manera, estimar las unidades arbitrarias para la curva y muestras problemas (valor puntual e intervalo de confianza) (figura 11).



**Figura 16** - Modelo predictivo por placa para estimar UA



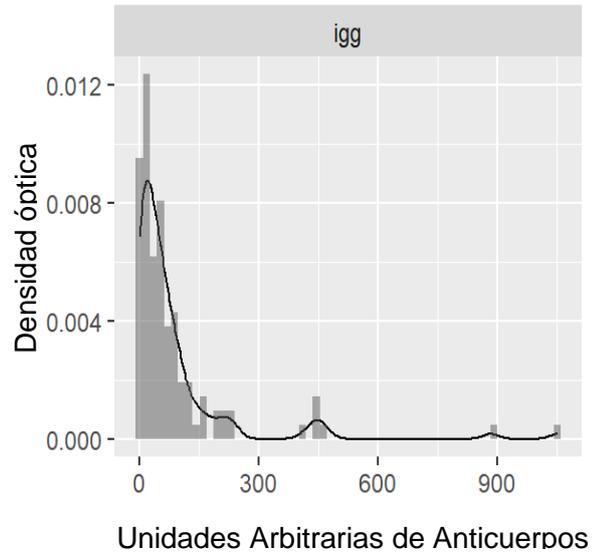
**Figura 17** - Control de calidad de réplicas con el coeficiente de variación intraplaca.



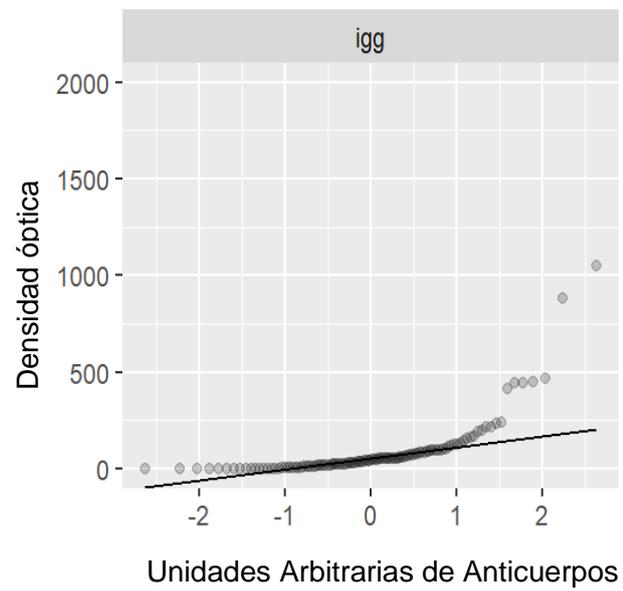
**Figura 18** - Regresión inversa para estimar valores de UA de la curva estándar y muestras problemas.

#### 4.3. Distribución de anticuerpos

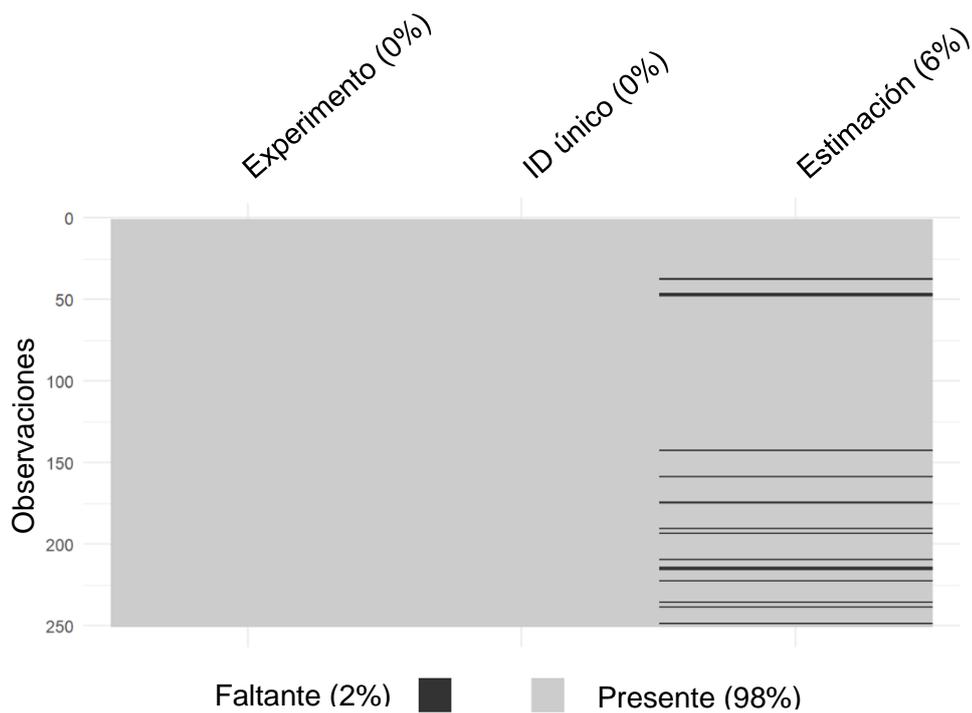
Para poder determinar la seropositividad de anticuerpos anti – *Toxoplasma gondii*, y clasificarlos como negativos y positivos a partir de las Unidades Arbitrarias, se realizó la distribución lineal gaussiana (figura 12) y distribución normal gaussiana (figura 13), usando el método de clasificación por modelo de mixtura de distribución gaussianas a partir de las densidades ópticas (eje y) y la estimación de unidades arbitrarias (eje x). Además de la identificación de valores faltantes como control de calidad (figura 14).



**Figura 19** - Distribución lineal gaussiana de las UA



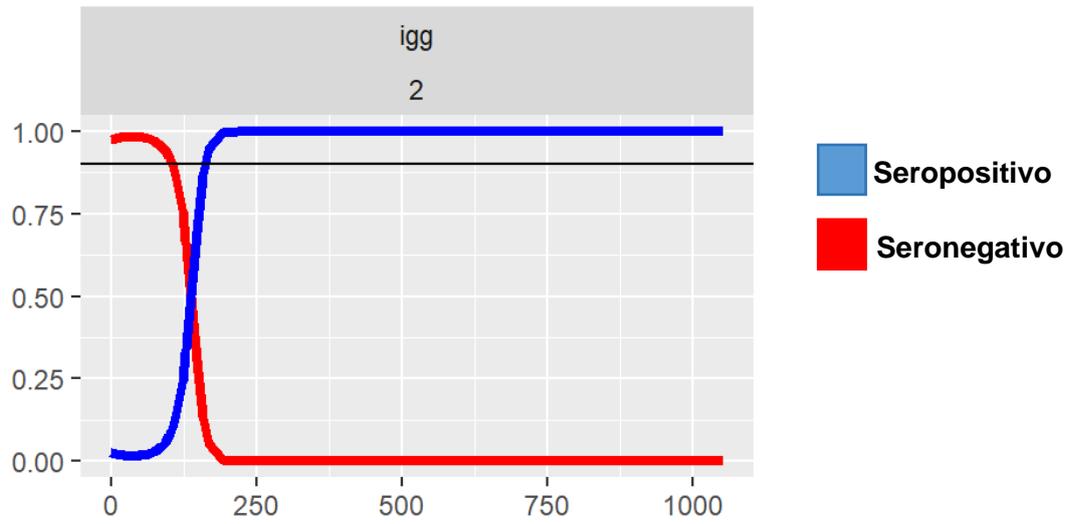
**Figura 20** - Distribución normal gaussiana de UA



**Figura 21** - Identificación de valores faltantes

#### 4.4. Determinación de la seropositividad

Para poder determinar el estado serológico de nuestra población; definimos el punto de corte únicamente a partir de los datos bajo análisis, asumimos que las muestras están compuestas por una mixtura de distribución gaussianas de dos componentes aplicando un método estadístico de clasificación de mixtura gaussianas para poder determinar la media y desviación estándar (SD) de dos poblaciones (positiva y negativa) (figura 15).



**Figura 22** - Curva de probabilidad de clasificación predicha por el modelo de mezcla gaussiana de dos poblaciones

#### 4.5. Clasificación serológica

La clasificación serológica se realizó mediante el punto de corte en base a la probabilidad de clasificación mayor al 95%, teniendo como resultados para el método matemático tradicional con un punto de corte a partir de la densidad óptica > 0.213 OD, donde se obtuvo resultado de 89 seropositivos, y < 0.213 OD, se obtuvo resultados de 11 seronegativos, mientras que, para el método de unidades arbitrarias, definimos un punto de corte > 2 UA, donde se obtuvo resultados de 95 seropositivos, y < 2 UA, se obtuvo resultados de 3 seronegativos; Sin embargo, obtuvimos 2 muestras que no superaban o se encontraban cerca del punto de corte, a estas muestras lo clasificamos como indeterminados (tabla 2).

**Tabla 2** - Clasificación serológica

Método empleado	N° placas	Tipo de experimento	N° muestras	Replicas por muestra	Tipo de lectura	Punto de corte promedio	Desviación estándar promedio	Clasificación serológica	Porcentaje	
<b>Método tradicional</b>	8	IgG	100	2	Densidad óptica	> 0.213	8.221 OD	<b>Seropositivos</b>	89	89.0%
								<b>Seronegativos</b>	11	11.0%
								<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100.0%</b>
<b>Método de Unidades Arbitrarias</b>	8	IgG	100	2	Estimación de Unidades Arbitrarias	> 2	102 UA	<b>Seropositivos</b>	95	95.0%
								<b>Seronegativos</b>	3	3.0%
								Indeterminados	2	2.0%
								<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100.0%</b>

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

Es importante enfatizar que la presente investigación se centra en diferentes literaturas utilizadas para determinar la seropositividad de pacientes con VIH contra *Toxoplasma gondii*. Se señalan varias investigaciones que proponen enfoques y técnicas de diagnóstico para detectar la exposición a *T. gondii*<sup>(43,44)</sup>.

