



I N T E C H

Epidemiología clínica y desarrollo
de nuevos sistemas de diagnóstico de la
toxoplasmosis

Biól. Elias Maximiliano Rivera

Director: Dr. Sergio O. Angel

Co-Director: Dra. Marina Clemente

Universidad Nacional de General San Martín

UNSAM

Instituto Tecnológico de Chascomús

(INTECH)-CONICET

Tesis para optar al título de
Doctor en Biología Molecular y
Biotecnología

2021

Agradecimientos

En primer lugar, un especial agradecimiento a Sergio y a Marina por abrirme las puertas de sus laboratorios para poder llevar a cabo esta tesis. Por escucharme y permitirme desarrollar mis ideas. Por enseñarme a trabajar, a plantear nuevas preguntas y resolver problemas. Por ayudarme en mi crecimiento profesional y, más aun, en lo personal. Ha sido un verdadero placer haber formado parte del laboratorio.

Una mención especial a los Dres. Andrés Alonso, Diego Ruiz y Valeria Turowski, por todos los conocimientos que me han transmitido a lo largo de mi tesis. Por la enorme paciencia que me han tenido y por haberse tomado siempre un momento de su trabajo para ayudarme con mis experimentos.

A mis compañeros de la UB2 por la compañía, los mates, las charlas y discusiones que me han acompañado a lo largo de este proceso de aprendizaje.

A todos los integrantes del INTECH, por hacer del Instituto un lugar de trabajo con un entorno muy amigable y agradable.

A Andrea Silva y Silvina Lavayén del Instituto Nacional de Epidemiología Dr. Juan Jara-ANLIS, por su colaboración en el desarrollo de todo el trabajo epidemiológico llevado a cabo en la tesis.

A Jorge Rodríguez, Paola Sánchez, Carlos Martins, Etelvina Gómez y a todo el personal del Hospital Municipal San Vicente de Paul de la ciudad de Chascomús, por la gran ayuda que me dieron en la recolección de datos que me permitió cumplir los objetivos de la presente tesis.

Por último, quiero agradecer enormemente a mi familia y amigos, a los cuales les dedico especialmente esta tesis. A mis padres por apoyarme desde el primer día en mi formación académica. A mis hermanos por todo el AGUANTE y los momentos compartidos. A mis amigos, a los que están cerca y los que están lejos, por tantos

Agradecimientos

momentos divertidos y a nuestras charlas de la vida. Gracias por hacer que todo sea más fácil y placentero. No estaría acá sino fuera por todos ustedes.

Resumen

La infección con el parásito *Toxoplasma gondii*, el agente causal de la toxoplasmosis, es una zoonosis muy difundida a nivel mundial, llegando a ser considerada una de las más importantes infecciones producidas por alimentos. Esta infección puede ser asintomática o causar síntomas no específicos que incluyen fiebre, linfadenopatías y mialgias, imitando otras enfermedades infecciosas. Sin embargo, en algunos casos puede presentar serias complicaciones, en particular en pacientes inmunocomprometidos y en los recién nacidos cuando ocurre transmisión vertical, en donde el parásito atraviesa la placenta e infecta al embrión con manifestaciones clínicas como aborto espontáneo, hidrocefalia, retardo en el crecimiento, alteraciones neurológicas, anomalías cardiovasculares hasta un recién nacido asintomático pero que manifiesta algunos síntomas, como daño ocular, en algún periodo de su vida.

A nivel mundial, la seroprevalencia se encuentra entre el 10-70%, llegando a considerarse que un tercio de la población se encuentra infectada con este parásito. Este rango de valores observado puede deberse a la región analizada, las diferencias climáticas, las condiciones socioeconómicas, los hábitos alimenticios e higiénicos y a la susceptibilidad del huésped. En Argentina, la prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres embarazadas se sitúa entre el 16.8-51.1%, de acuerdo a un estudio llevado a cabo en CABA y en Provincia de Buenos Aires. En el presente trabajo, con el fin de determinar el estado de la infección toxoplásmica en un área rural, se analizó la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres embarazadas (edad 13 - 44 años; n= 920) entre los meses de abril del 2014 y diciembre del 2017 en la ciudad de Chascomús, caracterizada por ser una ciudad con una fuerte actividad rural y dado que existen importantes diferencias en el desarrollo urbano dentro de la ciudad, se decidió analizar si había alguna asociación entre la seroprevalencia y las áreas menos desarrolladas (región periurbana) como fue observado por otros. Del total de mujeres embarazadas analizadas, 320 resultaron positivas para anticuerpos IgG, con una prevalencia de 34.8% (IC 95%: 31.7 - 37.9). No se observó una asociación entre la seroprevalencia y edad. Sin

embargo, cuando se evaluó la seroprevalencia en relación a la distribución geográfica de 769 mujeres embarazadas (83,6% del total) se observó un 26,8% (IC 95%: 19,8 – 33,7) de seroprevalencia en zonas urbanas (n = 157) respecto a un 36,4% (IC 95%: 32,6 – 40,3) de prevalencia en zonas periurbana (n = 612), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (p= 0,023). A su vez, se implementó un cuestionario con el objetivo de evaluar posibles factores de riesgo asociados a la infección con este parásito, entre abril del 2016 y diciembre del 2017. Los factores de riesgo que se consideraron fueron: actividad (rural o urbana), fuente de agua en el hogar, cría de animales, presencia de gato como mascota, jardinería y consumo de carnes (cerdo, oveja y embutidos) con sus frecuencias (consumo mensual). Interesantemente, solo se encontraron diferencias significativas cuando se comparó la seroprevalencia entre las áreas urbanas y peri-urbanas de la ciudad. La mayor prevalencia observada en las zonas peri-urbanas puede ser debida a una situación económica desfavorable y/o a ambientes subdesarrollados, lo cual podría ser un factor de riesgo que debería ser tenido en cuenta al momento de establecer pautas de seguimiento en mujeres embarazadas.

El diagnóstico de la toxoplasmosis en mujeres embarazadas se basa fundamentalmente en el análisis del perfil serológico de la paciente y, además, no solo se debe establecer si la paciente estuvo o no en contacto con el parásito, sino que se debe determinar también si se encuentra en la fase aguda o crónica de la infección, ya que es en la fase aguda donde el parásito puede atravesar la placenta e infectar al embrión. Con el objetivo de identificar nuevos antígenos con utilidad en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis, se estudiaron diversos rAg de *Toxoplasma gondii* como posibles marcadores de infección reciente (IR) y de transmisión vertical (TV), estos incluyen antígenos de Gránulos densos (rGra4, rGra7, rGra8, rGra17, r310790, r200360 y r313640), de Micronemas (rMic1) y Roptrias (rRop2), además de las quimeras rGra4–Gra7 y rRop2–Gra4. Con la excepción de rGra17, 200360 y 313640, el resto de los antígenos mostraron una mayor serorreactividad con sueros de pacientes en fase aguda de la infección, como así también en ratones infectados con *T. gondii*. Asimismo, se llevó a cabo un análisis de la respuesta cinética humoral de anticuerpos IgG en muestras de suero

Resumen

de bebés con TC y no infectados con anticuerpos maternos (NI). Los sueros de los bebés con TC (n= 7) y los de sus madres mostraron una mayor reactividad con rMic1, rGra8 y rGra4–Gra7 y se mantuvieron positivos durante el primer año de vida; mientras que la serorreactividad de los sueros de los bebés NI (n= 10) y los de sus madres fue más baja, y se observó una pérdida de reactividad a los pocos meses de vida. En la mayoría de los casos de TC, el perfil de serorreactividad mostró una tendencia a disminuir con el tiempo, como se espera para un marcador de infección aguda o activa. En conclusión, se identificaron distintos antígenos como posibles marcadores de infección aguda, siendo rGra7 el que mejor desempeño tuvo, y 2 nuevos antígenos (rMic1 y rGra8) y una proteína quimera (rGra4-Gra7), como posibles marcadores de infección reciente en bebés con TV, con utilidad en el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis.

Palabras claves:

Toxoplasmosis; Diagnóstico; Epidemiología; Antígenos Recombinantes; Serología

Abstract

Infection with the parasite *Toxoplasma gondii*, the causal agent of toxoplasmosis, is a very widespread zoonosis worldwide, being considered one of the most important infections produced by food. This infection can be asymptomatic or cause non-specific symptoms that include fever, lymphadenopathy and myalgia, imitating other infectious diseases. However, in some cases it can present serious complications, particularly in immunocompromised patients and in newborns in the case of congenital transmission, where tachyzoites can cross the placenta and infects the fetus, with clinical manifestations ranging from spontaneous abortion, hydrocephalus, intrauterine growth retardation, neurological alterations, cardiovascular abnormalities, to an asymptomatic newborn that manifest symptoms, such as eye damage, at some period of his life.

Worldwide, seroprevalence is between 10-70%, and one third of the population is considered to be infected with this parasite, but this values vary according to the region, climatic differences, socioeconomic conditions, food and hygiene habits and susceptibility of the host. In Argentina, the prevalence of anti-*T. gondii* antibodies in pregnant women is between 16.8-51.1%, according to a study carried out in CABA and in the Province of Buenos Aires. In order to address the state of the toxoplasmic infection in a rural area, we analyzed the seroprevalence of anti-*T. gondii* antibodies in pregnant females (age 13 - 44 years; n= 920) between April 2014 and December 2017 from Chascomús (Argentina), a city immersed in a rural area. Furthermore, given that there are important differences in the urban development within the city of Chascomús, we decided to analyze if there would be any association with seroprevalence in less developed areas (peri-urban region) as was observed by others. Altogether 320 tested positive for immunoglobulin G antibodies, yielding an overall seroprevalence of 34,8% (CI 95%: 31,7 - 37,9). No association was observed between seropositivity and age. However, when seroprevalence was evaluated in relation to the geographical distribution of 769 pregnant women (83,6% of the total), 26,8% (95% CI: 19,8 - 33,7) of seroprevalence was observed in urban areas (n = 157) compared to a 36.4% (95% CI: 32,6 - 40,3)

Abstract

prevalence in peri-urban areas (n = 612), being this difference statistically significant (p= 0,023). Furthermore, we assessed through a questionnaire survey, between April 2016 to December 2017, possible risk factors such as activity (urban and rural), home water supply, animal husbandry, presence of cats as pets, gardening and consumption of meat and its derivatives (pork, sheep meat and sausages) and their frequencies (consumption per week). Significant differences were found only when the seroprevalence was analyzed between the urban and peri-urban neighborhoods of the city of Chascomús. The higher seroprevalence in peri-urban neighborhoods could be due to an unfavorable socioeconomic situation and/or to undeveloped peri-urban environments, which is a risk factor that should be taken into account when planning the health care of pregnant females.

The diagnosis of toxoplasmosis in pregnant women is mainly based on analysis of serological profile of the patient and, in addition, not only must establish whether the patient was or not in contact with the parasite, but must also determine whether it is in the acute or chronic phase of the infection, since it is in the acute phase where the parasite can cross the placenta and infect the embryo. In order to identify new antigens useful in the differential diagnosis of toxoplasmosis, we evaluated the performance of various rAg of *Toxoplasma gondii* as diagnostic markers of acquired toxoplasmosis (AT) and congenital toxoplasmosis (CT), including Dense granules (rGra4, rGra7, rGra8, rGra17, r310790, r200360 and r313640), Microneme (rMic1) and Rhoptry (rRop2), in addition to the chimeric proteins rGra4–Gra7 and rRop2–Gra4. With the exception of rGra17, 200360 and 313640, the rest of the antigens showed higher seroreactivity with sera from patients in the acute phase of infection and experimentally infected mice, respectively. An analysis of IgG response kinetics was performed using serum samples from infants with CT and uninfected (UI). Sera from CT patients (n=7) and their mothers showed high reactivity to rMic1, rGra8, and rGra4–Gra7 and remained positive throughout the first year after birth; the seroreactivity of samples from UI patients (n=10) and their mothers was lower, and was lost at a few months of age. In most cases of CT, the seroreactivity profile showed a declining trend, as expected for a marker of acute or active infection. In conclusion, different antigens were identified as possible

Abstract

markers of acute infection, being rGra7 the one that had the best performance, and 2 new antigens (rMic1 and rGra8) and a chimera protein (rGra4-Gra7), as possible markers of recent infection in infants with CT, useful in the early diagnosis of toxoplasmosis.

Keywords:

Toxoplasmosis; Diagnosis; Epidemiology; Recombinant Antigens; Serology

Publicaciones

E. M. Rivera, S. N. Lavayen, P. Sanchez, C. M. A. Martins, E. Gomez, J. P. Rodríguez, Marcela E. Arias, A. P. Silva, S. O. Angel, *Toxoplasma gondii* seropositivity associated to peri-urban living places in pregnant women in a rural area of Buenos Aires province, Argentina, *Parasite Epidemiol Control*, vol. 7 (2019).

Presentaciones a congresos

E. M. Rivera, S. N. Lavayen, P. Sanchez, C. M. A. Martins, E. Gomez, J. P. Rodríguez, Marcela E. Arias, A. P. Silva, S. O. Angel. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pregnant women from a rural population of Buenos Aires province, Argentina. The XVTH Toxoplasma International, Quimbaya, Quindio, Colombia, June 19-21, 2019.

E.M. Rivera, P. Sanchez, E. Gomez, S. N. Lavayén, A. P. Silva, M. Clemente, S. O. Angel. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in the City of Chascomús. XXX Meeting of the Argentine Society of Protozoology, Resistencia, Chaco, República Argentina, November 1 – 3, 2018.

E. Sánchez López, L. Radonic, M. Corigliano, **E. M. Rivera**, R. Albarracin, V. Sander, S. Bengoa, M. López, M. Clemente. USE OF *Lactuca sativa* L. (LETTUCE) FOR THE EXPRESSION OF THE MAIN SURFACE ANTIGEN 1 (SAG1) of *Toxoplasma gondii*. XXIV Latin American Parasitology Congress (FLAP 2017), Santiago de Chile, Chile, November 10 – 14, 2017.

E. M. Rivera, P. Sánchez, A. Sullings, V. Díaz, M. I. Salaberry, M. Begoña, S. Giménez, I. Quesada, E. Corbo, M. Ventura, S. Lavayén, A. Silva, M. Clemente, S. O. Angel. EPIDEMIOLOGY OF TOXOPLASMOSIS IN THE CITY OF CHASCOMÚS. XXVIII Meeting of the Argentine Society of Protozoology and Parasitic Diseases, and the International symposium on Cellular and Molecular Biology of Chagas Disease”, Santa Fe, November 26 – 28, 2016.