Uno de los métodos más manejados es el de ELISA, técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico de *T. gondii*. Sin embargo, se recalca que aún no existe un método universal para determinar la seropositividad de una población en particular<sup>(11)</sup>.

Para abordar esta limitación, se menciona el desarrollo de un nuevo método de diagnóstico llamado “Nano-Gold ELISA” propuesto por Nagwa SM Aly. *et al*, 2022. Según su estudio, este método revela una alta sensibilidad (97,3%) y especificidad (100%) en la detección de *T. gondii*<sup>(9)</sup>.

En contraste, otro estudio realizado por Maude F. Lévêque. *et al*, 2022, quien, evaluó sueros de cordón umbilical y sangre periférica de bebés para precisar el diagnóstico de la Toxoplasmosis congénita. Los resultados mostraron anticuerpos IgA e IgM anti-*Toxoplasma* con una sensibilidad relativamente baja (60.57 y 73.26%), lo que sugiere que estos seromarcadores pueden no ser adecuados para el diagnóstico serológico de la enfermedad<sup>(10)</sup>.

Además, se menciona un estudio realizado por Masoumeh Mardani-Kataki. *et al*, 2022, que realizó la técnica de Inmuno-PCR de IgG e IgM

contra *T. gondii*. Los resultados mostraron una sensibilidad del 66.0% y una especificidad del 60.0%, sin embargo, él sugiere investigación adicional para mejorar estos resultados<sup>(11)</sup>.

Otros enfoques incluyen el uso de un Nano kit-ELISA desarrollado por Khodadadi, A., *et al*, 2020, que mostró una sensibilidad y especificidad del 80%<sup>(12)</sup>, así como el uso de Nanopartículas de microesferas magnéticas propuesta por Shereen Hegazy, *et al*, 2015, que publicó resultados favorables en el diagnóstico de la toxoplasmosis<sup>(14)</sup>.

No obstante, D Iddawela, *et al*, 2015, a través de su investigación demostró una alta sensibilidad del ELISA interno, refutando el trabajo desarrollo por los kit comerciales<sup>(13)</sup>.

Por consiguiente, es necesario destacar la necesidad de buscar nuevos instrumentos y enfoques estadísticos para determinar la seropositividad. En este sentido, se menciona la propuesta de Sepúlveda, *et al*, 2015<sup>(8)</sup>, que utiliza modelos matemáticos y enfoques estadísticos para analizar datos de anticuerpos, lo cual nos ha permitido establecer una curva estándar con un probabilidad de clasificación mayor al 95% y estimar valores de unidades arbitrarias de anticuerpos en cada muestra problema.

## **CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN**

- Se logró determinar una curva estándar, y estimar unidades arbitrarias de anticuerpos.
- Se determinó el estado serológico para cada muestra problema; teniendo como resultado final 89% seropositivos y 11% seronegativos, aplicando el método matemático tradicional, mientras que, para el método de unidades arbitrarias, obtuvimos resultados del 95% seropositivos, 3% seronegativos, y 2% indeterminados.
- Se demostró mediante la comparación de datos de ambos métodos, que el método de unidades arbitras de anticuerpos permite de manera general expresar resultados de datos de anticuerpos y poder determinar el estado serológico de un individuo sin la necesita de tener una población no expuesta.
- Además, nuestros hallazgos pueden contribuir a una mejor comprensión de la clasificación serológica de una población en general, y poder evaluar las respuestas de los isotipos IgG como marcadores de la inmunidad humoral, conjuntamente comprender su papel en la protección frente a otros antígenos que podrían ser candidatos a vacunas.

## CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Realizar estudios seroepidemiológicos en las demás regiones del Perú aplicando el método de unidades arbitrarias y ampliando el número de participantes que permitan determinar la infección por *Toxoplasmas gondii*.
- Aplicar este tipo de estudios en una población no inmunocomprometida para determinar el estado serológico y entender el flujo continuo de los títulos de anticuerpos, además de comparar datos.
- Realizar estudios de avidez para comparar títulos de anticuerpos entre poblaciones expuestas y no expuestas a *Toxoplasma gondii*.

## CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Steinberg HE, Bowman NM, Diestra A, Ferradas C, Russo P, Clark DE, et al. Detection of toxoplasmic encephalitis in HIV positive patients in urine with hydrogel nanoparticles. *PLoS Negl Trop Dis.* marzo de 2021;15(3):e0009199.
2. Mohammadi K, Khalili H, Jafari S, Yaribash S. Treatment of toxoplasmic encephalitis with the combination of clindamycin plus azithromycin in an HIV-infected patient: A case report. *Clin Case Rep.* 24 de marzo de 2021;9(5):e04045.
3. Medina JD, Osorio LA, Zabala D, de Almeida Vitor RW, Gómez JE, Carranza JC, et al. Detección molecular de *Toxoplasma gondii* en carnes para consumo humano en Ibagué, Colombia. *Bioméd Bogotá.* 2022;136-46.
4. Maisarah A, Mohamad S, Husain M, Abdullah S, Noordin R. Association between infection with *Toxoplasma gondii* and psychiatric disorders. *Folia Parasitol (Praha)* [Internet]. 4 de abril de 2022 [citado 26 de abril de 2023];69. Disponible en: <http://folia.paru.cas.cz/doi/10.14411/fp.2022.008.html>
5. Joseph P, Calderón MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and Evaluation of a PCR Assay for Detecting Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS. *J Clin Microbiol.* diciembre de 2002;40(12):4499-503.

6. Xiao J, Bhondoekhan F, Seaberg EC, Yang O, Stosor V, Margolick JB, et al. Serological Responses to *Toxoplasma gondii* and Matrix Antigen 1 Predict the Risk of Subsequent Toxoplasmic Encephalitis in People Living With Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 3 de enero de 2021;73(7):e2270-7.
7. Arbune AA, Arbune M, Stefanescu V. Parkinsonian Syndrome and Toxoplasmic Encephalitis. *J Crit Care Med.* 9 de mayo de 2016;2(2):89-92.
8. Sepúlveda N, Stresman G, White MT, Drakeley CJ. Current Mathematical Models for Analyzing Anti-Malarial Antibody Data with an Eye to Malaria Elimination and Eradication. *J Immunol Res.* 6 de diciembre de 2015;2015:e738030.
9. Aly NSM, Kim HS, Marei YM, Elhamshary AS, Bayoumi IR, Omar RE, et al. Diagnosis of Toxoplasmosis Using Surface Antigen Grade 1 Detection by ELISA, Nano-Gold ELISA, and PCR in Pregnant Women. *Int J Nanomedicine.* 21 de marzo de 2023;18:1335-45.
10. Lévêque MF, Albaba S, Arrada N, Avignon M, Sasso M, Fillaux J, et al. Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: No Benefit of IgA Antibody Detection by Platelia ELISA in a Tricentric Evaluation. *J Clin Microbiol.* 60(5):e00116-22.
11. Mardani-Kataki M, Beiromvand M, Teimoori A, Amari A, Tavalla M. Is Immuno-PCR Better than ELISA Test for Detection of *Toxoplasma gondii* IgG Antibody? *Acta Parasitol.* 2022;67(2):904-11.

12. Khodadadi A, Madani R, Hoghooghi Rad N, Atyabi N. Development of Nano-ELISA Method for Serological Diagnosis of Toxoplasmosis in Mice. Arch Razi Inst. 1 de diciembre de 2020;75(4):419-26.
13. Iddawela D, Ehambaram K, Kumarasiri PV, Wijesundera S. Development and validation of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) test for the diagnosis of toxoplasmosis in Sri Lanka. Ceylon Med J. septiembre de 2015;60(3):82-6.
14. Hegazy S, Farid A, Rabae I, El-Amir A. Novel IMB-ELISA Assay for Rapid Diagnosis of Human Toxoplasmosis Using SAG1 Antigen. Jpn J Infect Dis. 2015;68(6):474-80.
15. Araújo PRB, Ferreira AW. High diagnostic efficiency of IgM-ELISA with the use of multiple antigen peptides (MAP1) from *T. gondii* ESA (SAG-1, GRA-1 and GRA-7), in acute toxoplasmosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2010;52(2):63-8.
16. Miura K, Orcutt AC, Muratova OV, Miller LH, Saul A, Long CA. Development and Characterization of a Standardized ELISA Including a Reference Serum on Each Plate to Detect Antibodies Induced by Experimental Malaria Vaccines. Vaccine. 10 de enero de 2008;26(2):193-200.
17. Saavedra-Langer R, Marapara J, Valle-Campos A, Durand S, Vásquez-Chasnamote ME, Silva H, et al. IgG subclass responses to excreted-secreted antigens of *Plasmodium falciparum* in a low-transmission malaria

- area of the Peruvian Amazon. *Malar J.* 11 de septiembre de 2018;17(1):328.
18. Grandía G. R, Entrena G. Á, Cruz H. J. Toxoplasmosis en *Felis catus*: etiología, epidemiología y Enfermedad. *Rev Investig Vet Perú.* abril de 2013;24(2):131-49.
  19. Dutta A, Mehta PR, Ingole N. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in newly diagnosed HIV seropositive patients. *Indian J Med Res.* noviembre de 2020;152(5):515-8.
  20. Vidal JE. HIV-Related Cerebral Toxoplasmosis Revisited: Current Concepts and Controversies of an Old Disease. *J Int Assoc Provid AIDS Care.* 20 de agosto de 2019;18:2325958219867315.
  21. Crabtree-Ramírez B, Caro-Vega Y, Shepherd BE, Grinsztejn B, Wolff M, Cortes CP, et al. Time to HAART Initiation after Diagnosis and Treatment of Opportunistic Infections in Patients with AIDS in Latin America. *PLoS ONE.* 7 de junio de 2016;11(6):e0153921.
  22. Şenoğlu S, Yeşilbağ Z, Altuntaş Aydın Ö, Kumbasar Karaosmanoğlu H, Kart Yaşar K. *Toxoplasma gondii* IgG Seroprevalence in Patients with HIV/AIDS. *Turk Parazitolojii Derg.* septiembre de 2018;42(3):175-9.
  23. Blader I, Coleman B, Chen CT, Gubbels MJ. The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later. *Annu Rev Microbiol.* 15 de octubre de 2015;69:463-85.