Abreviaturas

aa: aminoácido

rAg: Antígeno recombinante

CABA.: Ciudad Autónoma de Buenos Aires

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario, copia del ARN

DS: Desviación estándar

d.p.i.: Días Post Infección

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés: enzyme-linked immunosorbent assay)

cELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas comercial

IgG-ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, para la detección de IgG en suero

ELFA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas por fluorescencia (del inglés: enzyme-linked fluorescence assay), para la detección de IgG en suero

ESA: Sistema excretor/secretor del parásito

HAI: Ensayo de Hemoaglutinación Indirecta

h.p.i.: Horas Post Infección

HRP: Peroxidasa del rábano (del inglés: horseradish peroxidase)

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IgA: Inmunoglobulina A

IgE: Inmunoglobulina E

IAAT: Ensayo de aglutinación inmunoabsorbente

IR: infección reciente

ISAGA: Ensayo de inmunoaglutinación inmunoabsorbente (del inglés: Immunosorbent Agglutination Assay) para la detección de IgM

IC 95%: Intervalo de confianza del 95%

Abreviaturas

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

kDa: Kilo Dalton

LAT: Ensayo de aglutinación en Látex

LB: Medio de cultivo para bacterias Luria-Bertoni

MAT: Ensayo de aglutinación modificado (del inglés: modified agglutination test)

NI: Bebés No Infectados congénitamente con *T. gondii*

O.D.: Densidad óptica (del inglés: Optical density)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: Polymerase Chain Reaction)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa del RNA (del inglés: retrotranscription-PCR)

VP: Vacuola parasitófora (del inglés: parasitophorous vacuole)

MVP: Membrana de la Vacuola parasitófora (del inglés: parasitophorous vacuole membrane)

NVP: Red intravacuolar (del inglés: parasitophorous vacuole network)

PMSF: Inhibidor de proteasas (del inglés: Phenylmethylsulfonyl fluoride)

RP: Razón de prevalencia

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecil sulfato sódico (del inglés "Sodium Dodecyl Sulfate – Poly acrylamide gel electrophoresis")

SIC: Sensibilidad a sueros en fase crónica de la infección por *T. gondii*

SIA: Sensibilidad a sueros en fase aguda de la infección por *T. gondii*

TV: Transmisión vertical

TLA: Lisado total de taquizoitos de *T. gondii* (del inglés: tachyzoites lysate antigen).

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

VN: Verdaderos negativos

VP: Verdaderos positivos

FN: Falsos negativos

FP: Falsos positivos

Índice

Agradecimientos	1
Resumen	2
Abstract.	5
Publicaciones.	8
Abreviaturas	9
Capítulo 1 <i>Introducción general</i>	14
1. <i>Toxoplasma gondii</i>	15
1.1. Características generales.....	15
1.2. Genotipos.....	16
1.3. Ciclo de vida.....	17
2. Toxoplasmosis Humana.....	19
3. Diagnóstico.....	25
3.1. Detección directa.....	25
3.2. Detección indirecta.....	26
4. Epidemiología.....	33
4.1. Seguimiento de la mujer embarazada en Argentina.....	34
4.2. Seguimiento en el recién nacido.	35
Objetivos.....	38
General:	38
Específicos:.....	38
Capítulo 2 <i>Seroprevalencia de anticuerpos anti-T. gondii en la ciudad de Chascomús</i>	39
2.1. Introducción.....	40

Índice

2.2.	Resultados y discusión.	42
2.2.1.	Prevalencia de anticuerpos anti- <i>T. gondii</i>	42
2.2.2.	Factores de Riesgo analizados.	43
2.2.3.	Distribución.	46
2.3.	Conclusiones.....	48
2.4.	Materiales y Métodos.	51
2.4.1.	Área de estudio.	51
2.4.2.	Estudio de Prevalencia.....	51
2.4.3.	Factores de riesgo.....	52
2.4.4.	Distribución geográfica.....	52
2.4.5.	Análisis estadístico.....	53
2.4.6.	Consideraciones éticas.	53
Capítulo 3	<i>Antígenos recombinantes</i>	54
3.1.	Introducción.....	55
3.2.	Resultados y discusión.	57
3.2.1.	Selección de las proteínas recombinantes.	57
3.2.2.	Localización de TGME_310790 en parásitos extracelulares e intracelulares de <i>T. gondii</i>	60
3.2.3.	Predicción de epítopes lineales de células B.	62
3.2.4.	Purificación de las proteínas recombinantes.....	69
3.3.	Conclusiones.....	73
3.4.	Materiales y Métodos.	75
3.4.1.	Cultivo in vitro de taquizoitos de <i>Toxoplasma gondii</i>	75
3.4.2.	Proteínas recombinantes de <i>T. gondii</i>	75

Índice

3.4.3	Ensayo de localización de TGME_310790.....	77
3.4.4	Predicción de epítopes lineales de células B.	79
3.4.5	Expresión de proteínas recombinantes.	79
3.4.6	Purificación de proteínas recombinantes.	80
Capítulo 4	<i>Ensayo de antigenicidad</i>	82
4.1.	Introducción.....	83
4.2.	Resultados y Discusión.....	85
4.2.1.	Perfil de anticuerpos específicos en ratones infectados con <i>T. gondii</i>	85
4.2.2.	Detección diferencial de IgG de fase aguda y de fase crónica.....	90
4.2.3.	Análisis cinético de la respuesta humoral en bebés con TC. ..	91
4.3.	Conclusiones.....	96
4.4.	Materiales y Métodos.	100
4.4.1.	Sueros de ratones infectados con <i>T. gondii</i>	100
4.4.2.	Obtención de TLA de <i>T. gondii</i>	100
4.4.3.	IgG-ELISA con sueros de ratones infectados con <i>T. gondii</i> . .	101
4.4.4.	Sueros de pacientes con serología positiva para <i>T. gondii</i> . ..	101
4.4.5.	IgG-ELISA con sueros de pacientes con serología positiva para <i>T. gondii</i>	102
Anexo	104
Bibliografía	118

Capítulo 1

Introducción general

1. *Toxoplasma gondii*

1.1. Características generales

Toxoplasma gondii es un protozoo miembro del Filo Apicomplexa, el cual puede infectar a todos los animales de sangre caliente incluido el hombre. Este Filo incluye otras especies pertenecientes a los géneros *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* y *Plasmodium*, que se caracterizan principalmente por ser parásitos intracelulares, ya que se han adaptados para invadir y desarrollarse dentro de las células huéspedes [1]. *T. gondii* (Fig. 1.1.1) fue descubierto en 1908 por Charles Nicolle y Louis Manceaux, quienes, trabajando en el Instituto Pasteur de Túnez, descubrieron un protozoo en los tejidos de un roedor llamado gundi (*Ctenodactylus gundi*) utilizado como modelo animal en el estudio de la Leishmaniosis. Inicialmente creyeron que se trataba de *Leishmania*, sin embargo, pronto se dieron cuenta que habían descubierto un nuevo organismo y lo llamaron *Toxoplasma gondii* de acuerdo a la morfología que presentaba y al huésped en donde fue encontrado [2].

Más de cien años han pasado de su descubrimiento y durante este tiempo numerosos estudios se llevaron a cabo para entender la biología de este parásito. Con el descubrimiento de su ciclo de vida se pudo entender que *T. gondii* tiene un ciclo heterogéneo, con una fase sexual que tiene lugar en el intestino de los felinos y una fase asexual en animales de sangre caliente con la formación de quistes en diferentes tejidos, lo que condujo también a identificar las principales vías de infección. Por otro lado, con el avènement del VIH, numerosos avances se han hecho en el desarrollo de métodos diagnósticos para la detección temprana de la infección, principalmente los denominados moleculares, debido a que se convirtió en una inesperada y peligrosa infección oportunista en pacientes con VIH [3].

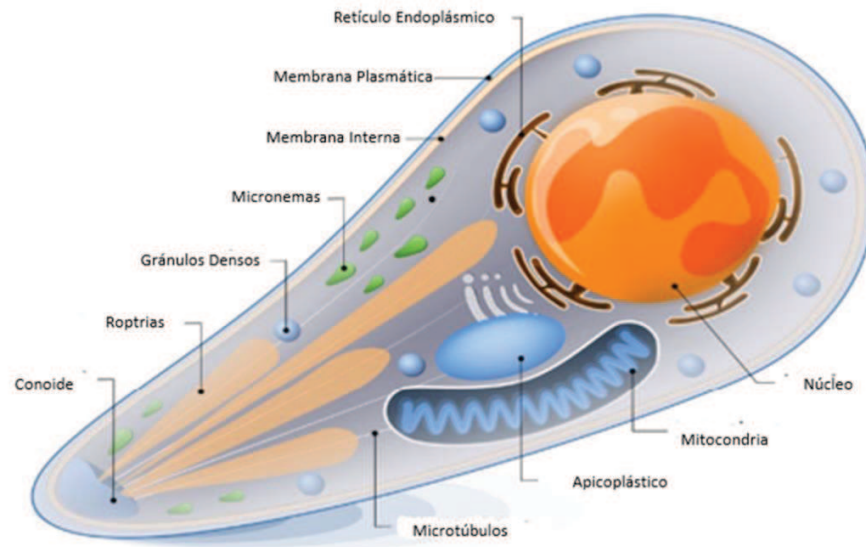


Figura 1.1.1: Esquema de *Toxoplasma gondii* en estadio de taquizoito, característico de la fase aguda de la infección, con sus componentes generales (Fuente: <https://www.shutterstock.com/es/image>).

1.2. Genotipos

Las evidencias genéticas demostraron en un principio la existencia de poblaciones clonales clasificadas en tres linajes dominantes denominados: Tipo I, Tipo II y Tipo III, de acuerdo al grado de virulencia vista en ratones. En Europa, Norteamérica, Asia y África, tanto en los ambientes domésticos como en los salvajes predominan los linajes clonales II y III. Posteriormente, se identificaron cepas regionales como el Haplogrupo 12 en Norteamérica, China 1, en China, y África 1 y 3, en África [4]. Por otro lado, en Sudamérica existe una mayor diversidad genética que la observada en el hemisferio norte y África, de hecho, resultados basados en un muestreo geográfico extensivo apunta a que Sudamérica es el centro de origen de *T. gondii* [5]. Interesantemente, la prevalencia, incidencia y severidad de la toxoplasmosis ocular en áreas de Brasil, Colombia y Argentina son considerablemente más elevadas que en cualquier otra parte del mundo. Se ha

llegado a hipotetizar que los casos severos de toxoplasmosis son consecuencia de una pobre adaptación del individuo a esta diversidad en las cepas, generando una respuesta inmune atenuada y de esta forma una mayor agresividad de la infección [5].

1.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. gondii* es complejo e involucra una fase sexual en miembros de la familia Felidae y una fase asexual que ocurre en los animales de sangre caliente (Fig. 1.1.2). Existen tres estadios infectivos: los taquizoitos que se replican rápidamente durante la infección aguda, los bradizoitos que son característicos de la infección crónica y los esporozoitos que son diseminados en el ambiente dentro de estructuras de resistencia denominadas ooquistes [6].

1.3.1. Ciclo sexual

El ciclo comienza cuando el hospedero definitivo ingiere un quiste presente en los tejidos de la presa infectada crónicamente con este parásito. Una vez ingeridos, los bradizoitos presentes en el quiste son liberados al estómago debido a la degradación de la pared quística por la acción de las enzimas digestivas. Posteriormente, los bradizoitos invaden el epitelio intestinal y se diferencian en cinco estadios asexuales morfológicamente diferentes, denominados esquizontes. Dos días después se diferencian en merozoitos y sufren de dos a cuatro duplicaciones antes de diferenciarse en macrogametas y microgametas. Luego, estas macro y micro-gametas se fusionan dando lugar al ooquiste diploide y comienza a formarse la pared que lo rodea [7] [8]. Cuando los ooquistes maduran, son liberados al lumen intestinal y se excretan junto con las heces [9]. La característica principal por la que el ciclo sexual está restringido a los felinos es la ausencia de la enzima delta-6-desaturasa, que metaboliza el ácido linoleico a ácido araquidónico, siendo los únicos mamíferos conocidos que no poseen actividad delta-6-desaturasa en el

intestino delgado. La ausencia de la actividad de esta enzima en el intestino permite la acumulación de ácido linoleico de la dieta, el cual luego actúa como una señal positiva para el desarrollo sexual de *T. gondii* [10]. Por otro lado, los gatos también pueden infectarse directamente por la ingestión de ooquistes esporulados presentes en el ambiente [11]. Sin embargo, el ciclo sexual inducido por la ingestión de quistes tisulares es el más eficiente debido a que la mayoría de estos gatos excretan ooquistes al ambiente, mientras que menos del 30% de los gatos que se infectan mediante la ingestión directamente de los ooquistes excretan al ambiente nuevos ooquistes [7].

Los felinos excretan más de 100 millones de ooquistes en sus heces y pueden hacerlo hasta 20 días post-infección. Una vez liberados al ambiente, estos ooquistes sufren un proceso de esporulación para madurar y convertirse en infectivos, pudiendo sobrevivir en el ambiente hasta 18 meses tolerando condiciones adversas [12].

1.3.2. Ciclo asexual

Esto ocurre en el hospedero intermediario, que comprende a todos los animales de sangre caliente, incluido el ser humano. La infección en el hospedero intermediario ocurre por vía oral, mediante la ingestión de quistes tisulares u ooquistes presentes en el ambiente [13]. Una vez en el huésped, se produce la liberación del parásito en el tracto intestinal donde invaden las células epiteliales y se diferencian en taquizoitos [14]. Los taquizoitos se dividen dentro de la vacuola parasitófora (VP) que se genera después de la invasión. Luego de la replicación, estos egresan activamente de la célula huésped, la cual es destruida en el proceso. Los taquizoitos libres continúan con la invasión, replicación y egreso de las células hospederas vecinas, lo que se denomina ciclo lítico y es característico de la fase aguda de la infección. Interesantemente, luego de atravesar el epitelio intestinal, los taquizoitos son capaces de infectar células migratorias, como por ejemplo macrófagos y células dendríticas, activando su capacidad de migración, lo que les

permite diseminarse por todo el organismo de forma protegida alcanzando el sistema nervioso central [15]. Eventualmente y por presión del sistema inmune, además de otros factores desconocidos, se diferencian en bradizoitos, estado asociado con la infección crónica. Los quistes que contienen bradizoitos, que se encuentran principalmente en el músculo estriado y en el sistema nervioso central, pueden persistir toda la vida del individuo [16].