24. Attias M, Teixeira DE, Benchimol M, Vommaro RC, Crepaldi PH, De Souza W. The life-cycle of *Toxoplasma gondii* reviewed using animations. *Parasit Vectors*. 23 de noviembre de 2020;13(1):588.
25. Abbas AK, Andrew H. Lichtman, Pillai S. *Inmunología Celular y Molecular*. Décima edición. España: DRK Edición; 2022. 552 p.
26. Levinson W. *Microbiología e Inmunología médicas*. Octava edición. Bocángel, Madrid: Fernández Ciudad, S. L.; 674 p.
27. Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunología de Janeway*. Séptima edición. México: Javier de León Fraga; 2009. 913 p.
28. Botero D, Restrepo M. *Parasitosis Humanas*. Quinta edición. Medellín, Colombia: Lina María Gonzáles Duque; 2012. 733 p.
29. Diao Y, Yao Y, El-Ashram S, Bian M. Egress Regulatory Factors: How *Toxoplasma* Exits from Infected Cells? *Pathogens*. 4 de mayo de 2023;12(5):679.
30. Atias A. *Parasitología Médica*. Primera edición. Santiago, Chile; 473 p.
31. Mendez OA, Koshy AA. *Toxoplasma gondii*: Entry, association, and physiological influence on the central nervous system. *PLoS Pathog*. 20 de julio de 2017;13(7):e1006351.
32. Diccionario de cáncer del NCI - NCI [Internet]. 2011 [citado 19 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer>

33. Ortiz-Martínez S, Ramos-Rincón JM, Vásquez-Chasnamote ME, Gamboa-Paredes ON, Arista-Flores KM, Espinoza-Venegas LA, et al. Prevalence of strongyloidiasis in Peru: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 4 de agosto de 2021;21(1):755.
34. Gutierrez-Loli R, Ferradas C, Diestra A, Traianou A, Bowman N, Bok J, et al. Development of a Novel Protocol Based on Blood Clot to Improve the Sensitivity of qPCR Detection of *Toxoplasma gondii* in Peripheral Blood Specimens. *Am J Trop Med Hyg.* enero de 2019;100(1):83-9.
35. Miura K, Orcutt AC, Muratova OV, Miller LH, Saul A, Long CA. Development and characterization of a standardized ELISA including a reference serum on each plate to detect antibodies induced by experimental malaria vaccines. *Vaccine.* 10 de enero de 2008;26(2):193-200.
36. Abarca K, Vial PA, Zamorano J, Paris C, Ferrés M, Villarroel L, et al. [Seroprevalence of cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* in healthy subjects under 30 years old in Santiago, Chile]. *Rev Med Chil.* mayo de 1997;125(5):531-8.
37. Alzaheb RA. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and its associated risk factors among women of reproductive age in Saudi Arabia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Womens Health.* 2018;10:537-44.
38. Seroprevalencia de toxoplasmosis en donantes de sangre de la Clínica Cardiovascular Santa María, Medellín, Colombia, 2009-2010 [Internet]. [citado 22 de abril de 2023]. Disponible en:

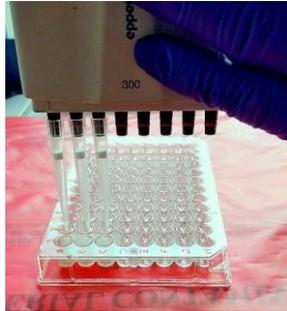
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-93922011000100003](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-93922011000100003)

39. Zúñiga-Contreras M, Noemi-Hauck I, Valenzuela-Cortés R, Barraza-Olivares M, Santolaya-de-Pablo ME. [Toxoplasma gondii IgG seroprevalence in children with cancer from National Children's Antineoplastic Drug Program network in the Metropolitan Region, Chile: a multicenter study]. Rev Chil Infectologia Organo Of Soc Chil Infectologia. abril de 2021;38(2):212-7.
40. Díaz ALM, Dimaté LLR, Bernal CPJ, Paredes PAC. Evaluación de la seroprevalencia de toxoplasma gondii en poblaciones de riesgo: una revisión narrativa. Rev Salud Bosque. 19 de julio de 2021;11(1):1-13.
41. Getting started with plater [Internet]. Getting started with plater. [citado 22 de abril de 2023]. Disponible en: <https://docs.ropensci.org/plater/articles/plater-basics.html>
42. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D. Dose-Response Analysis Using R. PLOS ONE. 30 de diciembre de 2015;10(12):e0146021.
43. Figueiredo CA, Düsedau HP, Steffen J, Ehrentraut S, Dunay MP, Toth G, et al. The neuropeptide PACAP alleviates T. gondii infection-induced neuroinflammation and neuronal impairment. J Neuroinflammation. 19 de noviembre de 2022;19:274.
44. Telles JPM, Vidal JE. Cerebral toxoplasmosis with neurological co-infection in people living with AIDS/HIV: results of a prospective cohort in São Paulo, Brazil. Arq Neuropsiquiatr. 14 de marzo de 2023;81(1):33-9.

## ANEXOS

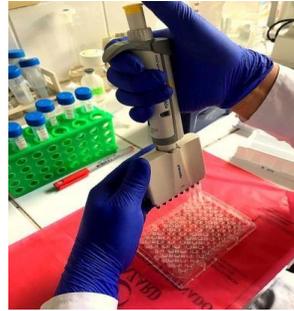
### Anexo 1 - Flujo de trabajo del ensayo de ELISA indirecto

Sensibilización de la Placa



Incubación por 16 h a 4°C

Bloqueo de la Placa



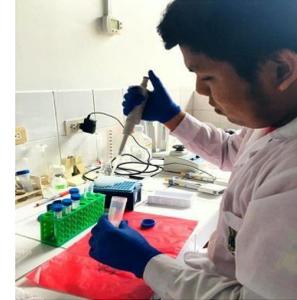
Previa serie de lavados

Incubación en movimiento

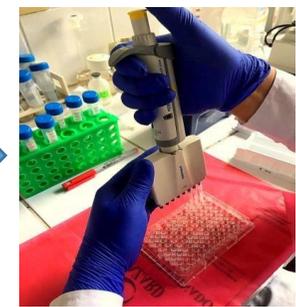


60 RPM por 2 h

Dilución de sueros



Incorporación de sueros



Incorporación del sustrato



Previa serie de lavados

Incubación en movimiento



60 RPM por 1 h

Incorporación del conjugado



Previa serie de lavados

Dilución de conjugado



Incubación en movimiento



60 RPM por 1 h

Reacción colorimétrica



Incorporación del reactivo stop



Lectura a 450nm



## Anexo 2 - Guía de trabajo para la estimación de las unidades arbitrarias de anticuerpos

- sobre el template:
  - pestaña 1
    - información de las condiciones del experimento (de la plantilla original)

10-abr-19																			
<b>Objetivo</b>	Determinar anticuerpos IgG contra MSP1-19 kDa para Plasmodium vivax y P. falciparum																		
<b>Condiciones:</b>																			
	1) [Ag]= 1 ug/ml PFMSP1- 19																		
	2) Serum: muestras de pacientes portadores del VIH																		
	3) Dilution standar sample (Pool) = 1/50, 1/100, 1/200/ 1/400....																		
	4) Dilution of samples and controls (+/-) = C+/-, 1/200 (50ul) (AB Wash solution/ Skim Milk 1.5 %)																		
	5) Ab sec = IgG Jackson Dilution 1/6000 (50 ul)																		
	6) Buffer sustrate: (TMB 60 min)(50 ul)																		
	7) Solution Stop HCL 0.25M (25 ul)																		
	8) Lecture OD: 450																		
	9) Operator: KA																		

- pestaña 2
  - las etiquetas de muestras y números de densidad óptica (ejemplo)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	Drug	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
2	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
3	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
4	C	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
5	D	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
6	E	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
7	F	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
8	G	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
9	H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	
10														
11	Killing	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
12	A	98	95	92	41	17	2	1.5	1.8	1	0.5	0.5	0.3	
13	B	15	8	3	1.2	1.1	0.8	1.2	0.4	0.6	0.1	0.2	0.4	
14	C	72	21	7	1.1	0.8	1.3	0.2	1.8	1	0.2	0.4	0.2	
15	D	0.4	0.2	0.1	0.5	0.3	0.2	0.1	0.1	0.5	0.5	0.3	0.4	
16	E	37	7	2	0.3	0.2	0.4	0.6	0.1	1	0.2	0.4	0.2	
17	F	99	99	99	99	99	61	5	2.2	1.3	0.2	0.3	0.2	
18	G	99	33	4	0.5	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.4	0.2	
19	H	98	99	99	97	98	99	98	97	65	22	8	0.5	
20														

- Motivo:
  - en el análisis usaremos el paquete en R llamado “plater” que permite manejar los datos de una forma más rápida

- Los desafíos estadísticos:

- múltiples placas
- definir seropositivos

múltiples placas	<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>problema</b><ul style="list-style-type: none"><li>- variabilidad de condiciones experimentales entre placa</li></ul></li><li>- <b>fuentes:</b><ul style="list-style-type: none"><li>- día</li><li>- reactivos</li><li>- pipeteo</li></ul></li><li>- <b>solución:</b></li><li>- <b>curva estándar</b></li><li>- <b>procedimiento:</b><ul style="list-style-type: none"><li>- agregar una dilución seriada de un <u>mismo</u> pool positivo en cada placa</li><li>- estandarizar las mediciones de todas las placas con respecto a la curva estándar, usando una escala <u>arbitraria</u> de unidades de anticuerpos.</li></ul></li><li>- <b>características:</b><ul style="list-style-type: none"><li>- dejamos de utilizar la lectura inicial cruda de densidad óptica (OD)</li><li>- utilizamos la lectura estandarizada (arbitraria)</li></ul></li></ul>
------------------	---

de unidades de anticuerpos (AU)

- la lectura estandarizada es útil para:
  - asegurar la comparabilidad las muestras de un solo estudio y
  - definir la población seronegativa y seropositiva, independiente a la variabilidad entre placas
- la lectura estandarizada no es comparable entre estudios

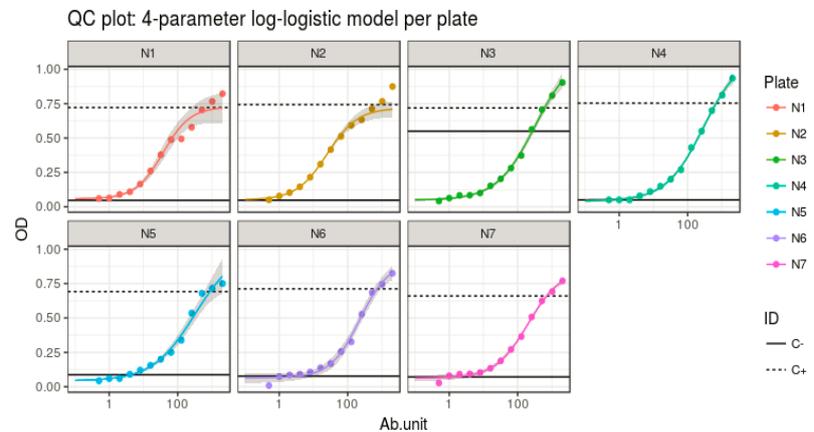
figura 1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>A</b>	STD 1/50	STD 1/100	STD 1/200	STD 1/400	STD 1/800	STD 1/1600	STD 1/3200	STD 1/6400	STD 1/12800	STD 1/25600
<b>B</b>	NN147-4	NN119-2	NN149-1	NN149-5	NN201-4	NN148-5	NN148-7	NN148-8	NN123-2	NN125-2
<b>C</b>	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17
<b>D</b>	NN149-2	NN115-2	NN135-5	NN137-2	NN111-1	NN152-1	NN152-2	NN132-3	NN152-4	NN153-1
<b>E</b>	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17
<b>F</b>	NN155-4	NN155-5	NN155-6	NN127-6	NN127-7	NN127-8	NN132-2	NN127-1	NN131-1	NN129-2
<b>G</b>	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	1-Jun-17	1-Jun-17	1-Jun-17	1-Jun-17
<b>H</b>	NN129-1	1-Jun-17	NN156-3	1-Jun-17	NN156-2	1-Jun-17	NN112-1	1-Jun-17	Blank	C+

figura 2

Dilution	Reciprocal of Dilution	Factor	ELISA Ab units
STD 1/50	50	102400/50	2048
STD 1/100	100	102400/100	1024
STD 1/200	200	102400/200	512
STD 1/400	400	102400/400	256
STD 1/800	800	102400/800	128
STD 1/1600	1600	102400/1600	64
STD 1/3200	3200	102400/3200	32
STD 1/6400	6400	102400/6400	16
STD 1/12800	12800	102400/12800	8
STD 1/25600	25600	102400/25600	4
STD 1/51200	51200	102400/51200	2
STD 1/102400	102400	102400/102400	1

figura 3



definir  
seropositividad

- **resultado**
  - positivo o negativo mediante un punto de corte
- **método 1**
- procedimiento
- definir la población seronegativa de una muestra aparte de las de interés a analizar, es decir, una **población de individuos no expuestos**.
- definir positivo si exceden la media + 3sd de la población seronegativa
- la medida usual es OD (en escala logarítmica)
- en caso se tenga a la población de individuos no expuestos, también se puede aplicar con AU
- **método 2**
- procedimiento
- definir el punto de corte únicamente a partir de los

	<p>datos bajo análisis</p> <ul style="list-style-type: none"><li>- asumimos que:</li><li>- la muestra está compuesta por una mixtura de distribuciones normales o gaussianas (una negativa y una positiva)</li><li>- se aplica un método estadístico de clasificación de “mixtura de distribuciones gaussianas” para determinar la media y SD de dos poblaciones (negativa y positiva) o más.</li><li>- definimos un punto de corte en base a la probabilidad de clasificación mayor al 95%</li><li>- el resultado final se da en<ul style="list-style-type: none"><li>- s- negativos,</li><li>- s0 indeterminados,</li><li>- s+ positivos</li></ul></li><li>- <b>ventajas:</b><ul style="list-style-type: none"><li>- no requiere de la población de individuos no expuestos</li><li>- si el muestreo es transversal y la probabilidad de coleccionar positivos ha sido muy similar a la de coleccionar negativos</li></ul></li></ul>
--	--

figura 4

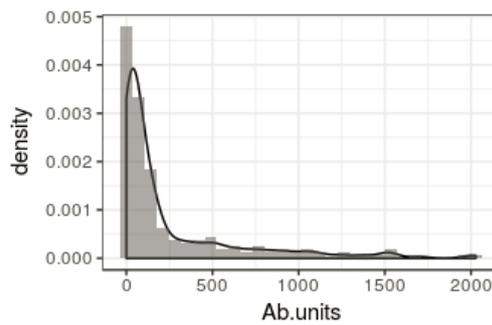
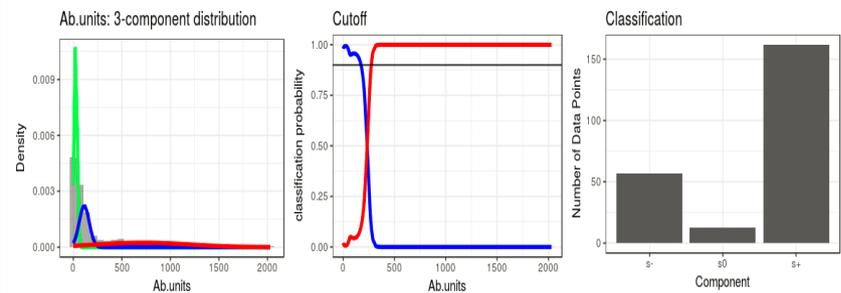


fig 5



- Las actividades a ejecutar implican:

1. Leer en R todas las placas de ELISA (n=8)

- a. coordinar un template/plantilla de ingreso de datos
- b. nombrar a cada archivo con el código de placa, p.e.:
  - i. template-toxo\_ig-p001
  - ii. template-toxo\_ig-p002
  - iii. template-toxo\_ig-p003
  - iv. template-toxo\_ig-p00#
- c. transformar todas las placas de formato xlsx a csv
- d. leer múltiples placas con paquete plater

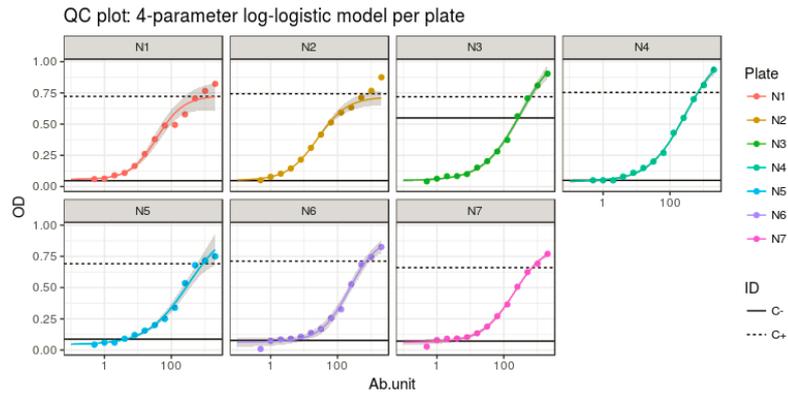
- e. construir una sola base de datos con información de todas las placas
2. Estandarizar las lecturas de las placas de ELISA, es decir, convertir densidades ópticas (OD) a unidades de arbitrarias de anticuerpos (UA):
- a. Cada placa tendrá una **dilución seriada** en la fila A (a parte de las muestras problema por duplicado, blanco por duplicado, un control positivo y un control negativo)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	STD 1/50	STD 1/100	STD 1/200	STD 1/400	STD 1/800	STD 1/1600	STD 1/3200	STD 1/6400	STD 1/12800	STD 1/25600	STD 1/51200	STD 1/102400
<b>B</b>	NN147-4	NN119-2	NN149-1	NN149-5	NN201-4	NN148-5	NN148-7	NN148-8	NN123-2	NN125-2	NN119-1	NN113-3
<b>C</b>	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17
<b>D</b>	NN149-2	NN115-2	NN135-5	NN137-2	NN111-1	NN152-1	NN152-2	NN132-3	NN152-4	NN153-1	NN153-2	NN153-3
<b>E</b>	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17
<b>F</b>	NN155-4	NN155-5	NN155-6	NN127-6	NN127-7	NN127-8	NN132-2	NN127-1	NN131-1	NN129-2	NN151-8	LL037-1
<b>G</b>	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	31-May-17	1-Jun-17	1-Jun-17	1-Jun-17	1-Jun-17	1-Jun-17	1-Jun-17
<b>H</b>	NN129-1	1-Jun-17	NN156-3	1-Jun-17	NN156-2	1-Jun-17	NN112-1	1-Jun-17	Blank	C+	C-	Blank