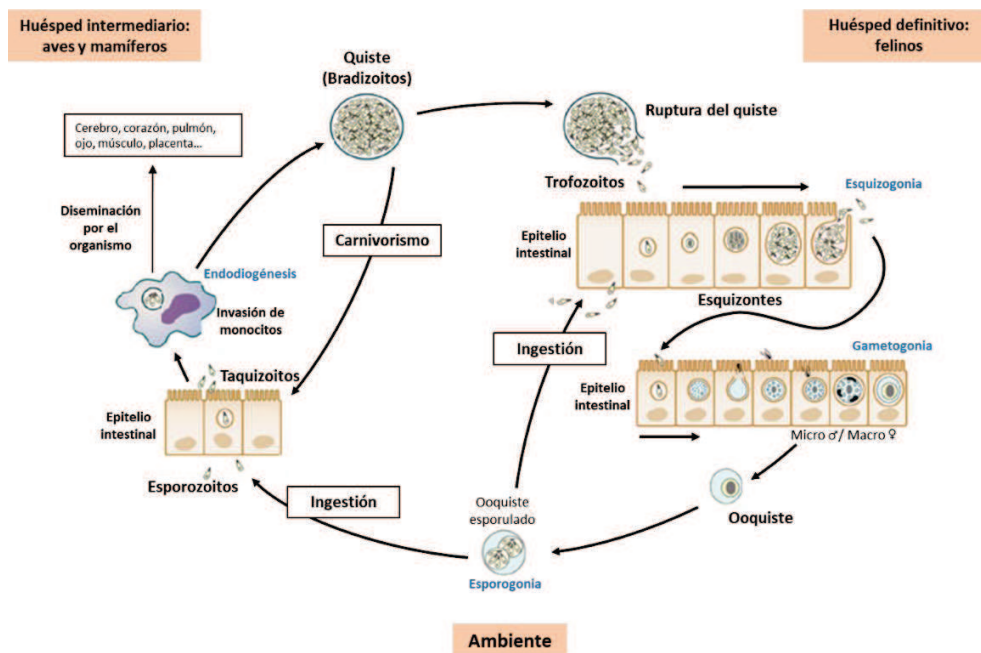


Figura 1.1.2: Ciclo de vida de *T. gondii*. Se muestran la infección y replicación de los tres estadios infectivos en el huésped definitivo e intermediario (Fuente: Robert-Gangneux *et al.* 2012 [14]).

2. Toxoplasmosis Humana

La infección por *T. gondii*, denominada toxoplasmosis, es una de las zoonosis más importantes a nivel mundial debido a que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con este parásito, además de ser considerada una de las

principales infecciones producidas por alimentos en Estados Unidos [17]. En 2015, la FAO/OMS estimó que más de 20 millones de personas padecen enfermedades causadas por toxoplasmosis adquirida, mientras que la toxoplasmosis congénita afecta a 500.000 seres humanos en todo el mundo, lo que da como resultado un total de 1,6 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) [18]. La primoinfección con *T. gondii* es generalmente asintomática, autolimitada y de muy bajo riesgo en personas inmunocompetentes. Esto ocurre una sola vez en la vida y deja un estado de inmunidad humoral y celular permanente [19]. Si bien, para la mayoría de las personas suele no presentar un cuadro clínico específico, pueden presentarse complicaciones severas en pacientes inmunosuprimidos, principalmente pacientes con VIH. Además, la primoinfección en mujeres embarazadas está asociada con una potencial transmisión congénita, debido a que el parásito puede atravesar la placenta e infectar al embrión en desarrollo [20].

2.1. Vías de infección

La infección por *T. gondii* puede ser pre- o post- natal. La infección pre-natal ocurre cuando se produce una primoinfección de la mujer durante el embarazo con riesgo de transmisión vertical, dando lugar a la denominada infección congénita. La infección post-natal puede producirse por diferentes vías, como son el consumo de carne cruda o mal cocida con la presencia de quistes tisulares, contacto directo o indirecto con ooquistes presentes en el ambiente (en el agua, el suelo y en los vegetales) y, de manera menos frecuente, por transfusión sanguínea y trasplantes de órgano [21]. La infección post-natal es denominada toxoplasmosis adquirida. Las vías de infección se resumen la figura 1.2.1.

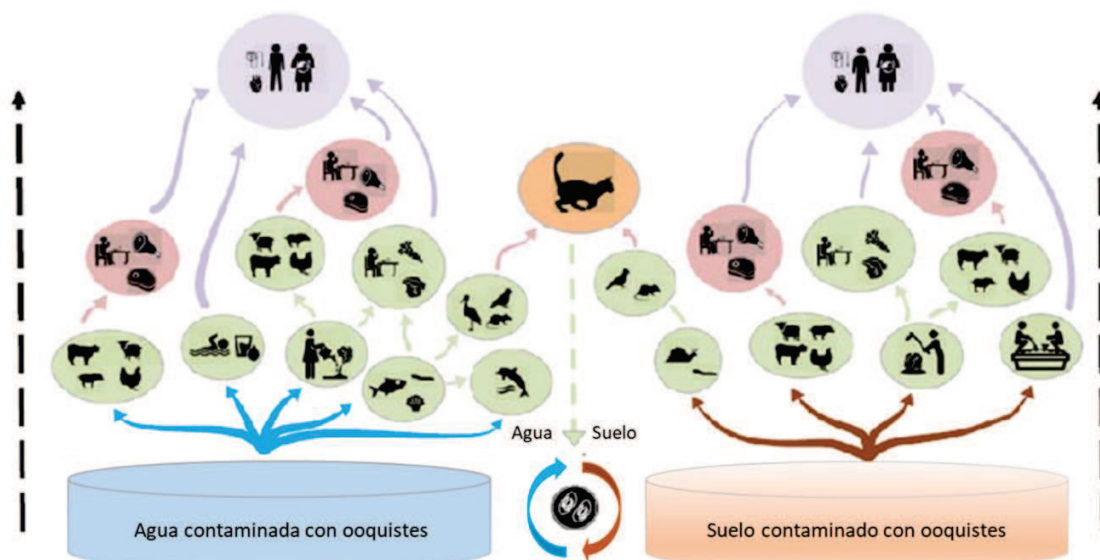


Figura 1.2.1: Vías de infección de *T. gondii*. La transmisión e infección con *T. gondii* comienza con los ooquistes eliminados en las heces de los felinos que contaminan el agua y el suelo, y se transmiten a los distintos huéspedes (definitivos e intermediarios) por contacto directo con los ooquistes o por consumo de quistes tisulares en carne cruda o mal cocida, verduras mal lavadas o consumo de agua contaminada (Fuente: Shapiro *et al.* 2019 [11]).

2.2. Toxoplasmosis en individuos Inmunocompetentes

En pacientes inmunocompetentes, tanto niños y adultos (incluidas mujeres embarazadas), la toxoplasmosis adquirida es asintomática en más del 90% de los casos. En aproximadamente el 10% de los casos, causa una enfermedad autolimitada y no específica que rara vez necesita tratamiento. La más típica de estas manifestaciones es una linfadenopatía cervical u occipital aislada, generalmente discreta y se puede extender hasta 4-6 semanas [22]. Además, de manera poco frecuente se pueden presentar síntomas como miocarditis,

polimiositis, neumonitis, hepatitis y encefalitis. La toxoplasmosis aguda durante el embarazo es asintomática en la mayoría de las mujeres [22].

2.3. Transmisión vertical

La transmisión vertical solo ocurre cuando la madre se infecta con el parásito por primera vez durante el embarazo o en un periodo previo a la concepción. Las mujeres infectadas crónicamente no corren riesgo de transmisión al feto; no obstante, es recomendado que la concepción ocurra al menos seis meses después de la primoinfección [23]. De hecho, la transmisión vertical por una reactivación de la infección debido a una alteración del sistema inmune o por una re-infección con una cepa altamente virulenta, aunque raro, es posible [24].

La tasa de TV es menor si la primoinfección de la madre ocurre en los primeros meses, 10 – 20% aproximadamente, aumentando hacia el final del embarazo, hasta 60 – 80% [25]. Por otro lado, consecuencias como hidrocefalia y microcefalia se producen si la infección del feto ocurre en la primera mitad del embarazo, siendo el aborto espontáneo el peor de los casos. Si bien es más probable que la transmisión vertical ocurra durante el tercer trimestre, las consecuencias son menos severas para el embrión, y en la mayoría de los casos el recién nacido no presenta síntomas clínicos; sin embargo, este puede presentar secuelas que se manifiestan en una edad más avanzada; siendo el daño ocular, como la coriorretinitis, la más común de estas secuelas, además de alteraciones neurológicas y desordenes cognitivos [25]. La clásica triada de síntomas (hidrocefalia, coriorretinitis y calcificaciones intracraneales) es muy poco frecuente [22].

2.4. Toxoplasmosis en individuos Inmunosuprimidos

Al contrario de lo que sucede en individuos inmunocompetentes, en pacientes inmunocomprometidos, la infección puede poner en riesgo la vida del paciente. En estos individuos, la toxoplasmosis casi siempre se produce como resultado de la reactivación de una infección crónica, siendo el sistema nervioso central el sitio que más se ve afectado [22]. Generalmente, la encefalitis toxoplásmica aparece en etapas avanzadas en pacientes con VIH, cuando el conteo de CD4 se encuentra por debajo de 200 células/mm³ y aquellos pacientes donde el conteo de CD4 está por debajo de 50 células/mm³ presentan un mayor riesgo [26]. Las manifestaciones clínicas varían desde fiebre, dolor de cabeza, función sensorial y motora alterada, desorientación, confusión, a una disminución del nivel de conciencia, todas relacionadas con una lesión focal o encefalitis diseminada. También, pueden presentarse casos de coriorretinitis y neumonitis o involucrar diversos órganos, con insuficiencia respiratoria aguda y anomalías hemodinámicas similar al shock séptico. La neumonía es más frecuente en pacientes con VIH y en aquellos pacientes receptores de trasplante de medula ósea [22] [26].

2.5. Toxoplasmosis ocular

Desde 1950, la toxoplasmosis estuvo asociada a una inflamación del ojo seguido de una infección intraocular por *T. gondii*. Actualmente, la retinocoroiditis o toxoplasmosis ocular es una de las más comunes causas de uveítis posterior a nivel mundial y se puede observar tanto en pacientes con transmisión vertical o post-natal, y como resultado de una reactivación de la infección en individuos inmunosuprimidos. Los síntomas típicos de coriorretinitis incluyen lesiones focales notablemente blancas y una reacción inflamatoria vítrea intensa. Tradicionalmente se la consideró una manifestación tardía y como producto de una reactivación, sin embargo, se ha observado un aumento en la frecuencia de coriorretinitis en pacientes con infección aguda [22] [27] [28].

2.6. Tratamiento

Como se mencionó anteriormente, la infección por *T. gondii* es asintomática y puede pasar desapercibida en la mayoría de los individuos inmunocompetentes y no requiere tratamiento. Esto se debe a que el sistema inmune combate la infección y es efectivo en inhibir la replicación del parásito. Sin embargo, las mujeres embarazadas, recién nacidos y los pacientes inmunosuprimidos si requieren tratamiento y la mayoría de los fármacos disponibles están destinados a estos grupos de riesgo [29]. En el caso de TV, existen dos puntos específicos para determinar un tratamiento anti-*T. gondii*. En primer lugar, un tratamiento pre-natal destinado a prevenir la transmisión madre-hijo y, en segundo lugar, un tratamiento post-natal con el objetivo de aliviar las manifestaciones clínicas y prevenir secuelas a largo plazo en el recién nacido en el caso de que se haya producido una transmisión vertical. En el primer caso, se trata a la madre con Espiramicina, el cual es un antibiótico macrólido que se concentra en la placenta e impide que el parásito la atraviese. Por otro lado, si el diagnóstico confirma una infección del embrión la Espiramicina no es efectiva y se receta una combinación de Pyrimetamina-Sulfadiazina-Acido Fólico para reducir los efectos que pueden generar en el feto; sin embargo, esta combinación tiene efecto teratógeno sobre el embrión y se recomienda administrarla sólo después de la semana 14 de gestación [30]. Incluso, un tratamiento con una combinación de Pyrimetamina-Sulfadiazina es recomendado para el recién nacido con transmisión vertical durante el primer año de vida. Por último, en pacientes inmunocomprometidos se recomiendan una combinación de Pyrimetamina-Sulfadiazina de forma rápida y eficaz para evitar la diseminación de la infección [30] [31].

Cabe remarcar que ninguno de estos compuestos, utilizados en el tratamiento de la infección por *T. gondii*, son efectivos para eliminar los quistes tisulares presentes en el individuo, además de presentar efectos adversos, por lo que es necesario el desarrollo de nuevos fármacos para hacer frente a esta cuestión [29].

3. Diagnóstico

La infección por *Toxoplasma gondii* puede ser diagnosticada de manera directa o indirecta. La detección directa está basada en la identificación del parásito o el ácido nucleico parasitario en muestras de tejido o fluido corporal. Las técnicas más empleadas son la observación en fresco, tinciones citológicas, estudios histopatológicos, ensayos de PCR y aislamiento del parásito. También existe la posibilidad de inocular cultivos de tejidos o ratones, y observar la presencia del parásito días después por visualización microscópica. La detección indirecta es ampliamente utilizada en pacientes inmunocompetentes y está basada en la detección de anticuerpos específicos contra *T. gondii* [19].

3.1. Detección directa

Para la detección directa y rápida de la infección toxoplásmica se han desarrollado diferentes métodos moleculares que permiten detectar el ADN de *T. gondii* en muestras biológicas y en aislamientos del parásito a partir de muestras de sangre o fluidos corporales, siendo las más comúnmente usadas: la PCR, RT-PCR y PCR anidada. El empleo de estas técnicas está restringido a laboratorios especializados o de referencia en el diagnóstico de la toxoplasmosis [32].

3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación del gen B1 fue la primera técnica de PCR desarrollada exitosamente, y más comúnmente empleada, para el diagnóstico de la toxoplasmosis. Actualmente, el gen B1 fue reemplazado por la amplificación de un elemento repetitivo en tándem con función desconocida, con un tamaño de 529 pb, que aumenta la sensibilidad analítica de la técnica [33]. La detección por PCR de *T. gondii* en el líquido amniótico y en la placenta revolucionó el diagnóstico de la TV al permitir la detección temprana de la infección, evitando de esta manera el uso de procedimientos más invasivos sobre el embrión en desarrollo. Por otro lado, la

técnica de PCR sobre muestras del fluido del Humor acuoso y Humor vítreo es de gran ayuda para determinar el diagnóstico en pacientes que presentan lesiones atípicas en la retina [34]. En pacientes inmunocomprometidos bajo sospecha de tener una toxoplasmosis diseminada, la técnica de PCR en muestras de sangre, de orina, del líquido cefalorraquídeo, del lavado broncoalveolar, del fluido peritoneal y en medula ósea es considerado como una importante ayuda en el diagnóstico [34] [32]. La sensibilidad de esta técnica puede verse afectada por el apropiado manejo de la muestra, condiciones de envío y almacenado, además de tratamientos previos con drogas antiparasitarias. Si la contaminación de la muestra no es un inconveniente, se pueden lograr valores de especificidad y sensibilidad del 100% [22].