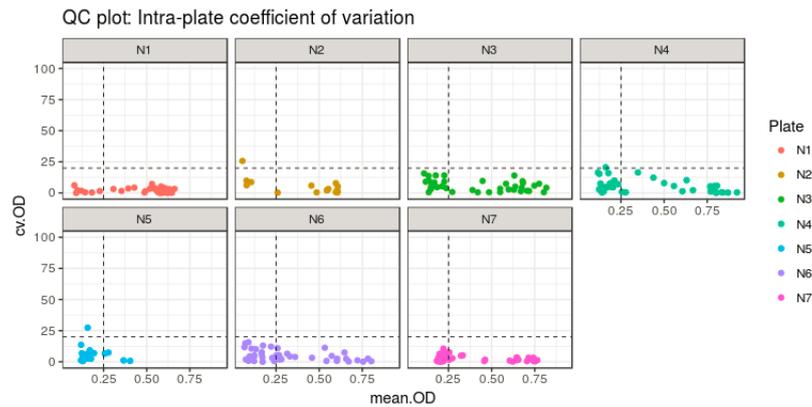
- b. A cada dilución seriada le corresponde una **unidad arbitraria de anticuerpos (UA;** en la imagen: ELISA Ab units). Ver en la tabla la correspondencia:

Dilution	Reciprocal of Dilution	Factor	ELISA Ab units
STD 1/50	50	102400/50	2048
STD 1/100	100	102400/100	1024
STD 1/200	200	102400/200	512
STD 1/400	400	102400/400	256
STD 1/800	800	102400/800	128
STD 1/1600	1600	102400/1600	64
STD 1/3200	3200	102400/3200	32
STD 1/6400	6400	102400/6400	16
STD 1/12800	12800	102400/12800	8
STD 1/25600	25600	102400/25600	4
STD 1/51200	51200	102400/51200	2
STD 1/102400	102400	102400/102400	1

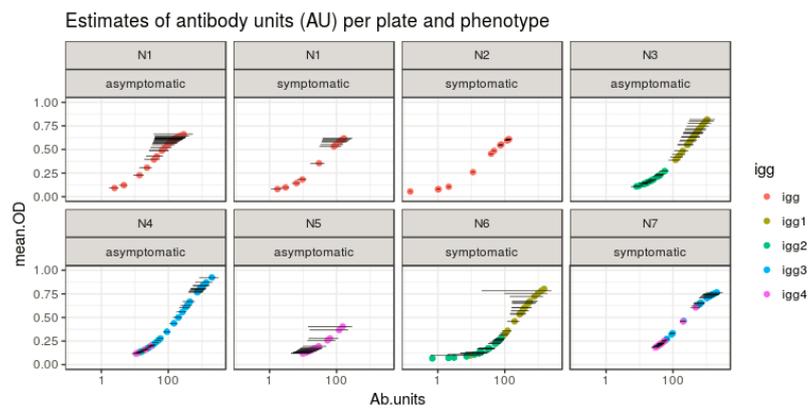
- c. En cada placa, crear una **curva estándar** usando las densidades ópticas (OD) y las unidades arbitrarias de anticuerpos (UA) de su dilución seriada, usando un **modelo log-logístico** de cuatro parámetros con el paquete drc.



d. Generar figuras de **control de calidad de réplicas** con el **coeficiente de variación intraplaca**;

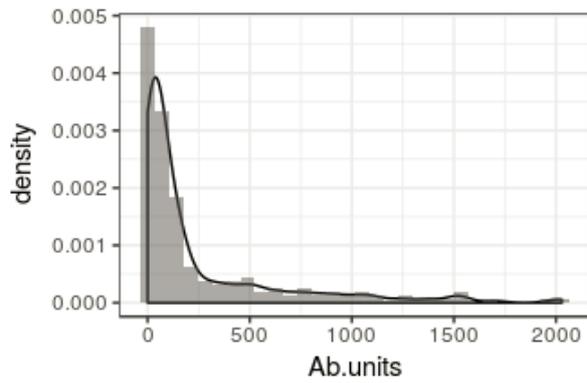


e. En cada placa, usar la curva estándar para **estimar los valores de UA** para cada muestra problema (valor puntual e intervalos de confianza)

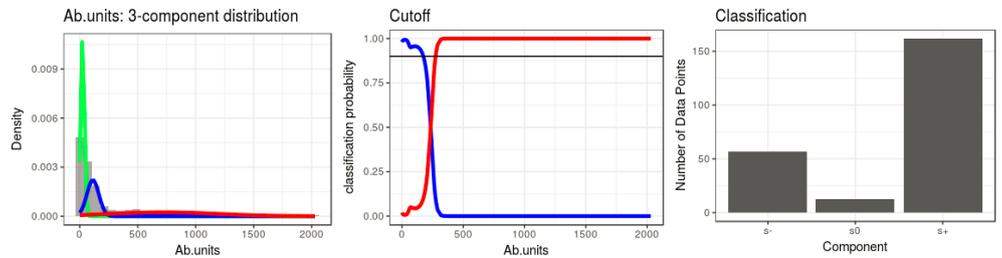


3. Clasificar como **positivos y negativos** a los resultados de UA;

a. A partir de la distribución de UA,



b. Clasificar usando curvas de distribución normal, usando el método de clasificación por **modelos de mixtura de distribuciones gaussianas**.



c. Ejecutar **control de calidad de clasificación** con controles positivos y negativos y compararlos con

- i. el punto de corte de clasificación generado en el paso anterior.
- ii. el punto de corte usando OD (tradicional)

## Anexo 3 - Consentimiento Informado

IRB Office Use Only IRB Approval Date: IRB Consent Version 1.0

UNIVERSIDAD JOHNS HOPKINS  
HOSPITAL NACIONAL DOS DE MAYO, LIMA, PERU  
HOSPITAL NACIONAL CAYETANO HEREDIA, LIMA, PERU  
HOSPITAL REGIONAL DE LORETO, IQUITOS, PERU  
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS, SANTA CRUZ, BOLIVIA

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PACIENTES ADULTOS HOSPITALIZADOS

Investigador principal: Dr. Robert Gilman

Título del estudio: "Diagnóstico novedoso de nanopartículas para Toxoplasmosis y Chagas cerebral en pacientes con VIH que viven en América Latina"

No IRB.: 00009528

Patrocinador/Soporte/Financiado por: Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (National Institutes of Health)

Versión y fecha: Versión 1.1/ 10 de diciembre del 2019

#### Información clave sobre el estudio

Usted está siendo invitado a participar en un estudio de investigación. Usted puede negarse a participar o puede retirar su consentimiento por cualquier motivo, sin ninguna penalidad. Si usted decide no participar en el estudio o retirarse del estudio en cualquier momento no afectará su cuidado y atención en el hospital.

El propósito de este proyecto de investigación es estudiar a las personas infectadas con VIH con y sin problemas en sus cerebros, médula espinal, o nervios (sistema nervioso). Este estudio espera mejorar el diagnóstico de problemas neurológicos en personas infectadas con VIH. Esperamos desarrollar nuevas pruebas utilizando orina y saliva para ayudar a los doctores a identificar infecciones de una manera más fácil.

Usted está siendo invitado a participar en este estudio porque es un adulto que vive con VIH. Su participación podría ayudar a pacientes futuros con condiciones similares a la suya.

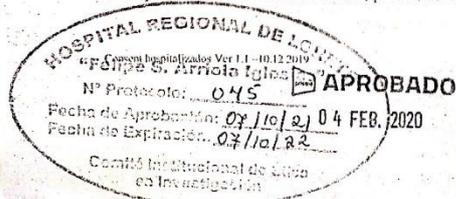
Si es que acepta participar en este estudio, usted:

- Permitirá que revisemos su historial médico durante el estudio.
- Completará una visita inicial del estudio que incluirá un examen físico y durará dos horas.
- Donará sangre, orina, saliva y cualquier otra muestra de fluidos corporales colectada por su doctor que sobre luego de que se han realizado todas las pruebas diagnósticas en el hospital, para realizar una serie de pruebas para diferentes infecciones.
- Aceptará que le hagan una tomografía computarizada (TC) y probablemente una radiografía de tórax y un electrocardiograma de su corazón, si es que estas pruebas son necesarias para su cuidado clínico.
- Completará dos visitas de seguimiento. Las primeras 3 semanas después de la primera visita, y la segunda 6 meses después. Cada una de estas visitas durará aproximadamente una hora.
- Considerará el uso de sus especímenes en investigaciones futuras.

Algunos resultados de las pruebas no le serán devueltos porque aún no están aprobados.

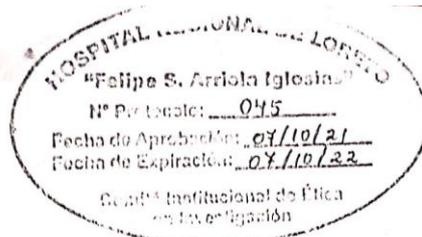
Algunas pruebas, como la TC de cabeza, serán realizadas y pagadas por el estudio.