3.1.2. Aislamiento del parásito

El aislamiento de *T. gondii* de la sangre o de fluidos corporales es un indicador de que el paciente está cursando una infección activa. Es posible el aislamiento de taquizoitos de pacientes en fase aguda de una primoinfección o de una reactivación de la infección en pacientes crónicos. Las técnicas de aislamiento implican la necesidad de trabajar con el parásito vivo, y si bien es de baja sensibilidad, es muy útil para la tipificación del parásito. Este proceso se puede llevar a cabo mediante inoculación de ratones o en cultivos celulares a partir de cualquier muestra de tejido o fluido del paciente; la que la convierte en laboriosa y requiere instalaciones especializadas [22] [32].

3.2. Detección indirecta

El diagnóstico de la infección por *T. gondii* en pacientes inmunocompetentes es llevado a cabo mediante el análisis serológico. Los estudios serológicos son principalmente retrospectivos y se realizan para determinar el estado inmunológico en mujeres embarazadas preferiblemente en las primeras etapas del embarazo, en

pacientes con retinocoroiditis sin historia de infección congénita y en pacientes donadores o receptores de trasplante de órganos [14].

3.2.1. Perfil serológico en pacientes infectados con *T. gondii*

Para poder entender el diagnóstico serológico, es necesario comprender la cinética de los anticuerpos anti- *T. gondii*. En estos pacientes, durante la primera semana post-infección comienzan a detectarse las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgE, alcanzando un máximo en el primer mes y comenzando a disminuir rápidamente a partir de este momento (Figura 1.3.1). En cambio, las IgG específicas comienzan a detectarse durante las primeras 3 semanas post-infección, alcanzando un máximo entre las semanas 6 y 12, a partir del cual comienzan a decaer lentamente estabilizándose en valores medianos o bajos y persisten durante toda la vida del individuo [19]. Las IgA pueden detectarse en pacientes hasta los 7 meses post-infección, mientras que las IgE, si bien se generan dentro de la primera semana, desaparecen rápidamente a los 3 meses post-infección y su detección es un indicador específico de infección reciente [19]. En general, los niveles de IgM disminuyen entre el primer y el sexto mes post-infección, pero en algunos individuos pueden permanecer hasta más de un año por lo cual su detección debe interpretarse de forma cuidadosa [19].

Debido a esto, los ensayos serológicos disponibles utilizados en primera instancia o de tamizaje, principalmente, se basan en la detección de las IgG para determinar si el paciente estuvo o no en contacto con el parásito [14] [19]. La detección de IgG debe realizarse en mujeres embarazadas, ya que la ausencia de las mismas antes o en etapas tempranas del embarazo permite identificar a las mujeres que se encuentran en riesgo de adquirir la infección con el posible peligro de transmisión vertical. La detección de IgM, también, es utilizado en el diagnóstico en este grupo, cuya ventaja principal yace en el hecho de que un resultado negativo descarta una infección reciente [22].

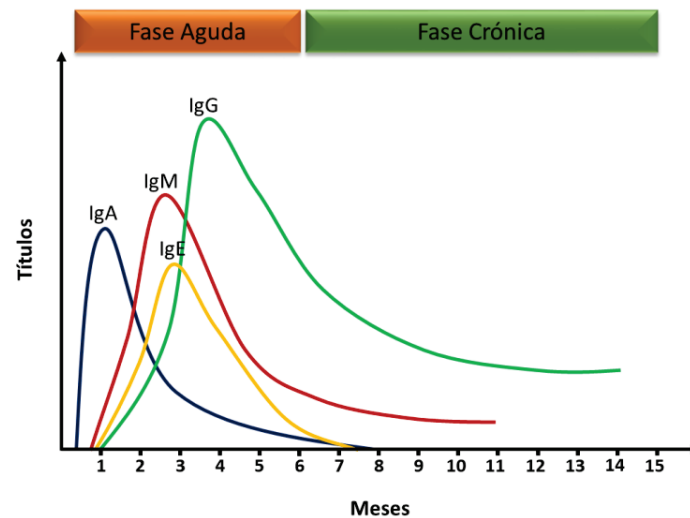


Figura 1.3.1: Cinética de la respuesta humoral en pacientes infectados con *T. gondii*. Se representan los títulos de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgE e IgG) a lo largo de los meses.

Existen numerosas técnicas serológicas para la detección de anticuerpos anti- *T. gondii*. Algunas de ellas están basadas en la detección de anticuerpos contra antígenos de membrana (Sabin-Feldman, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y aglutinación directa), mientras que otras se basan en la detección de anticuerpos contra antígenos citoplasmáticos en ensayos inmunoenzimáticos (conocido por sus siglas en inglés como EIA). A continuación, se detallan las distintas técnicas más empleadas.

3.2.2. Tinción de Sabin-Feldman

El primer ensayo capaz de detectar anticuerpos específicos contra *T. gondii* fue el desarrollado por Albert Sabin y Harry Feldman en 1948, el cual utiliza el azul de metileno como agente de tinción. Este test se basa en la citólisis, mediada por el sistema de complemento, de taquizoitos vivos que se incuban con el suero del paciente. Si en el suero se encuentran anticuerpos específicos contra *T. gondii*, el

parásito será recubierto por éstos y serán lisados por el complemento, lo que se demuestra por la incapacidad de incorporar el azul de metileno y no se observa la tinción. Finalmente, se cuentan los taquizoitos teñidos (vivos) y los taquizoitos no teñidos (muertos) para determinar el título del paciente. Actualmente, esta prueba de tinción sigue en uso en laboratorios especializados, además, se considera como la prueba de referencia con la mayor sensibilidad y especificidad, y se emplea como test confirmatorio para la validación de ensayos comerciales [35].

3.2.3. Inmunofluorescencia Indirecta

La inmunofluorescencia indirecta es uno de los métodos más usados para la detección de anticuerpos contra *T. gondii*. Es una técnica segura ya que utiliza taquizoitos inactivados, es sensible, fácil de llevar a cabo y más económica que la tinción de Sabin-Feldman. Este ensayo se basa en la interacción antígeno-anticuerpo entre el suero del paciente y el parásito. El inmunocomplejo formado se detecta por la adición de un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la utilización de un microscopio de fluorescencia. La interpretación de los resultados implica la observación al microscopio de la fluorescencia periférica de los taquizoitos marcados, siendo esta la principal limitación ya que depende de la subjetividad de la persona que realiza la observación. Esta técnica se ha modificado para poder ser utilizada en la detección de IgM [36].

3.2.4. Pruebas de aglutinación

Existen diferentes tipos de ensayos de aglutinación utilizados en el diagnóstico de la toxoplasmosis. Se basan en la formación de agregados entre partículas suspendidas, que pueden ser taquizoitos inactivados ó antígenos totales, y anticuerpos anti-*T. gondii* presentes en el suero del paciente. Las principales características son que no requieren equipos especiales y no se utilizan anticuerpos

secundarios conjugados. Son simples de llevar a cabo, económicos y los resultados se pueden analizar a simple vista sin la necesidad de emplear un microscopio. Entre ellos tenemos la aglutinación directa (AD), en donde se usan placas de microtitulación recubiertas con taquizoitos fijados con formalina. Se observará aglutinación si el suero del paciente presenta anticuerpos contra *T. gondii*, en caso contrario, los taquizoitos precipitados se encontrarán en el fondo del pocillo. Una modificación de este test es el test de microaglutinación (MAT), que cambia la forma de preparar el antígeno y los tiempos de incubación. En la hemoaglutinación indirecta (HAI), se utilizan glóbulos rojos sensibilizados con antígenos solubles de *T. gondii*, a diferencia de la prueba de LAT que emplea antígenos solubles conjugados con partículas de látex. En ambos casos se observará aglutinación si están presentes anticuerpos específicos en el suero del paciente. Es importante destacar que la HAI no se recomienda para diagnóstico de toxoplasmosis aguda en mujeres embarazadas, ya que su positivización es tardía y, por lo tanto, no detecta en forma temprana la seroconversión. Todos estos ensayos se llevan a cabo para la detección de IgG, a excepción de LAT que también se emplea para la detección de IgM [37] [19].

3.2.5. Ensayos de ELISA

La técnica de ELISA fue introducida por primera vez en 1976 por Alister Voller para el diagnóstico de la toxoplasmosis y, al día de hoy, es considerada una de las pruebas más comunes en la detección cuantitativa de anticuerpos, con la mayor sensibilidad y especificidad. Este ensayo implica una fase sólida, que puede ser un antígeno o anticuerpo, un anticuerpo o antígeno conjugado con una enzima y el sustrato de dicha enzima. Una de las principales ventajas del ELISA, al ser un método automatizado, es la capacidad de analizar una mayor cantidad de muestras al mismo tiempo [38].

Se han desarrollado diferentes tipos de ELISA, siendo el ELISA indirecto y el ELISA sándwich los más comunes. En el ELISA indirecto, se recubre la fase sólida

con el antígeno, se adiciona la muestra con los anticuerpos anti-*T. gondii*, se detecta la reacción antígeno-anticuerpo por el agregado de un anticuerpo secundario conjugado con la enzima y se analiza la reacción por la cuantificación del color formado por la reacción de la enzima con el sustrato. En el ELISA sándwich, a diferencia del ELISA indirecto, se recubre la fase sólida con anticuerpos de captura; el resto de la reacción se realiza de la misma manera. Este ensayo se utiliza más comúnmente para la detección de IgG, IgM e IgA [39] [38].

3.2.6. Ensayo de aglutinación inmunoabsorbente (IAAT)

La técnica IAAT es altamente específica en la detección de anticuerpos IgM, IgA e IgE anti-*T. gondii*. Se basa en la aglutinación de taquizoitos enteros y es el ensayo más sensible comercialmente disponible. El más común de estos ensayos es el ISAGA para la detección de IgM. Esta prueba usa un anticuerpo monoclonal contra el dominio CH2 de la cadena μ humana permitiendo la captura de IgM. La presencia de IgM anti-*T. gondii* se comprueba por la aglutinación de los taquizoitos en la placa. Este ensayo es costoso, requiere un alto grado de experiencia y no es un ensayo automatizado por lo que su uso se encuentra restringido a laboratorios especializados de referencia [40] [41].

3.2.7. Ensayo de avidéz

Este ensayo fue desarrollado por Klaus Hedman y está basado en el incremento de la afinidad funcional (avidéz), entre el anticuerpo IgG anti- *T. gondii* y el antígeno, con el pasar del tiempo a medida que evoluciona la respuesta inmune del organismo [42]. Durante el curso de la respuesta inmune, se produce una maduración de la afinidad del anticuerpo que se incrementa progresivamente por semanas o meses. Este incremento de la afinidad de las IgG es el resultado del proceso de selección de células B dirigido por antígeno, lo que aumenta la complementariedad de los sitios de unión antígeno-anticuerpo. La disociación del

complejo antígeno-anticuerpo, generado por el uso de un agente desnaturalizante (como por ejemplo Urea), refleja la baja avidéz cercana al momento de la infección. Por lo tanto, la avidéz de las IgG es baja en la fase aguda de la infección, lo que la convierte en un indicador confiable de una infección reciente; mientras que una avidéz alta muestra que la infección ocurrió entre 3-5 meses atrás y es un indicador de la fase crónica de la infección por *T. gondii*. Esta técnica es la más usada en el diagnóstico de infección reciente en mujeres embarazadas y está restringida a laboratorios especializados [42] [43] [44].

3.2.8. Proteínas recombinantes

La mayoría de los ensayos serológicos anteriormente mencionados utilizan, como fuente de antígenos, taquizoitos enteros o antígenos solubles obtenidos a partir de la lisis de estos (TLA: de las siglas en inglés tachyzoites lysate antigen). Sin embargo, existen limitaciones que dificultan el desarrollo de estas pruebas, como por ejemplo la dificultad en la estandarización de los ensayos que resulta en una discrepancia en los resultados y la contaminación con materiales no parasíticos debido a la forma de obtención de los taquizoitos. La aplicación de antígenos recombinantes en el diagnóstico de la toxoplasmosis reduce significativamente los tiempos y costos de producción en comparación a los antígenos nativos. Además, puede analizarse de una manera más fácil la antigenicidad de cada uno de estos y, al mismo tiempo, se pueden combinar distintos antígenos recombinantes, lo que facilita la estandarización de estas pruebas ya que se conoce con exactitud los antígenos que las componen. Por lo tanto, el uso de antígenos recombinantes no solo ayuda a mejorar el diagnóstico, sino que, además, si el antígeno seleccionado durante el ciclo de vida del parásito está asociado con la fase aguda o crónica de la infección, mejoraría de manera sustancial el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis principalmente en mujeres embarazadas [44] [37] [39] [45].

4. Epidemiología

Los estudios que permitieron entender los aspectos epidemiológicos de este parásito, como las principales rutas de infección, el huésped definitivo e intermediario y la distribución geográfica solo fueron posibles gracias a la introducción del test Sabin-Feldman, previamente mencionado, que no solo permitió el diagnóstico de la toxoplasmosis en humanos si no que fue una importante herramienta epidemiológica que hizo posible analizar la prevalencia de la infección por *T. gondii* [46].

Como se mencionó previamente, actualmente, entre el 10 y el 70% de la población mundial estuvo expuesta a *T. gondii*. No obstante, la seroprevalencia varía ampliamente entre diferentes países y en diferentes regiones dentro del mismo país. Generalmente, los países de Latinoamérica y del Sudeste de África con climas cálidos y húmedos presentan los mayores valores de seroprevalencia, mientras que valores intermedios se han observado en el centro y sur de Europa y valores más bajos se han reportado en Norteamérica, Norte de Europa, Sudeste asiático, China y Corea [20]. Por otro lado, entender las razones que explican la variabilidad de los valores de prevalencia observados en diferentes áreas geográficas llevó a estudiar cuales son los factores de riesgo que están asociados con la infección por este parásito. Los distintos estudios mostraron con mayor frecuencia que la principal vía de infección era el consumo de carne cruda o mal cocida que contienen quistes tisulares [47]. Además, estudios que documentan la presencia de ooquistes, la forma infectiva ambiental, en diferentes fuentes, como el agua, suelo, vegetales y frutos del mar, se han incrementado y el desarrollo de nuevas técnicas que permiten diferenciar la ruta de infección han demostrado que en algunas poblaciones hay una mayor proporción de infecciones causadas por la ingestión de ooquistes en comparación al consumo de carne, lo que indica la importancia epidemiológica de estos últimos en la infección por *T. gondii* [11].

El primer estudio sobre mujeres embarazadas, realizado en Francia y Austria, dio lugar al inicio de los programas de tamizaje y la implementación de pautas higiénicas para prevenir la infección. Sin embargo, la reglamentación de estos

programas varía entre los distintos países debido a criterios diferentes. Por ejemplo, el programa francés de prevención de la toxoplasmosis establece la obligatoriedad de realizar controles mensuales durante el embarazo. Austria estableció que los controles deben efectuarse cada dos meses, mientras que Bélgica e Italia determinaron la realización del primer estudio al principio del embarazo y controles cada tres meses. Por otro lado, en Dinamarca, Polonia y algunos estados de Estados Unidos se optó por hacer el control directamente al recién nacido, sin los controles previos durante la gestación [19] [47].

4.1. Seguimiento de la mujer embarazada en Argentina

Argentina, al igual que Bélgica e Italia, implementó el diagnóstico trimestral de la toxoplasmosis durante el embarazo. El Ministerio de Salud de la Nación recomienda que toda paciente, que desconozca su estado inmunitario o que posea estudios previos con resultados negativos, debe solicitar el análisis serológico en la primera extracción de sangre. La figura 1.5.1 muestra el algoritmo del seguimiento de la mujer embarazada determinado por el ministerio de salud de la Nación Argentina. El objetivo de este programa de seguimiento es asesorar a las pacientes seronegativas para disminuir el riesgo de adquirir la infección durante la gestación, la detección precoz y tratamiento de las embarazadas con toxoplasmosis aguda [48]. Este programa de seguimiento durante el embarazo, que permiten la detección temprana de la seroconversión, llevó a una disminución en el número de casos de transmisión vertical, reduciendo la mortalidad y morbilidad [47].

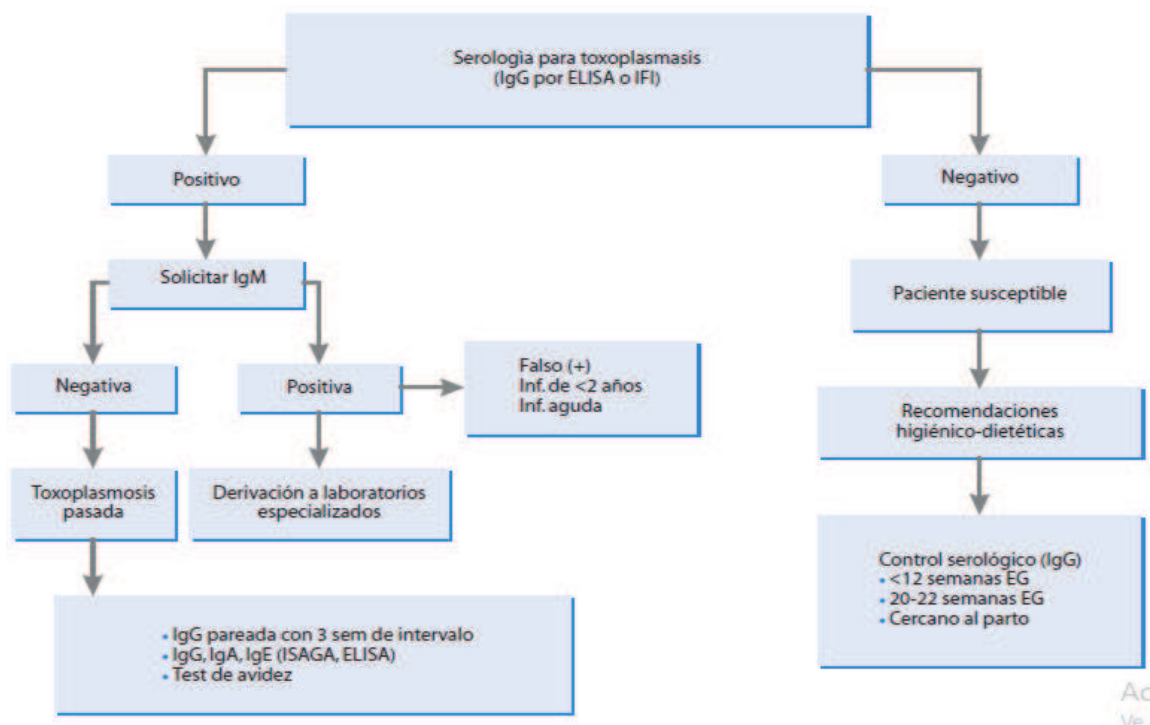


Figura 1.5.1: Algoritmo para el seguimiento de la mujer embarazada. Este esquema de evaluación es implementado por todos los centros de salud de la Nación Argentina para la detección de una seroconversión durante el embarazo y prevención de la transmisión vertical (Fuente: Guía de prevención y tratamiento de las infecciones congénitas y perinatales del Ministerio de Salud [48]).

4.2. Seguimiento en el recién nacido

Con respecto al recién nacido, debido a que más de la mitad de los infectados se presentan asintomáticos al nacer, el Ministerio de Salud de la Nación Argentina determinó la necesidad de implementar un seguimiento, no solo clínico sino también serológico, de los pacientes con diagnóstico presuntivo de TV. En la figura 1.5.2 se muestra el algoritmo para el seguimiento del recién nacido. Los pacientes que al nacer presentan síntomas compatibles con TV, deben comenzar un tratamiento con Pirimetamina, Sulfadiazina y ácido fólico durante su primer año de vida. Luego del

sexto mes de tratamiento, puede optarse por administrar Pirimetamina a la misma dosis semanal, pero administrada tres veces por semana. La Sulfadiazina debe continuar en dos tomas diarias hasta completar la totalidad del tratamiento. Los pacientes que presenten además coriorretinitis en actividad o compromiso del sistema nervioso central, deben recibir Metilprednisona. El monitoreo de los efectos adversos se realiza con hemogramas semanales, durante todo el tratamiento. En los casos donde se confirme infección fetal con PCR positiva en muestras del líquido amniótico, las pacientes deben recibir tratamiento con pirimetamina + sulfadiazina + ácido fólico, así como sus hijos, desde el nacimiento, hasta que, en el seguimiento serológico durante el primer año de vida, se confirme o se descarte la transmisión vertical [48].

La evaluación clínica y serológica implica un examen físico y fondo de ojos al nacer, acompañado de imágenes cerebrales (ecografías o radiografías craneales). A las dos semanas debe realizarse un diagnóstico serológico en muestras apareadas madre/hijo para determinar presencia de IgG e IgM. Finalmente, al mes de vida debe realizarse un nuevo fondo de ojos [48].

El seguimiento se realiza durante el primer año de vida del paciente. Si el examen físico y el fondo de ojo son normales, además de un análisis de IgM negativo, debe analizarse la presencia de IgG cada tres meses hasta los nueve meses de vida. En el caso de que al noveno mes las IgG den negativas, se descarta una TV, mientras que si las IgG dan positivas se repite el fondo de ojos y se inicia el tratamiento [48].

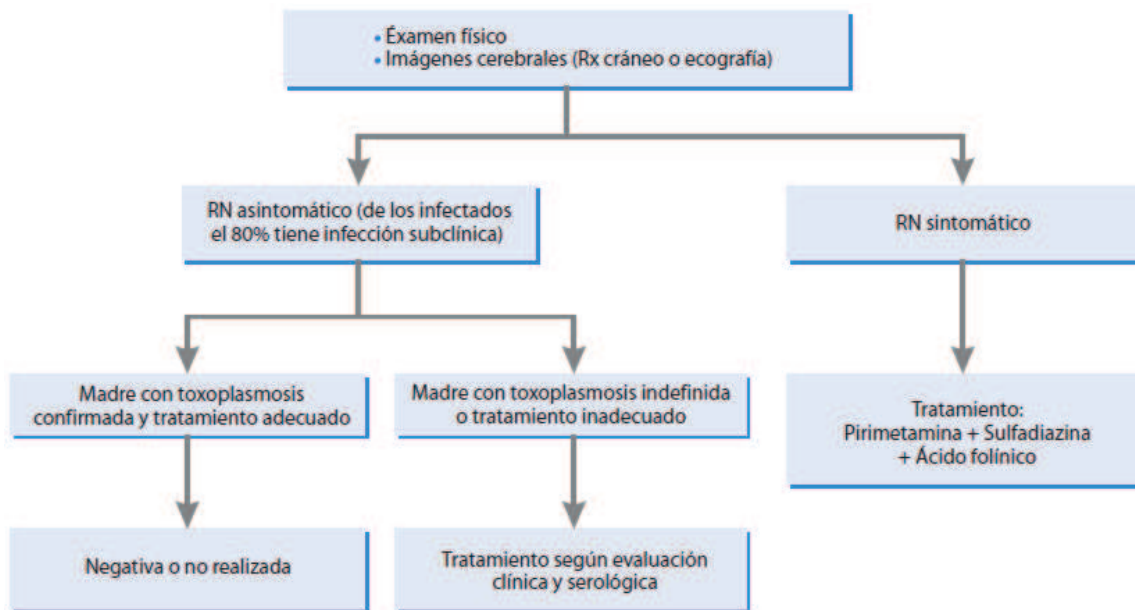


Figura 1.5.2: Algoritmo para el seguimiento del recién nacido. Este esquema de evaluación clínica y serológica es empleado en centros de salud especializados para el diagnóstico de la Toxoplasmosis congénita (Fuente: Guía de prevención y tratamiento de las infecciones congénitas y perinatales del Ministerio de Salud [48]).

Objetivos

General:

Determinar la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en mujeres embarazadas en la ciudad de Chascomús y su asociación con los hábitos de la población. Al mismo tiempo, se propuso identificar nuevos antígenos recombinantes con valor antigénico para el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis de forma tal de poder ampliar la batería de antígenos capaces de detectar IgG de fase aguda para el desarrollo de un sistema de diagnóstico alternativo de uso en centros de salud.

Específicos:

- Recopilar datos estadísticos de seroprevalencia en mujeres embarazadas del Hospital Municipal San Vicente de Paul, Chascomús, Provincia de Buenos Aires, correspondientes a los años 2014, 2015, 2016 y 2017.
- Establecer posibles factores de riesgo asociados a la infección por *T. gondii* mediante una encuesta a mujeres embarazadas entre abril del 2016 y diciembre del 2017.
- Expresar y purificar proteínas recombinantes de *Toxoplasma gondii* en *Escherichia coli*.
- Analizar la capacidad antigénica de estos antígenos mediante la técnica IgG-ELISA.

Capítulo 2

*Seroprevalencia de anticuerpos
anti-T. gondii
en la ciudad de Chascomús*

1.1. Introducción

Como se mencionó anteriormente, la seroprevalencia de *T. gondii* a nivel mundial se encuentra entre 10-70% y este amplio rango de valores se deben a la región analizada, las diferencias climáticas, las condiciones socioeconómicas, los hábitos alimenticios e higiénicos y a la susceptibilidad del huésped. Todos estos factores pueden explicar la razón por la que los valores de prevalencia sean diferentes entre distintos países y en distintas regiones dentro del mismo país [20].

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en distintas regiones mostraron valores de prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en mujeres embarazadas que varían entre 8,2-57,6% en Europa, 0,8-63,9% en Asia y Oceanía, 6,1-11% en Norteamérica y 25,3-75,2 en África [49]. En Sudamérica, la seroprevalencia llega a ser mayor que la observada en otras regiones y esto puede ser debido a la presencia de un clima cálido que favorece la presencia del parásito, sumado a otros factores socio-demográficos [49]. La seroprevalencia en mujeres embarazadas en Venezuela se encuentra entre 31,8-61% [50], en Colombia 47-63% [49], en Ecuador 18,8-73%, en Brasil 49,5-77,5% [51], en Perú 35,8% [52]. Paraguay presenta una prevalencia del 63% en mujeres en edad reproductiva [53]. Chile no presenta datos de seroprevalencia en mujeres embarazadas, sin embargo, en un estudio llevado a cabo en 2016 en el sur del país se observó una prevalencia del 55% en la población general [54].

Con respecto a Argentina, si bien es un país con un fuerte componente rural, los principales estudios para determinar la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* se llevaron a cabo en poblaciones asociadas a grandes ciudades, principalmente en CABA. En un estudio publicado en 2013 por el Hospital Alemán de esta ciudad, en donde se analizaron un total de 12.035 mujeres embarazadas, se observó una seroprevalencia del 18,33%, con una tasa de infección toxoplásmica en mujeres embarazadas susceptibles de 3,78 por mil y una tasa de infección congénita con aplicación del programa de prevención del 0,2 por mil nacimientos [55]. Más recientemente, en un trabajo realizado en 3 hospitales de CABA y en 4 hospitales

del Gran Buenos Aires se observó una seroprevalencia en mujeres embarazadas de entre 16,8-33,7% y de 38,9-51,1%, respectivamente [56].

En relación a los diferentes aspectos relacionados con la infección, se ha demostrado que el riesgo de contraer la infección aumenta cuando las condiciones socio-económicas son desfavorables [57] [58] [59] [60] [61]. Sin embargo, en algunos casos se ha verificado que un alto status socio-económico coincide con un mayor consumo de carne poco cocida correlacionado con una mayor seroprevalencia [62]. Por otro lado, vivir en un área rural o realizar trabajos de granja también están asociados con una mayor prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* [63] [64] [65]. Aunque existen algunos estudios que comparan los niveles de seroprevalencia entre ambientes urbanos y rurales, son pocos los estudios que analizan la incidencia de la toxoplasmosis entre zonas urbanas y periurbanas en una misma ciudad. En un trabajo realizado en Aracaju, Brasil, se encontraron altos valores de seroprevalencia en mujeres que habitan las regiones periurbanas, lo que coincidía en ese caso con una situación socio-económica desfavorable [65].

Con el objetivo de estimar la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* en un área rural, se analizó la seroprevalencia en mujeres embarazadas en la ciudad de Chascomús, que se caracteriza por ser una región con una fuerte asociación con la actividad rural. A su vez, debido al hecho de que hay importantes diferencias en el desarrollo urbano de la ciudad, se investigó la existencia de una asociación entre la seroprevalencia y las áreas menos desarrolladas de la ciudad (región periurbana). Además, se analizaron múltiples factores de riesgo que podrían estar asociados con la infección por *T. gondii* para determinar posibles rutas de infección.

2.2. Resultados y discusión

2.2.1. Prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii*

En el periodo de tiempo analizado (abril 2014 – diciembre 2017), 1.182 mujeres dieron a luz en el Hospital Municipal San Vicente de Paul, Chascomús, Provincia de Buenos Aires; 86 dieron a luz más de una vez en este periodo y se consideró el resultado del último análisis serológico que se le realizaron (no se observó una seroconversión en individuos seronegativos) y 176 pacientes no presentaron datos de serología. Por lo tanto, se colectaron datos de 920 mujeres embarazadas (77.8%), con un rango de edad entre 13 y 44 años, y una media de $25,10 \pm 6,1$ años. De esas 920 pacientes, 320 presentaron serología positiva para anticuerpos IgG (Tabla 2.1). Ninguna de las 320 pacientes presentó serología positiva para anticuerpos IgM, lo que indica un perfil de infección crónica.