Si es que usted continúa interesado, por favor continúe leyendo.



prisma PRESIDENTE  
Comité Institucional de  
Ética en Investigación

Page 1 of 10



IRB Office Use Only	IRB Approval Date IRB Consent Version No.
------------------------	--

#### Detalles del estudio

Los detalles de este estudio figuran líneas abajo. Es importante que usted entienda esta información para poder tomar una decisión informada sobre su participación en este estudio de investigación.

Le daremos una copia de este formato de consentimiento. Usted debe preguntar a los investigadores mencionados anteriormente, o a los miembros del equipo de investigación, cualquier pregunta que tenga sobre este estudio en cualquier momento.

#### ¿Por qué se está realizando este estudio?

La infección por el VIH daña su cuerpo porque ataca una parte de su sistema inmune llamado células CD4. Tener menos de estas células CD4 lo hace más propenso a contraer ciertos tipos de infecciones. También puede hacer que ciertas infecciones sean más graves de lo que son para personas que tienen la infección por el VIH. Algunas de estas infecciones pueden infectar su cerebro.

La enfermedad de Chagas es causada por un organismo llamado *Trypanosoma cruzi*. La mayoría de las personas contraen esta enfermedad después de haber sido picadas por un insecto ("vinchuca", "chínche", o "chirimacha") que lleva la infección. La enfermedad de Chagas podría causar problemas en muchas partes de su cuerpo, pero los problemas más graves involucran a su corazón y a su cerebro. Las personas están infectadas con VIH y Chagas, podrían presentar una enfermedad de Chagas más grave que aquellas personas que no están infectadas con VIH. *Toxoplasma gondii*, otro "bicho" o parásito, que puede causar problemas neurológicos en personas que están infectadas por el VIH.

Asimismo, la tuberculosis, además de afectar los pulmones, puede afectar el sistema nervioso en individuos infectados con VIH. Estas y muchas otras condiciones presentan síntomas similares, por lo que es difícil para su equipo médico encontrar las mejores maneras de diagnosticarlas y tratarlas. Nosotros esperamos desarrollar mejores pruebas para identificar estas infecciones de las que utilizamos actualmente.

#### ¿Quién puede participar en este estudio?

Las personas con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) pueden participar.

Nosotros estamos invitando a que se unan al estudio a personas positivas a VIH con una posible infección neurológica y sin una infección neurológica.

#### ¿Qué sucederá si usted decide participar en el estudio?

Si acepta participar en este estudio, le pediremos que haga lo siguiente: Revisaremos sus historia clínica para determinar si tiene problemas relacionados a su infección con el VIH y/u otras infecciones. También podemos encontrar que ciertas pruebas ya se han hecho, y no habrá necesidad de repetirlos.

Los procedimientos son los siguientes:

#### Visita inicial

1. Un miembro del equipo del estudio le realizará varias preguntas sobre su condición, sus síntomas, sus enfermedades previas y su tratamiento, su vivienda anterior y algunos de sus hábitos.
2. Podríamos hacerle un pequeño pinchazo en la yema del dedo para detectar la enfermedad de Chagas con solo una gota de sangre.

Consent hospitalizados Ver 1.1 -10 12 2019



PRESIDENTE  
Comité Institucional de  
Ética en Investigación

Page 2 of 10

3. Tomaremos una muestra de sangre alrededor de 3 a 5 cucharaditas. Nosotros determinaremos si usted tiene la enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, sífilis, u otras infecciones. Otras pruebas de sangre nos darán más información acerca de cómo la infección con el VIII u otras infecciones están afectando su cuerpo. El tipo de pruebas variarán en función de su condición médica. Esta muestra se recogerá mediante la introducción de una aguja en su vena. La muestra será tomada por una persona con experiencia. Utilizaremos una aguja nueva y estéril para cada persona. Cualquier prueba que no esté relacionada con su tratamiento médico no será pagada por este estudio.
4. Le pediremos muestras de saliva y orina para intentar desarrollar nuevas pruebas para ciertas infecciones. En el futuro, estas pruebas podrían permitir a los médicos evitar tomar sangre para las pruebas diagnósticas. Le daremos un recipiente para recolectar la orina y una esponja especial para colectar la saliva. Adicionalmente, pediremos cualquier otro fluido biológico que su doctor colecte, pero no necesite.
5. Si a usted no se le ha tomado una radiografía de tórax en el último mes, probablemente le pediremos permiso para hacerle una para ver si su corazón ha aumentado de tamaño (cardiomegalia). Este procedimiento tomará aproximadamente 10 minutos. Si usted es una mujer menor de 45 años, le pediremos una prueba de embarazo antes de tomarle la radiografía de tórax. Si está embarazada, no le tomaremos la radiografía de tórax.
6. El médico del estudio le realizará un examen integral prestando especial atención al corazón, el sistema nervioso y el cerebro. El examen incluirá algunas pruebas para medir su memoria, atención y su capacidad lingüística.
7. Probablemente solicitaremos tomar un electrocardiograma si su diagnóstico presuntivo clínico es positivo a chagas o su prueba rápida a chagas es positiva. Si el paciente se le ha realizado un electrocardiograma durante su hospitalización inicial, no tiene que repetir la prueba. Solo será necesario repetir la prueba 6 meses después donde le haremos un electrocardiograma (EKG) para ver cómo está funcionando la parte eléctrica de su corazón. Para esta prueba le colocaremos parches adhesivos en los brazos, las piernas y el pecho, que estarán unidos con pequeños cables a una máquina. Este proceso no es doloroso y tomará solo 5 minutos. Los resultados estarán disponibles inmediatamente después de terminar la prueba, pero también serán enviados a un especialista para su análisis.
8. Probablemente le haremos una tomografía computarizada si es que no le han tomado una previamente para evaluar su condición médica. Para realizar esta prueba se le pedirá que permanezca quieto mientras que una máquina toma una imagen de su cabeza.

**Pruebas de seguimiento**

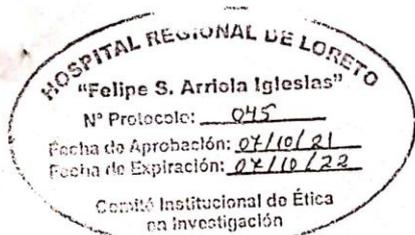
1. Podríamos pedirle que regrese en 3 semanas y 6 meses a dos visitas adicionales como un paciente externo para que podamos ver cómo se está sintiendo y si sus problemas neurológicos se encuentran mejor o peor. En estas visitas revisaremos su expediente médico para ver si los doctores han identificado nuevos problemas desde que nos vimos por última vez, haremos algunas preguntas y le realizaremos un examen físico.
2. También le pediremos muestras de sangre, saliva y orina. Las pruebas de sangre podrían variar en función a su condición médica, pero no le tomaremos más de 5 cucharaditas de muestra. Adicionalmente, pediremos cualquier residuo de los otros fluidos biológicos que su doctor colecte, pero no necesite.



APROBADO  
04 FEB. 2020



PR  
PRESIDENTE  
Comite Institucional de  
Ética en Investigación



IRB Office Use Only	IRB Approval Date: IRB Consent Version No.:
------------------------	--

3. Podríamos realizarle otro EKG y otra tomografía computarizada, dependiendo de su condición médica. Para la tomografía computarizada, se le pedirá que permanezca quieto mientras que una máquina toma una imagen de su cabeza.

El propósito de estas pruebas y del examen físico es determinar cómo la enfermedad está afectando su cuerpo y ver si podemos determinar qué causó sus problemas neurológicos.

Cualquier resultado que podría ser útil para su atención médica será compartido con su médico tan pronto como esté disponible. Si desea sus resultados, puede solicitarlos en cualquier momento.

**¿Los resultados de las pruebas serán compartidos con usted?**

Este estudio incluye algunas pruebas de investigación que pueden producir información clínica que podría serle útil. Compartiremos esta información con usted si es que la solicita. Si tiene una prueba de flujo lateral de *Cryptococcus*, los resultados se compartirán con su médico.

**¿Cuánto tiempo estará en el estudio?**

Usted participará en este estudio por 6 meses. La visita inicial durará aproximadamente 2 horas. Se harán dos visitas de seguimiento, 3 semanas y 6 meses luego de la visita inicial, que durarán aproximadamente 1 hora. Almacenaremos sus muestras por 5 años.

**¿Cuáles son los riesgos o molestias del estudio?**

**Extracción de sangre**

La extracción de sangre puede causar molestias, sangrado o moretones donde la aguja entra al cuerpo. En casos raros, puede causar desmayos. Hay un pequeño riesgo de infección. Estos son los mismos riesgos que se asocian cada vez que tenga una prueba de sangre. Las personas que tomarán la muestra de sangre serán capacitadas. Ellos limpiarán su piel antes de tomar la muestra de sangre y usarán una aguja estéril nueva para cada paciente.

**Estudios por imágenes**

Este estudio de investigación incluye la exposición a radiación por rayos x o rayos gamma. Esta exposición a la radiación es solo para fines de investigación y no forma parte de su atención médica. Los rayos X y los rayos gamma de fuentes naturales o médicas pueden dañar el material genético (ADN) en sus células. A dosis bajas, el cuerpo generalmente puede reparar el daño.

La exposición a la radiación que obtendrá en este estudio de investigación es de 0,52 rem (un rem es una unidad de radiación absorbida). Esto es más que el 0,3 rem que la persona promedio obtiene cada año de fuentes naturales como el sol, el espacio exterior, el aire, los alimentos y el suelo. Es inferior a los 5 rems de radiación permitidos cada año para las personas que están expuestas a la radiación en sus trabajos.