Variable	No. Participantes	IgG + (%)	RP (IC 95%)
Edad (años)			
< 19	169	54 (31,9)	1
20 – 34	671	231 (34,4)	1,08 (0,84 – 1,37)
> 34	80	35 (43,8)	1,37 (0,98 – 1,91)

Tabla 2. 1: Asociación entre la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en mujeres embarazadas y la edad. El análisis se realizó entre abril del 2014 y diciembre del 2017. **RP:** razón de prevalencia. **IC 95%:** intervalo de confianza del 95%.

La prevalencia observada de anticuerpos anti-*T. gondii* en mujeres embarazadas en la ciudad de Chascomús fue del 34.8% (320/920) (IC 95%: 31.7 - 37.9). Este valor de prevalencia es mayor al 18,33% obtenido por Carral *et al.* (2013) y al 16,8-33,7% observado por Messina *et al.* (2019) en CABA [55] [56]. Sin embargo, es inferior a los valores de entre 38,9-51,1% encontrados en el Gran

Buenos Aires por Messina *et al.* (2019) [56]. Las diferencias posiblemente sean debidas a la diferente exposición a los factores de riesgo en las poblaciones estudiadas.

2.2.2. Factores de Riesgo analizados

Como se mencionó anteriormente, las principales vías de transmisión horizontal de *T. gondii* en humanos se deben a la ingestión de quistes tisulares en carne cruda o mal cocida, además, del consumo de agua o verduras mal lavadas con la presencia de ooquistes derivados del ambiente, el contacto directo con estos cuando se realizan trabajos de jardinería y, en menor frecuencia, directamente de las heces felinas [14]. En la presente tesis, se analizaron diversos factores de riesgo con el objetivo de poder identificar posibles fuentes de infección con este parásito. Estos factores son: actividad (urbana, urbana/rural y rural), fuente de agua en el hogar, cría de animales, presencia de gatos como mascotas, realización de trabajos de jardinería y consumo de carnes (cerdo, ovejas y embutidos) con su frecuencia (consumo semanal) (Tabla 2.2 y 2.3).

Diversos autores han encontrado una asociación entre la infección con *T. gondii* y vivir en áreas rurales o cerca de éstas [66] [63]. Por este motivo, al ser Chascomús una ciudad con un fuerte componente rural, se decidió analizar si existe una asociación significativa con la infección por este parásito. No obstante, en la ciudad de Chascomús solo una parte de los individuos están vinculados a actividades rurales, independientemente de la zona donde viven, y se pudo observar que la seroprevalencia entre individuos con actividades rurales no difiere significativamente en comparación con aquellos que no tienen ninguna relación con este tipo de actividades. El análisis de otros factores como fuente de agua en el hogar (agua potable o de pozo), cría de animales, presencia de gatos como mascotas y realización de trabajos de jardinería no mostraron una asociación significativa con la infección por *T. gondii* (Tabla 2.2). Esto concuerda con distintos estudios en los cuales la presencia de gatos y el trabajo de jardinería no están asociados con la infección por este parásito [60] [64]. En este estudio tampoco se

encontró una asociación con la fuente de agua en el hogar. Cabe destacar, que los hogares con agua de pozo, con un alto contenido salino, usualmente consumen agua comercial embotellada, lo que podría estar explicando el resultado observado. Por otro lado, aunque la edad de las mujeres embarazadas no mostró una asociación significativa con la infección, resultado llamativo que mujeres embarazadas con una edad mayor a 34 años presentaron los mayores valores de seroprevalencia (43,2%) (Tabla 2.1).

Factor de Riesgo	No. Participantes	IgG + (%)	RP (IC 95%)
Actividad			
Urbana	261	82 (31,4)	1
Urbana/Rural	57	17 (29,8)	0,95 (0,61 – 1,47)
Rural	8	4 (0,5)	1,59 (0,78 – 3,26)
Fuente de agua			
Pozo	92	32 (34,8)	1
Red	195	55 (28,2)	1,23 (0,86 – 1,76)
Cría de animales			
Si	82	29 (35,4)	1
No	223	67 (30,0)	1,18 (0,83 – 1,68)
Presencia de gato			
Si	84	23 (27,4)	1
No	230	77 (33,5)	0,82 (0,55 – 1,21)
Jardinería			
Si	34	11 (32,4)	1
No	287	92 (32,1)	1,01 (0,60 – 1,69)

Tabla 2. 2: Asociación entre la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en mujeres embarazadas de la ciudad de Chascomús y los distintos factores de riesgo analizados en este trabajo. El análisis se realizó entre abril del 2016 y diciembre del 2017. **RP:** razón de prevalencia. **IC 95%:** intervalo de confianza del 95%.

Por último, considerando que Argentina es un país con un alto consumo de carne, especialmente carne bovina, y teniendo en cuenta que hubo un aumento en el consumo de carne porcina y ovina, se estudió la ingesta de estos tipos de carnes y su frecuencia como potencial factor de riesgo (Tabla 2.3). Los resultados obtenidos no mostraron una asociación significativa entre el consumo de carnes porcinas y ovinas con la infección por *T. gondii*. En general, en Chascomús, como en otras zonas, la carne se consume bien cocida, lo que podría estar explicando la falta de asociación entre los distintos tipos de carne.

Factor de Riesgo	No. Participantes	IgG + (%)	RP (IC 95%)
Cerdo			
No	108	30 (27,8)	1
Una y menos de una vez por semana	187	58 (31,0)	1,12 (0,77 – 1,62)
Más de una vez	32	14 (43,8)	1,58 (0,96 – 2,59)
Oveja			
No	139	41 (29,5)	1
Una y menos de una vez por semana	160	50 (31,2)	1,06 (0,75 – 1,50)
Más de una vez	29	11 (37,9)	1,29 (0,76 – 2,19)
Embutidos			
No	57	22 (38,6)	1
Una y menos de una vez por semana	211	55 (26,1)	0,68 (0,45 – 1,01)
Más de una vez	59	24 (40,7)	1,05 (0,67 – 1,65)

Tabla 2. 3: Asociación entre la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* en mujeres embarazadas de la ciudad de Chascomús y el consumo de tres tipos distintos de carne y su frecuencia. El análisis se realizó entre abril del 2016 y diciembre del 2017. **RP:** razón de prevalencia. **IC 95%:** intervalo de confianza del 95%.

2.2.3. Distribución

De las 920 mujeres embarazadas con datos de serología, se obtuvieron las coordenadas geográficas de los hogares de 769 (83,6%) de estas pacientes, de acuerdo a la dirección declarada en sus historias clínicas. Mediante la utilización del software de libre acceso QGIS 3.2.1 se pudieron localizar en la ciudad y determinar su distribución en dos áreas principales: Urbana y Peri-urbana. De esta forma, 157 han declarado sus hogares en el área urbana (promedio de edad de $25,81 \pm 6,01$ años) y 612 en el área peri-urbana (promedio de edad $25,18 \pm 6,15$ años) (Figura 2.1). La prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* observado en las áreas urbanas y peri-urbanas es de 26,8% (CI 95%: 19,8 – 33,7) y 36,4% (CI 95%: 32,6 – 40,3), respectivamente. Además, esta diferencia es estadísticamente significativa ($p = 0,023$).

Una gran parte de la población está concentrada en el área urbana de la ciudad en relación al total de la población. En esta zona, existe una muy baja disponibilidad de terrenos deshabitados y es el área más desarrollada de la ciudad ya que posee una mayor cobertura en servicios básicos, como por ejemplo acceso al agua potable, gas natural y servicio de cloacas. En el área peri-urbana, a medida que nos alejamos del centro hacia la periferia, este desarrollo es menos evidente debido a que hay zonas sin acceso al gas natural, servicio de cloacas y solo una pequeña proporción tiene acceso al agua potable. Al mismo tiempo, hay una mayor presencia de terrenos deshabitados y espacios verdes que se pueden observar como parches verdes entre las casas (Figura 2.1).

A pesar de que son necesarios estudios adicionales para evaluar las razones de estas diferencias encontradas, se pueden citar dos posibles causas basadas en la literatura: diferencias en los niveles socio-económicos entre las áreas urbana y peri-urbana, y al hecho de que los gatos en la zona peri-urbana tienen un mayor acceso a la depredación de roedores que en la zona urbana [65] [67]. Se requieren más estudios para revelar si estas son las causas de las diferencias en los valores de seroprevalencia observados en Chascomús.

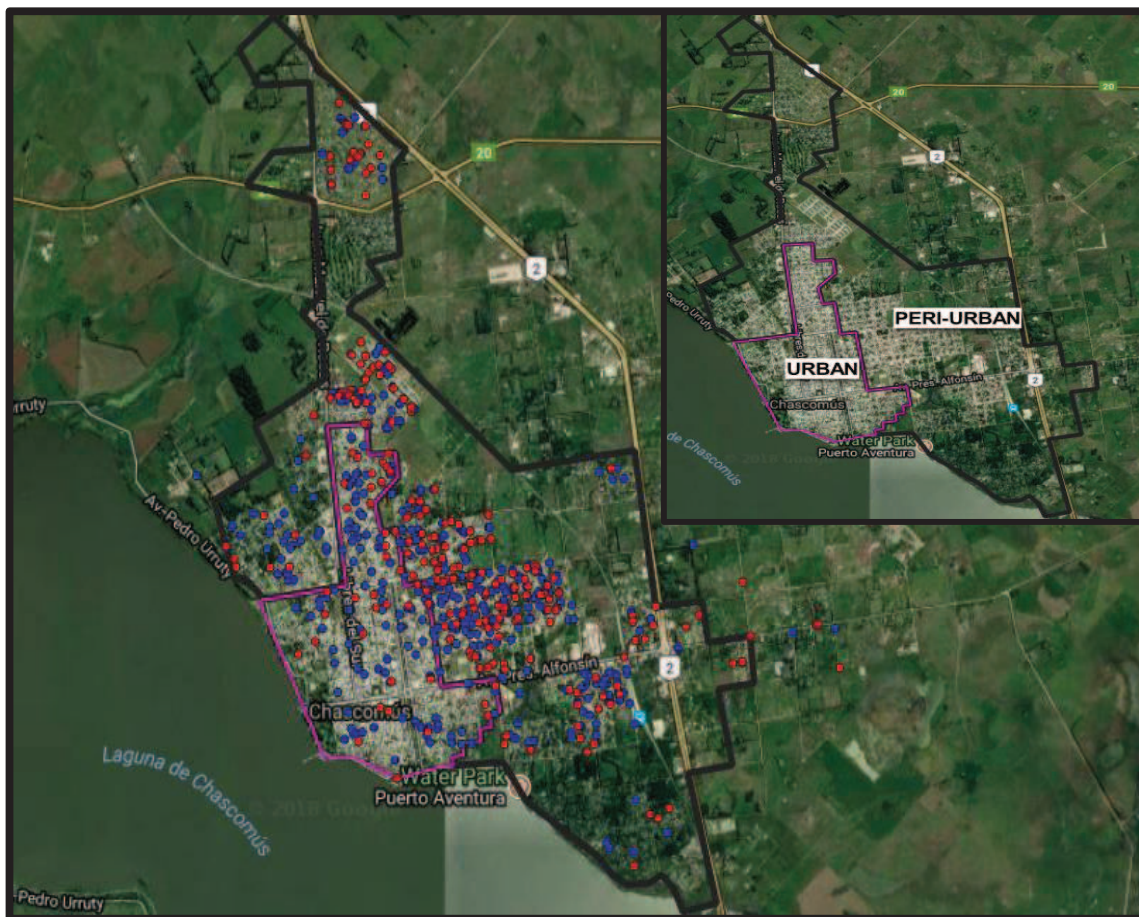


Figura 2.1: Distribución de mujeres embarazadas en zona urbana y peri-urbana de la ciudad de Chascomús. En rojo: mujeres embarazadas con serología (IgG) positiva para *T. gondii*. En azul: mujeres embarazadas con serología (IgG) negativa para *T. gondii*. En la esquina superior derecha se muestra el mapa de la ciudad de Chascomús con las dos áreas principales.

2.3. Conclusiones

La seroprevalencia se la puede definir como la exposición acumulada, durante la vida de una persona, a un patógeno en un entorno social particular. Por lo tanto, se puede tratar a la prevalencia de anticuerpos anti- *T. gondii* como una medida cuantitativa de la relativa protección que posee una mujer de esa población de contraer la primoinfección durante el embarazo [49]. En entornos con baja seroprevalencia en la población general, el riesgo potencial para que una mujer en particular se infecte con el parásito es en consecuencia baja, pero si se infecta durante el embarazo es muy probable que coincida con su primera infección, lo que implica una posible transmisión vertical con el riesgo que esto representa para el embrión en desarrollo. Por otro lado, en lugares con una alta seroprevalencia en la población, la probabilidad para una mujer en particular de adquirir la primoinfección en el embarazo son bajas debido a que ya habría estado expuesta al parásito, en caso de serología positiva previo al embarazo se considera a la paciente protegida de una posible reinfección [49] [68]. Sin embargo, si no estuvo en contacto con el parásito hasta la edad reproductiva, las chances de adquirir una primoinfección durante el embarazo son altas [49].

Por este motivo, en el presente trabajo se buscó conocer la situación de la infección toxoplásmica en la ciudad de Chascomús y los resultados obtenidos muestran una mayor prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* (IgG) en mujeres embarazadas que la observada en CABA, pero menor a lo obtenido en el conurbano. Si bien estos son valores intermedios, es importante el seguimiento no solo a la mujer embarazada, sino también a la mujer en edad reproductiva, porque en caso de serología negativa la paciente es considerada de riesgo, por lo cual debe ser informada acerca de las pautas higiénico-sanitarias de prevención y regularmente testeada para la detección de anticuerpos anti- *T. gondii*.

Además, se intentó determinar las posibles causas que podrían estar asociadas a la infección por *T. gondii*. En primera instancia se analizó la posible asociación con la actividad rural en Chascomús; sin embargo, no se pudo determinar que la realización de actividades rurales sea una posible ruta de

infección. Por otra parte, no se observó una asociación significativa entre la infección por *T. gondii* y el consumo de carne, la presencia de gatos como mascotas y la realización de trabajos de jardinería, similar a lo observado por Kaufer *et al.* (2017) en CABA y provincia de Buenos Aires [58] [19]. En general, ninguno de los factores de riesgo analizados en este trabajo mostró una asociación con la infección por *T. gondii*. Cabe destacar que mientras el gato como mascota suele estar bien cuidado y alimentarse con alimento balanceado, los gatos de zonas periurbanas o rurales deambulan entre las casas, en ocasiones no considerándose mascotas propias, y suelen cazar roedores y aves, incrementando la posibilidad del que parásito complete su ciclo sexual llevando a una mayor presencia de ooquistes en el ambiente [69] [70].