La exposición a la radiación descrita aquí es lo que obtendrá de este estudio de investigación solamente. No incluye ninguna exposición que pueda haber recibido o que reciba de otras pruebas fuera de este estudio que son parte de su atención médica. El riesgo de radiación se acumula con cada exposición. Debe considerar su propio historial de exposición a la radiación por pruebas (como radiografías o tomografías

computarizadas) al decidir sobre la radiación en este estudio. Si tiene preguntas sobre la cantidad total de radiación que recibirá, debe consultar a su médico.

**Entrevistas o cuestionarios**

Las preguntas del estudio están diseñadas para no ser ofensivas o discriminatorias. Sin embargo, si siente que una pregunta le incomoda, podría no responderla sin afectar su participación en el estudio.

Usted puede sentirse cansado o aburrido cuando estamos haciéndole las preguntas o completando los cuestionarios. Usted no tiene que contestar ninguna pregunta que no desee contestar y puede pedir tomar un descanso en cualquier momento.

**Privacidad personal**

Hay un pequeño riesgo de violación de la confidencialidad, lo que significa que otras personas podrían conocer su historia médica o características personales. Haremos todo lo posible para evitar que las personas que no estén involucradas en el estudio o en la atención médica obtengan esta información. Las pruebas y entrevistas se llevarán a cabo con la mayor privacidad posible. Sólo sus médicos y el personal del estudio tendrán acceso a los resultados de las pruebas. No compartiremos ninguna información acerca de usted con nadie sin su permiso. Los datos sobre usted serán almacenados con un código, no con su nombre. Por favor, consulte la sección "¿Cómo se protegerá la confidencialidad de su información?" para saber más sobre cómo protegeremos la confidencialidad de esta información.

**¿Cómo se protegerá la confidencialidad de su información?**

Toda la información registrada en papel en este estudio será almacenada en un lugar seguro bajo llave, a donde sólo tendrá acceso el personal del estudio. Los registros electrónicos se almacenarán de manera anónima utilizando un código de estudio en lugar de su nombre. Estos registros electrónicos serán almacenados en una computadora encriptada protegida con una contraseña. La clave de la vinculación de su nombre y su código de estudio se almacenarán por separado. El equipo de investigación que trabaja en el estudio coleccionará su información. Esto incluye la información obtenida por medio de los procedimientos descritos en este formato de consentimiento. También pueden recopilar otra información, incluyendo su nombre, dirección, fecha de nacimiento, y la información de sus registros médicos. Esto podría incluir información sobre el VIH y pruebas genéticas, o tratamiento por el abuso de drogas o alcohol, o problemas de salud mental. El equipo de investigación sabrá su identidad. Pondremos esta información a disposición de sus médicos para su seguridad. Si cree que este estudio podría afectar su atención clínica, por favor informe a su médico.

Este estudio está protegido por un Certificado de Confidencialidad que ayuda a mantener su información privada cuando es almacenada en los Estados Unidos.

**¿Cuáles son los posibles beneficios de participar en este estudio?**

Las investigaciones son diseñadas para el beneficio de la sociedad mediante la adquisición de nuevos conocimientos. Probablemente se le realizarán otras pruebas que pueden darle información acerca de su salud. Estas pruebas pueden incluir una TC de cabeza, la que le proporcionará a su médico más información sobre sus posibles condiciones de salud. La información recopilada sobre lo que sucede cuando las personas tienen la infección por el VIH y una infección neurológica puede ayudar a los médicos a tomar decisiones de tratamiento para otros pacientes en el futuro. Además, a información adquirida en este estudio puede

**APROBADO**

prisma

PRESIDENTE  
Comité Institucional de  
Ética en Investigación

Page 5 of 10

COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN

Consent Hospitalizados Ver 1.1 - 10.12.2016

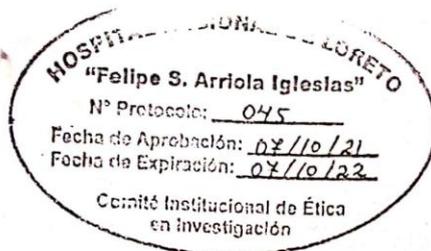
"Felipe S. Arriola Iglesias"

N° Protocolo: 045

Fecha de Emisión: 07/10/21

Fecha de Expiración: 07/10/22

Comité Institucional de Ética  
en Investigación



IRB Office Use Only	IRB Approval Date: IRB Consent Version No.:
------------------------	--

ayudar a los médicos a diagnosticar y tratar mejor la enfermedad de Chagas, toxoplasmosis y tuberculosis. La información de este estudio podría ayudar a los médicos a cuidar mejor de las personas con infección por el VIH.

**¿Qué pasará con la información y los biospecímenes que son colectados durante el estudio?**

**¿Qué pruebas o procedimientos se pueden hacer con sus biospecímenes?**

Sus biospecímenes pueden ser usados para diferentes fines de investigación, respetándose la confidencialidad y anonimato de los individuos. Algunos de los especímenes serán utilizados para las pruebas descritas anteriormente. Si hay muestras sobrantes, nos gustaría contar con su permiso para almacenarlas para futuras investigaciones.

La Universidad Johns Hopkins y nuestros colaboradores de investigación trabajan para promover la ciencia y la salud pública. La información y los biospecímenes que colectemos de usted son importantes para este trabajo. Cuando hablamos de biospecímenes nos podemos referir a cualquiera de los siguientes: sangre, tejido, saliva, orina, células, entre otros. La mayoría de los biospecímenes contienen ADN, que es el código genético de cada persona.

Si participa en este estudio, usted no será el dueño de la información y/o los biospecímenes colectados de usted como parte del estudio de investigación. Si los investigadores los usan para crear un nuevo producto o idea, incluyendo aquellas que tienen un valor comercial, usted no se beneficiará económicamente.

**¿Cuál es el propósito de este repositorio de especímenes o "biobanco"?**

La investigación con sangre, tejido o fluidos corporales (especímenes) puede ayudar a los investigadores a entender cómo funciona el cuerpo humano. Los investigadores pueden desarrollar nuevas pruebas para encontrar enfermedades, o nuevas maneras de tratar enfermedades. En el futuro, la investigación puede ayudar a desarrollar nuevos productos, como por ejemplo fármacos. Los especímenes son utilizados comúnmente para investigaciones genéticas. Algunas veces los investigadores colectan y almacenan muchos especímenes y los usan para diferentes tipos de investigación, o los comparten con otros científicos; esto es llamado repositorio de especímenes o "biobanco".

El propósito de este repositorio o biobanco es hacer mayor cantidad de investigación en el futuro que nos permita entender, diagnosticar, tratar y curar enfermedades. Nosotros almacenaremos lo que sobre de sus muestras de sangre, orina, saliva y fluido cerebroespinal. Probablemente utilizaremos esas muestras en el futuro para investigación en VIH, otras infecciones, o investigación genética para determinar la relación entre genes, el ambiente, y los hábitos o dietas de las personas, y diferentes enfermedades.

**¿Qué pasará con sus especímenes?**

Los especímenes serán guardados en congeladoras en la Universidad Peruana Cayetano Heredia en Lima, Perú. Estos laboratorios son seguros y son solo accesibles para las personas que trabajan ahí. Sus especímenes serán rotulados solo con un código; su nombre no estará vinculado a este código. Los especímenes serán destruidos luego de 5 años. La información y los especímenes pueden ser compartidos con otros científicos



para que hagan investigación, pero su nombre u otros identificadores no serán compartidos.

**¿Qué son los Estudios de Asociación del Genoma (GWAS, por sus siglas en inglés)?**

Los Institutos Nacionales de Salud De Estados Unidos (NIH) han establecido una base de datos nacional que contendrá información de muchos individuos de diferentes partes del país, incluyendo su información médica y genética. La información de sus biospecímenes será depositada en esta base de datos de los Estados Unidos y será compartida con otros investigadores. El acceso a esta base de datos nacional será controlado y estará limitado a otros investigadores. Los resultados de todas las personas en el estudio, no solo los de usted como un individuo, se pondrán a disposición del público.

**¿Cuáles son los posibles beneficios para usted?**

Los estudios que utilicen especímenes de este repositorio pueden resultar en información adicional que será útil para entender cómo ciertos genes humanos afectan la respuesta del organismo ante enfermedades neurológicas infecciosas en paciente con VIII.

**¿Cuáles son los posibles riesgos o molestias relacionados al uso de sus especímenes?**

Se pueden presentar riesgos que en este momento son desconocidos. A veces hay preocupaciones, incluso si son hipotéticas, de que las personas puedan descubrir cosas sobre usted (por ejemplo, que sus genes lo hacen susceptible a una determinada enfermedad). Estas preocupaciones se minimizan con este repositorio, ya que las muestras no podrán vincularse con su identidad, por lo que será imposible que alguien sepa qué muestra(s) proviene(n) de usted.

**¿Usted recibirá algo por el uso de sus especímenes?**

No hay ningún pago por participar en este estudio. Los costos del transporte público o estacionamiento por venir a las visitas del estudio serán reembolsados. Usted no recibirá ningún pago adicional o donación por el uso de sus muestras. Estas muestras biológicas pueden servir para analizar y diagnosticar enfermedades oportunistas que puedan dañar su salud.

**¿Quién es el dueño de sus especímenes?**

Cualquier muestra de sangre, fluidos corporales o tejidos obtenidos para este estudio se convierte en propiedad exclusiva de la Universidad Johns Hopkins. Esta organización puede retener, preservar o desechar sus especímenes y puede usarlos para investigaciones que pueden resultar en aplicaciones comerciales. No hay planes para compensarlo por el uso comercial futuro de estas muestras.

**¿Usted recibirá resultados de estudios futuros que utilicen sus especímenes?**

No se espera que las investigaciones futuras que utilicen sus especímenes produzcan nueva información que sea necesario compartir con usted personalmente. Además, en caso lo hagan, sería imposible compartirla con usted, pues los investigadores no tienen información que lo identifique.

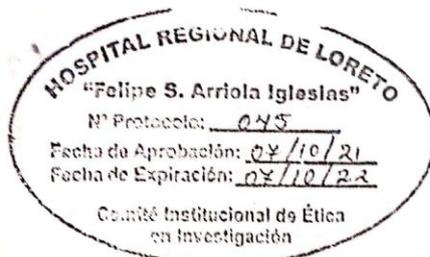


APROBADO

04 FEB. 2020



PRÉSIDENTE  
Comité Institucional de  
Ética en Investigación



IRB Office Use Only	IRB Approval Date: IRB Consent Version No.:
------------------------	--

Comité Institucional de Ética  
en Investigación

**¿Puede usted retirar las muestras de este repositorio?**

Usted no podrá retirar sus especímenes del repositorio porque, debido a que no hay identificadores en la muestra, los investigadores no sabrán qué muestra es suya.

**¿Cómo se compartirá su información y/o biospecímenes ahora y en el futuro?**

Compartir información y/o biospecímenes es parte de la investigación y puede incrementar la cantidad de conocimiento adquirido en este estudio. A menudo, compartir información/biospecímenes es un requerimiento del financiamiento o para publicar los resultados del estudio. También es necesaria para permitir que otros investigadores validen los hallazgos del estudio y creen nuevas ideas. Su información y/o biospecímenes podría ser compartida:

- Directamente con colaboradores de investigación, otros investigadores, patrocinadores, agencias gubernamentales, editores de artículos y otros socios de investigación
- A través del gobierno u otras bases de datos/repositorios

La colaboración entre investigadores, que generalmente involucra que se compartan información/biospecímenes, puede cambiar a través del tiempo y puede continuar luego de que termine el estudio.

Nosotros haremos el mayor esfuerzo para proteger y mantener su información/biospecímenes de una manera segura. Cuando compartimos información, nosotros limitamos su uso y con qué otros equipos de investigación pueden ser compartida. Generalmente, si es que compartimos su información/biospecímenes sin identificadores (como su nombre, dirección, fecha de nacimiento) no se necesitan nuevas revisiones y aprobaciones del Comité de Ética Institucional (CEI) para utilizar esta data con nuevos propósitos. Si es que compartimos información/biospecímenes con identificadores, cualquier nuevo uso necesitará revisión y aprobación del CEI y ellos determinarán si es que se necesita un consentimiento adicional.

Los investigadores de Johns Hopkins quizás utilicen los biospecímenes colectados en este estudio para investigaciones con otros propósitos, los que pueden incluir desarrollo de líneas celulares, secuenciamiento genético, y pruebas genéticas. Esta investigación futura puede no estar relacionada al estudio actual y puede incluir colaboradores externos.

Debido a que la ciencia avanza constantemente, aún no sabemos que pruebas se podrían realizar en investigaciones futuras. Si es que sus biospecímenes son probados/usados en maneras no descritas en los párrafos anteriores, le pediremos al CEI que revise y apruebe estos nuevos usos y ellos determinarán si es que se necesita un consentimiento adicional.

**¿Usted deberá pagar algo para participar en este estudio?**

No hay ningún costo por participar en este estudio.

**¿Usted recibirá algún pago si es que participa en el estudio?**

No hay ningún pago por participar en este estudio. Los costos del transporte público o estacionamiento por venir a las visitas del estudio serán reembolsados por un monto máximo de 20 soles para los que vivan en la ciudad. Para los que viven en comunidades

Consent hospitalizados Ver 1.1 - 10/12/2019

 PRESIDENTE  
Comité Institucional de  
Ética en Investigación

Page 8 of 10

alejadas del centro hospitalario se les pagará el costo total del pasaje y alimentación del paciente y su cuidador, tutor o acompañante.

**¿Usted puede retirarse del estudio antes de que termine?**

Usted puede retirarse de este estudio en cualquier momento, sin penalización. Los investigadores también tienen el derecho de suspender su participación en cualquier momento. Esto podría ser porque usted ha tenido una reacción inesperada, no sigue las instrucciones, o el estudio se ha cancelado. Dejar este estudio tempranamente no le impedirá recibir atención médica. Usted seguirá recibiendo los procedimientos y el tratamiento necesario de su médico de acuerdo con las normas del Ministerio de Salud del Perú o Bolivia. Si deja el estudio tempranamente, podríamos usar o divulgar su información de salud que se ha recogido si la información es necesaria para este estudio o cualquier actividad de seguimiento.

**¿Qué es el Comité de Ética Institucional (CEI) y como lo protege?**

Este estudio ha sido revisado por el Comité de Ética Institucional (CEI). El CEI está formado por un grupo de personas, incluyendo científicos y personas de la comunidad, que revisan estudios de investigación en humanos. El CEI puede ayudarte si es que tienes preguntas acerca de tus derechos como participante de una investigación o si tienes alguna otra pregunta, preocupación o queja acerca de este estudio de investigación. Usted puede contactar el CEI de la Universidad Johns Hopkins llamando al 410-955-3193 o escribiendo un correo a [jhsph.irboffice@jhu.edu](mailto:jhsph.irboffice@jhu.edu)

**¿Qué debe hacer si es que tiene preguntas acerca del estudio, o está herido o enfermo como resultado de participar en el estudio?**

Llame al investigador principal, el Dr. Robert Gilman al +51 1-464-0221 o +1 410-614-3639. Si usted desea puede contactar al investigador principal por correo a [gilmanboh@gmail.com](mailto:gilmanboh@gmail.com). Si usted no puede comunicarse con el investigador principal o desea hablar con alguien más, llame a la oficina del CEI al:

- Hospital Nacional Dos de Mayo: +51328-0028 - Dra. Judith Elisa Herrera Chávez
- CEI Universidad Peruana Cayetano Heredia: +51319-0000 anexo 201352 - Dra. Frinc Samalvides Cuba
- Hospital Regional de Loreto: +51965870530 -- Dr. Cesar Johnny Ramal Asayag
- Hospital San Juan de Dios: +59133352866 -- Dra. Rosmary Gross
- Universidad Católica Boliviana "San Pablo": +59133442999 Dr. Jorge Ybarnegaray Urquidi
- Asociación Benéfica Prisma: + 51 209-0400 Anexo 246. Salomón Zavala Correo: [mmateo@prisma.org.pe](mailto:mmateo@prisma.org.pe)
- Comité Institucional de Ética en Investigación del Hospital Cayetano Heredia: +514819502
- Dr. Jorge Luis Hung Yep

**Documentando la elección de los participantes**

**Colección/Almacenamiento de los bioespecímenes para uso en futuras investigaciones**

Usted puede aceptar o rechazar la recolección y el almacenamiento de bioespecímenes para futuras investigaciones, incluyendo la inclusión de la información obtenida de sus bioespecímenes en el repositorio de los Estados Unidos. Usted puede participar en el presente estudio sin necesidad de aceptar el uso a largo plazo de sus bioespecímenes. Indique su decisión a continuación marcando la casilla correspondiente. Puede cancelar este consentimiento y solicitar la eliminación de su muestra del almacenamiento contactando al

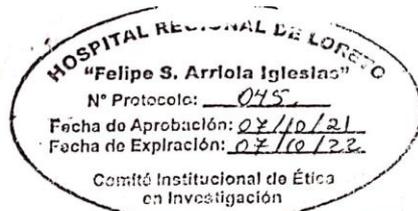


**APROBADO**

04 FEB. 2020



PRESIDENTE  
Comité Institucional de Ética en Investigación



IRB Office Use Only	IRB Approval Date: IRB Consent Version No.
------------------------	---

Comité Institucional de Ética  
en Investigación

investigador. Sin embargo, si la muestra se ha compartido previamente, o si se han eliminado los identificadores, no será posible.

ACEPTO  NO ACEPTO

**Contacto futuro**

Nos gustaría obtener su permiso para que nuestro equipo de investigación lo contacte en el futuro. Tenga en cuenta que su decisión a continuación no impide que otros investigadores de Johns Hopkins lo contacten para realizar otras investigaciones. Indique su decisión a continuación marcando la casilla correspondiente.

ACEPTO  NO ACEPTO

**¿Qué significa su firma en este consentimiento informado?**

Su firma en este consentimiento informado significa que usted ha revisado toda la información incluida en este documento, ha tenido la posibilidad de hacer preguntas, y ha aceptado participar en el estudio. Usted no renunciará a ningún derecho legal al firmar este formulario de consentimiento.

**LE DAREMOS UNA COPIA DE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO FIRMADO Y FECHADO**

Firma del participante \_\_\_\_\_ Nombre completo \_\_\_\_\_  
Fecha/Hora: \_\_\_\_\_

Firma de la persona que obtuvo el consentimiento \_\_\_\_\_ Nombre completo \_\_\_\_\_  
Fecha/Hora: \_\_\_\_\_

Firma del Representante Legal (RL) \_\_\_\_\_ Nombre completo \_\_\_\_\_  
Fecha/Hora: \_\_\_\_\_

**Para ADULTOS que NO SON CAPACES DE DAR CONSENTIMIENTO**

Relación entre el RL y el participante \_\_\_\_\_  
Fecha/Hora \_\_\_\_\_

(Indique por qué el RL está autorizado a actuar como un sustituto de la toma de decisiones de atención médica según las leyes estatales o locales)

Firma del Representante Legal (RL) \_\_\_\_\_ Nombre completo \_\_\_\_\_  
Fecha/Hora \_\_\_\_\_



PRESIDENTE  
Comite Institucional de  
Ética en Investigación