En los últimos años la seroprevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* ha disminuido a nivel mundial. En Buenos Aires, en un lapso de 50 años, se observó una disminución de la seroprevalencia de un 67% a 21,2% en hemodonantes de ambos sexos, lo que implica una disminución promedio de 0,91% anual [58]. Las posibles causas de este descenso pueden ser: una mejora en la manipulación de los alimentos, a nivel individual e industrial, con una mayor congelación de los mismos, además de cambios en los hábitos alimentarios y mayor higiene personal debido a una mejor comunicación acerca de la toxoplasmosis [68]. Esto concuerda con lo observado por Kaufer *et al.* (2017) donde no se encontró una asociación significativa entre el consumo de carne y la infección con este parásito, al igual que lo demostrado en la presente tesis. Sin embargo, estos autores demostraron que la falta de estudios secundarios, la carencia de agua corriente y habitar en las zonas oeste o sur de la Provincia de Buenos Aires están asociados con la infección [58] [19]. En este contexto, más estudios se necesitan para poder determinar cuáles son las rutas de infección en la ciudad de Chascomús y poder implementar mejores métodos de prevención.

Interesantemente, en la presente tesis se observó una mayor prevalencia de la infección por *T. gondii* en las zonas peri-urbanas en comparación con las áreas más desarrolla del centro de la ciudad. Estos resultados sugieren que los ambientes

menos desarrollados en la periferia deberían ser un factor a tener en cuenta en los centros de salud para el seguimiento de la mujer embarazada. Dado que existen pocos estudios que comparan las zonas urbanas y peri-urbanas de la misma ciudad, los resultados obtenidos en este estudio podrían promover estudios similares en otras regiones. Finalmente, alentamos la generación de pautas sanitarias para prevenir la transmisión de *T. gondii* en estos ambientes y establecer protocolos que permitan monitorear la situación.

2.4. Materiales y Métodos

2.4.1. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en la ciudad de Chascomús ((35° 34' 30'' S, 58° 0' 32'' O) localizada en la Provincia de Buenos Aires, a 123 km de CABA. La población total es de 42.277 habitantes de los cuales 21.570 son mujeres [71]. Cuenta con una superficie de 4163,19 km², con una altitud de 10 m sobre el nivel del mar, con suelos bajos típicos de la región, especialmente adecuado para la ganadería extensiva. El clima es templado húmedo a subhúmedo, con una temperatura media de 16°C, siendo el promedio en verano de 23°C y en invierno de 9°C [72]. Solo el 76,9% de los hogares tiene acceso a agua potable, 55,9% con servicio de cloacas y 44,5% gas natural. La principal actividad económica es la industria manufacturera, con el 40,1% del total, del cual el 8,4% es representado por la agricultura, ganadería y silvicultura, donde la cría ovina alcanza el 1,14% del total de la provincia; el resto está representado por la administración pública, comercio, construcción, turismo, transporte y comunicaciones. En cuanto a la cobertura de salud, Chascomús tiene un hospital público, Hospital Municipal San Vicente de Paul, seis centros de atención primaria distribuidos en la ciudad dependientes del hospital y una clínica privada [73].

2.4.2. Estudio de Prevalencia

Se realizó un estudio retrospectivo en el área de estadística del Hospital Municipal San Vicente de Paul. El criterio de inclusión utilizado fue de considerar a todas las mujeres embarazadas que llevaron a cabo sus controles prenatales en el Hospital Municipal San Vicente de Paul, de acuerdo a las normas de control prenatal establecidas por el Ministerio de Salud de la República Argentina y de la Provincia de Buenos Aires para la prevención de la toxoplasmosis congénita y dieron a luz en dicho hospital entre abril del 2014 y diciembre del 2017. Los ensayos serológicos

para la detección de anticuerpos anti-*T. gondii* incluyen la HAI (HAI; Wiener Lab. Group, Argentina) para IgG y el inmunoensayo fluorescente (ELFIA; Biomerieux, France) para la detección de IgM, en aquellos pacientes que dieron positivos para IgG. Ambos ensayos serológicos se encuentran comercialmente disponibles y se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante y son parte de los test de rutina del laboratorio clínico del hospital. Es importante destacar, que el ensayo IgG-HAI es adecuado para el screening masivo en estudios epidemiológicos [74] [75].

2.4.3. Factores de riesgo

Un cuestionario a modo de encuesta fue completado por mujeres embarazadas entre abril del 2016 y diciembre del 2017, para analizar posibles factores de riesgo asociados a la infección por *T. gondii*. Los factores estudiados fueron: Actividad (urbana, urbana/rural o rural), fuente de agua en el hogar (Potable o Pozo), cría de animales, presencia de gatos como mascotas, trabajos de jardinería y consumo de carne y sus frecuencias (Cerdo, Oveja y Embutidos) (Ver ficha en Anexo: Tabla 5.1)

2.4.4. Distribución geográfica

Se obtuvieron las coordenadas geográficas de los hogares de las mujeres embarazadas que participaron en el estudio para determinar su distribución en la ciudad. Además, se dividió la ciudad en dos áreas principales: urbana (más desarrollada, que cuenta con todos los servicios públicos y está completamente habitada) y peri-urbana (menos desarrollada, en donde faltan algunos servicios públicos, está parcialmente habitada y cuenta con la presencia de terrenos vacíos), de acuerdo a Tauber (1993) [76], usando el software de libre acceso QGIS 3.2.1.

2.4.5. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados mediante el uso de Epi Info 7.2.2.6 y Epidat 3.1. Se calcularon la razón de prevalencia (RP) y el intervalo de confianza del 95% (IC 95%) para evaluar la posible asociación entre las variables. Se utilizó la prueba de Chi-Cuadrado para evaluar una asociación significativa entre los valores de prevalencia de anticuerpos anti-*T. gondii* observados en las áreas urbanas y peri-urbanas. Un valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

2.4.6. Consideraciones éticas

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética (FEMEBA Nota Nro. 502, 23sep 2014) y cada individuo firmó un consentimiento informado para el uso de los datos con fines de investigación.

Capítulo 3

Antígenos recombinantes

3.1. Introducción

El diagnóstico de la toxoplasmosis, en individuos inmunocompetentes, se basa principalmente en el análisis del perfil serológico del paciente. Además, en las gestantes no solo se debe establecer si la paciente estuvo o no en contacto con el parásito, sino que se debe determinar también si se encuentra en la fase aguda o crónica de la infección, ya que es en la fase aguda donde el parásito puede atravesar la placenta e infectar al embrión (ver figura 1.5.1). En esta fase el parásito está diferenciado en el estadio de taquizoito, que se divide rápidamente y es el causante de las manifestaciones clínicas que se pueden presentar en el paciente [77] [19].

Durante la fase aguda de la infección, la invasión de la célula hospedera es un evento crucial para la supervivencia del parásito, como así también, la división asexual. Este evento involucra principalmente tres organelas: Micronemas, Roptrias y Gránulos densos, que forman parte del sistema excretor/secretor (ESA) del parásito [78]. A su vez, las Roptrias forman dos subestructuras denominadas ROP (Rhoptry bulb) y RON (Rhoptry neck). Estas organelas secretan proteínas denominadas MICs, ROPs, RONs y GRAs. Las proteínas MICs juegan un papel importante en la adhesión a la célula hospedera debido al reconocimiento y unión a receptores específicos. Inmediatamente después de la adhesión del parásito a la membrana de la célula hospedera, libera las proteínas de las Roptrias. Las RONs forman junto con las MICs la MJ (*Mobil Junction*), que le permite al parásito reorientarse para invadir la célula [79]. Las ROPs (muchas de las cuales tienen actividad enzimática) inducen la formación de la vacuola endocítica. Por último, el taquizoito rápidamente inicia la secreción de proteínas GRAs al interior del espacio intravacuolar, transformando la vacuola endocítica en la VP. Algunas de estas proteínas se encuentran en la membrana de la VP y otras incluso se inyectan al citoplasma de la célula hospedera, permitiéndole al parásito tomar nutrientes del citoplasma de la célula hospedera, alterar la expresión génica de la misma y preparar a la VP para la reproducción asexual [80].

En un estudio llevado a cabo por Roiko *et al.* (2017), en donde analizaron la reactividad de sueros de pacientes infectados con *T. gondii* contra taquizoitos intracelulares, observaron distintos patrones de inmunomarcación sugiriendo que los pacientes infectados producen anticuerpos contra diversos antígenos del parásito. Si bien la mayoría de los sueros analizados en este trabajo mostraron un patrón de tinción similar al de SAG1 (del inglés: Surface antigen 1), el antígeno más abundante en la superficie del parásito, un determinado grupo de sueros también mostraron un patrón de tinción adicional que incluyen la membrana de la VP (MVP) y estructuras dentro de la VP [81]. Esto indica que los anticuerpos presentes en el suero de los pacientes infectados no solo reaccionan con los antígenos de la superficie del parásito, sino que también reaccionarían con antígenos de la red intravacuolar (RVP) y de la MVP ya que estos probablemente queden expuestos al sistema inmune luego de la lisis de la célula hospedera [81].

Por lo mencionado anteriormente, en la presente tesis nos propusimos clonar, expresar y purificar diversas proteínas, que forman parte del sistema ESA, para ampliar el panel de antígenos disponibles para el diagnóstico de la toxoplasmosis aguda; ya que trabajar con proteínas recombinantes permitiría desarrollar un diagnóstico rápido, económico y fácil de usar. Algunos de los antígenos evaluados aquí como GRA8 (P35) o MIC1 ya habían sido estudiados, pero otros como r200360, r310790 y r313640 nunca habían sido caracterizados ni estudiados en su valor antigénico. Involucrar nuevos antígenos recombinantes tiene como finalidad aumentar la batería de antígenos útiles para el diagnóstico de la toxoplasmosis aguda y desarrollar un ensayo que permita mejorar el seguimiento de la mujer durante el embarazo.

3.2. Resultados y discusión

3.2.1. Selección de las proteínas recombinantes

A la hora de seleccionar un antígeno para el desarrollo de un ensayo serológico aplicado al diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis, es necesario focalizarse en aquellos antígenos que juegan un rol importante en la patogénesis [82]. Las proteínas MICs son adhesinas que ayudan al parásito a adherirse a la membrana plasmática de la célula hospedera, mientras que la ROPs son secretadas al citoplasma de la célula hospedera y colaboran en la formación de la VP. Una vez que el parásito se encuentra dentro de la VP, la GRAs son liberadas en el interior de la misma y modifican la membrana vacuolar [82]. Todos estos efectores forman parte del sistema ESA del parásito y constituyen la mayor cantidad de antígenos circulantes en el suero de pacientes con infección aguda. Además, algunos de estos efectores han demostrado ser altamente antigénicos [83]. En un estudio llevado por Felgner *et al.* (2015), mediante un ensayo de microarray de proteínas para identificar antígenos con capacidad diagnóstica, demostraron que la mayor cantidad de proteínas reconocidas por los sueros provenían de gránulos densos y en menor medida de Micronemas y Roptrias [84].

Debido a esto, se seleccionaron para este trabajo proteínas como rGra4, rGra7, rGra8 y rGra17, que son 4 proteínas bien caracterizadas. Estas proteínas son secretadas por el parásito al interior de la VP luego de la invasión a la célula hospedera junto con otras proteínas de gránulos densos y cuyas funciones están más bien asociadas a la modificación de la VP [85]. Gra4 se encuentra distribuida en el lumen de la VP y posteriormente se asocia con la RVP, y se encuentra dispersa por toda la vacuola [86]. Por otra parte, Gra7 forma una asociación estable con la RVP y posteriormente con la membrana de la VP, además de estar presente en extensiones que sobresalen hacia el citoplasma de la célula [87]. Gra8 además de estar asociada con MVP, también es un componente del citoesqueleto de *T. gondii*

donde es probable que participe en el mantenimiento de la organización de los microtúbulos y, a través de la interacción con proteínas asociadas a glideosomas, podría participar en la extrusión del conoide y en la invasión y egreso de la célula hospedera [88] [89]. Por último, Gra17 es una proteína secretada que, junto con Gra23, regula el paso de pequeñas moléculas entre el citoplasma de la célula hospedera y el interior de la VP, una característica importante para la virulencia de parásito [90] [91].

Conjuntamente, se sumaron al estudio otras tres proteínas de gránulos densos, las cuales son r310790, r200360 y r313640, como posibles nuevos marcadores de infección aguda que, a diferencia de las mencionadas anteriormente, no han sido totalmente caracterizadas por lo cual no se conocen completamente su función [92]. Sin embargo, se ha podido determinar en un estudio de localización masiva de proteínas de citoesqueleto de *T. gondii* que r200360 y r310790 se encontrarían distribuidas en el lumen de la VP [93]. A su vez, en un estudio bioinformático llevado a cabo por Alonso *et al.* (2019), en el cual se agrupan las proteínas de *T. gondii* de acuerdo a su función, se identificó a r200360 dentro del grupo de antígenos que participan en la patogenicidad del parásito y podrían ser nuevos determinantes patogénicos. A este grupo también pertenecen antígenos como Gra4 y Gra8 [94].

Por otro lado, se incorporó al estudio una proteína de micronemas, denominada rMic1, la cual es un antígeno soluble secretado sobre la superficie del parásito y se ha demostrado que tiene un rol importante en la unión del mismo a la célula hospedera [95] [96]. También, se analizó rRop2, un antígeno de Roptrias que se inserta en la MVP, se expone al citosol y estaría mediando en la estrecha asociación que ocurre entre la MPV y la mitocondria de la célula hospedera [97].

Finalmente, con el propósito de analizar si la combinación de distintas proteínas podría aumentar la sensibilidad del método diagnóstico, se analizaron dos proteínas quiméricas, las cuales son rGra4-Gra7 y rRop2-Gra4. Todos estos antígenos se encuentran resumidos en la Figura 3.2.1.

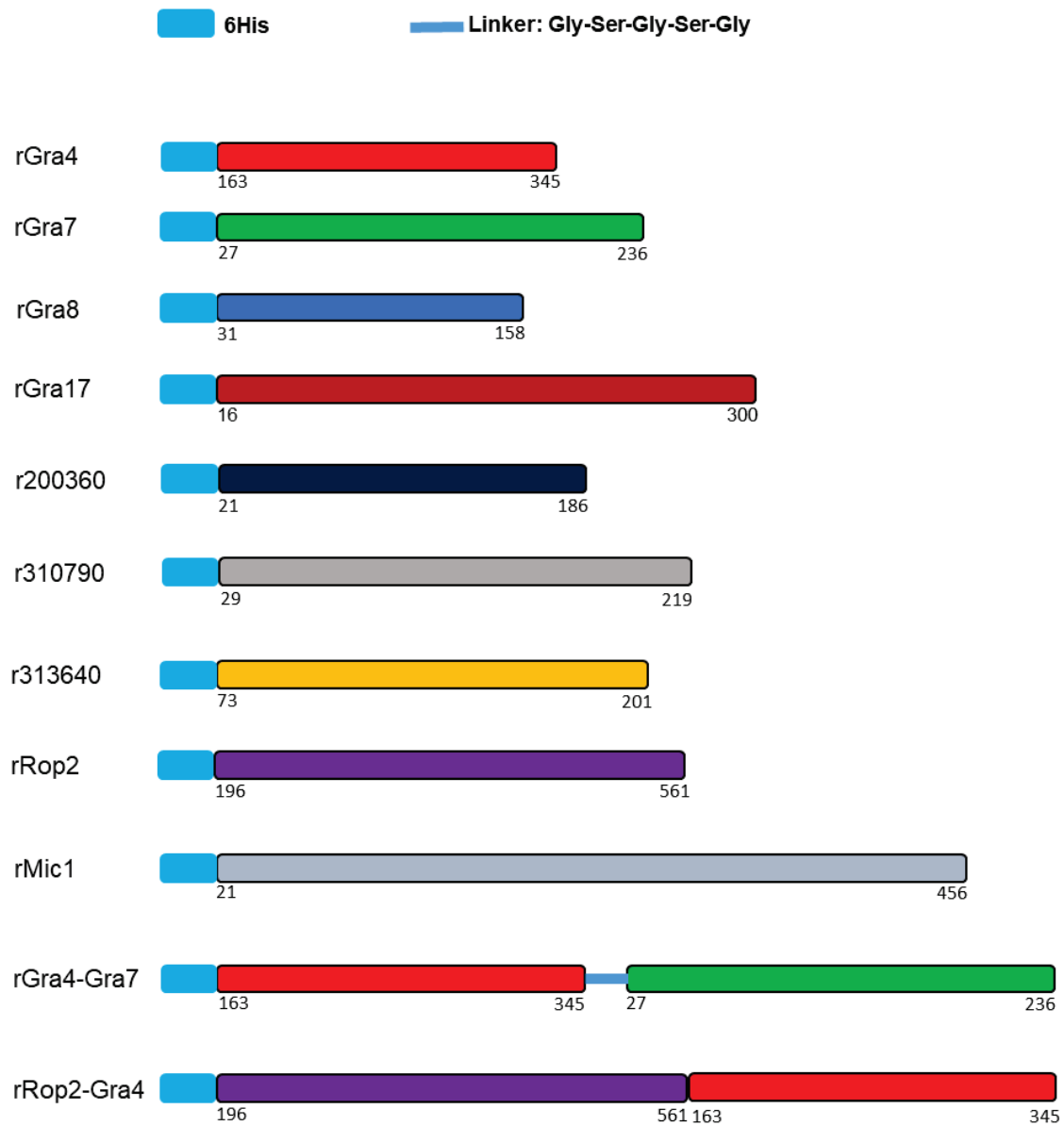


Figura 3.2.1: Antígenos recombinantes empleados en este análisis.

3.2.2. Localización de r310790 en parásitos extracelulares e intracelulares de *T. gondii*

Como se mencionó en la sección anterior, r310790 es una proteína que ha sido asociada a gránulos densos y, además, se secretaría al lumen de la VP. En esta tesis, con el objetivo de analizar la localización de esta proteína y comparar los resultados con los descritos por otros autores [93] [98], se procedió a inmunizar ratones C57BL/6 con el fin de obtener anti-suero de r310790 purificado. Una vez obtenido el anticuerpo policlonal anti-r310790 se realizó un Western blot con TLA de la cepa RH de *T. gondii* para determinar su reactividad. El peso esperado de r310790 es de 24.7 kDa (según la base de datos ToxoDB) y en el Western blot se detectó una banda cercana a los 26 kDa, lo que estaría indicando que este anticuerpo reconoce a la proteína en el peso esperado (Ver anexo sección 5.1 con los resultados del Western blot). A su vez, al analizar los resultados de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) de r310790 en taquizoitos extracelulares de *T. gondii* (Figura 3.2.2) se puede observar que presenta una marcación típica de gránulos densos (GD) en el citoplasma del parásito, pero ocupando GD diferentes a Gra4, sugiriendo que estos no son homogéneos en su composición. Además de su localización en GD, r310790 rodea el núcleo, una marcación compatible con la envoltura nuclear/retículo endoplásmico.

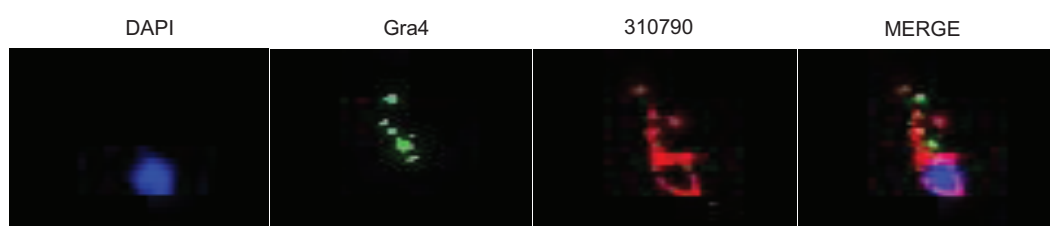


Figura 3.2.2: Localización de r310790 por IFI en taquizoitos extracelulares obtenidos del cultivo *in vitro* en células VERO. Se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) y anti-Gra4 como marcadores del núcleo y los gránulos densos, respectivamente.

Por otro lado, los resultados obtenidos en taquizoitos intracelulares (Figura 3.2.3) muestran una localización restringida compatible con el retículo endoplasmático (RE) y al aparato de Golgi. Esto estaría indicando que, a diferencia de lo demostrado por los autores antes mencionados, r310790 no está siendo secretada al lumen de la VP cuando el parásito se encuentra dentro de la célula. Más estudios se necesitan para corroborar su localización, mediante la utilización de marcadores de RE y Golgi.

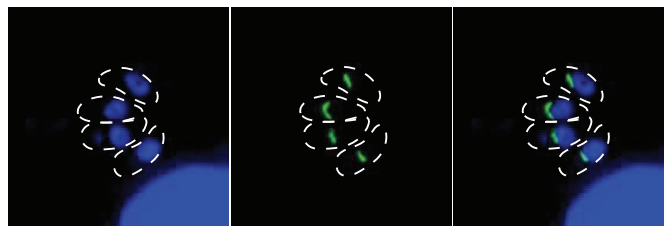


Figura 3.2.3: Localización de r310790 por IFI en taquizoitos intracelulares, obtenidos del cultivo *in vitro* en células VERO. Se utilizó DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) como marcador del núcleo.

3.2.3. Predicción de epítopes lineales de células B

La interacción antígeno-anticuerpo es un evento crucial en la respuesta inmune humoral ante la invasión de un patógeno en el organismo [99]. Un anticuerpo específico (Ab) reconoce al antígeno (Ag), que estimula una respuesta mediada por células B, en regiones discretas denominadas determinantes antigénicos o epítopes. Un epítopo puede ser definido como un grupo de aminoácidos, accesibles en la superficie del antígeno, que es reconocido por receptores de células B o anticuerpos secretados por estas y que son capaces de iniciar una respuesta inmune humoral o celular [99]. Los epítopes de células B se dividen en dos categorías: continuos y discontinuos. Los epítopes continuos o lineales están constituidos de una secuencia consecutiva de aminoácidos; mientras que los epítopes discontinuos o conformacionales están constituidos por aminoácidos distantes en la secuencia primaria de la proteína y que entran en contacto entre sí cuando la secuencia se pliega para formar la estructura terciaria de la proteína [100]. Actualmente, se asume que el 90% de los epítopes en una proteína son conformacionales y solo el 10% son lineales [101].

Se ha correlacionado una correcta interacción entre la proteína nativa y el anticuerpo con la hidrofiliidad y la exposición de los epítopes en la superficie de la proteína, siendo esta última la característica más comúnmente citada [102] [103]. Otra característica empleada para predecir la presencia de epítopes en las proteínas son los giros o “turns”, principalmente los giros beta, ya que estos presentan propiedades como accesibilidad a la superficie, hidrofiliidad y movilidad que han sido correlacionados con la antigenicidad [104].

Se utilizaron dos métodos para la predicción de epítopes en las proteínas estudiadas en esta tesis. Uno es el método de Kolaskar y Tongaonkar (1990) [105], basado en una escala de antigenicidad generada a partir de propiedades fisicoquímicas y en la frecuencia de aminoácidos en epítopes de células B determinados experimentalmente. El otro método empleado es uno más reciente, BepiPred 2.0 (2017) [106], basado en modelos de “machine learning” y se basa en un modelo oculto de Markov (Hidden Markov model) y en una escala de propensión

de aminoácidos, entrenado solamente con datos de epítopes que derivan del análisis de estructuras cristalizadas. Se tuvieron en cuenta solo aquellos epítopes antigénicos predichos por el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar y al mismo tiempo que superen el umbral o threshold de 0.500 del predictor de epítopes de células B BepiPred 2.0 (para ver los gráficos con los resultados de los predictores ir a anexo: Sección 5.2).

- **rGra7**

Los resultados obtenidos mostraron que Gra7 presentaría 7 epítopes antigénicos, cuando se analizó la secuencia de la proteína con el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar. Sin embargo, según el predictor de epítopes lineales BepiPred 2.0, solo 4 de estos serían epítopes lineales de células B (Tabla 3.2.1).

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	46	53	GQAPVDSL	8	0.605	1.051
2	97	102	EVHFRK	6	0.591	1.018
3	123	128	RKVVPR	6	0.606	1.065
4	217	225	QPALEQEV	9	0.616	1.029

Tabla 3.2.1: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.545, con un mínimo de 0.230 y un máximo de 0.689. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.001. El valor promedio obtenido fue de 1.001, con un mínimo de 0.894 y un máximo de 1.144.

En un trabajo llevado a cabo por Beghetto *et al.* (2003), se determinó la antigenicidad de la porción N-terminal de Gra7 entre los aa 24-102 y comparando con los resultados obtenidos en nuestro análisis, se observa que en esta porción de la proteína se incluyen los epítopes número 1 y 2 [107].

- **Gra4**

Cuando se analizó la secuencia de Gra4 con el algoritmo de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar, los resultados mostraron que presenta 10 epítopes antigénicos, de los cuales sólo 5 serían epítopes lineales de células B según BepiPred 2.0 (Tabla 3.2.2). De esta proteína se clonó la región C-Terminal (aa 163 hasta el final, aa 345), por lo que en esta región solo se encuentran los epítopes 3, 4 y 5. Por lo tanto, rGra4 presenta 3 epítopes lineales entre los aa 161-168, 189-211 y 217-223.

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	92	99	QQGVPQAP	8	0.571	1.070
2	130	140	GHPVQAIPQQP	11	0.567	1.076
3	181	188	SGLQLRQQ	8	0.594	1.048
4	209	231	SYGYPAFPAPRLPAFSD SVSVS	23	0.544	1.066
5	237	243	LTVVRDS	7	0.555	1.076

Tabla 3.2.2: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.545, con un mínimo de 0.168 y un máximo de 0.679. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.024. El valor promedio obtenido fue de 1.024, con un mínimo de 0.879 y un máximo de 1.185.

Cabe mencionar que Mévélec (1998) determinó que entre los aa 318 y 334 se encuentra el principal epítope de célula B de Gra4 y Maksimov (2012) identificó dos epítopes de células B entre los aa 309-324 y 321-346 [108] [109]. Todos estos resultados muestran una mayor concentración de determinantes antigénicos en la región C-terminal de la proteína.

- **Gra8**

Gra8 contendría 8 epítopes antigénicos, según el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar. De estos, solo 7 serían epítopes lineales de acuerdo al predictor BepiPred 2.0 (Tabla 3.2.3). En este trabajo se clonó la porción N-terminal de la proteína (aa 31 al 158) que contiene los primeros 5 epítopes.

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	64	72	HPSVIPNPP	9	0.592	1.082
2	85	92	EVPLQHP	8	0.620	1.094
3	100	110	AAAPQPPYPVG	11	0.585	1.070
4	119	125	IPPVHRP	7	0.633	1.088
5	133	143	EVAPVPPYPVG	11	0.583	1.110
6	153	163	IPAVHHPFPYV	11	0.574	1.109
7	171	178	PRVLVYKI	8	0.604	1.146

Tabla 3.2.3: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.559, con un mínimo de 0.257 y un máximo de 0.654. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.039. El valor promedio obtenido fue de 1.039, con un mínimo de 0.885 y un máximo de 1.189.

Beghetto *et al.* (2003) determinó la presencia de un epítipo lineal entre los aa 52-87 [107]. A su vez, Costa *et al.* (2016) predijo la presencia de epítopes lineales entre los aa 44-78 y 86-91 [110]. Según este análisis, y lo observado por otros autores, la porción N-terminal de rGra8 presenta la mayor concentración de epítopes lineales de células B.

- **Gra17**

Gra17, contendría 9 epítopes antigénicos de acuerdo a Kolaskar y Tongaonkar. De estos, sólo 3 serían epítopes lineales de células B según el predictor BepiPred 2.0 (Tabla 3.2.4).

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	39	54	AAPCGALYPASRVLSF	16	0.540	1.098
2	114	120	AEVAKVE	7	0.526	1.076
3	247	254	LESILFDS	8	0.507	1.056

Tabla 3.2.4: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.481, con un mínimo de 0.224 y un máximo de 0.644. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.031. El valor promedio obtenido fue de 1.031, con un mínimo de 0.866 y un máximo de 1.197.

- **r310790**

TGME49_310790, contendría 8 epítopes antigénicos cuando se analiza la secuencia con el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar. Sin embargo, de estos sólo 1 sería un epítope lineal de células B cuando se comparan con el predictor BepiPred 2.0 (Tabla 3.2.5).

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	170	183	KQLLEKTAHQ LGMP	14	0.536	1.033

Tabla 3.2.5: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.501, con un mínimo de 0.248 y un máximo de 0.646. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.003. El valor promedio obtenido fue de 1.003, con un mínimo de 0.862 y un máximo de 1.135.

- **r200360**

TGME49_200360, por su parte contendría 6 epítopes antigénicos, según Kolaskar y Tongaonkar, de los cuales sólo 4 serían epítopes lineales de células B, de acuerdo al predictor BepiPred 2.0 (Tabla 3.2.6).

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	49	59	PPLSSLSALQT	11	0.567	1.071
2	74	80	GYVEAK	7	0.542	1.073
3	82	88	FYRVPPT	7	0.605	1.062
4	118	123	ADYVDR	6	0.579	1.060

Tabla 3.2.6: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.516, con un mínimo de 0.243 y un máximo de 0.739. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.025. El valor promedio obtenido fue de 1.025, con un mínimo de 0.896 y un máximo de 1.216.

- **r313640**

TGME49_313640, presentaría 6 epítopes antigénicos cuando se analiza la secuencia con el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar. Sin embargo, según el predictor BepiPred 2.0, de estos 6 sólo 2 serían epítopes de células B (Tabla 3.2.7).

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	78	84	RDYVAQM	7	0.541	1.042
2	149	157	YHPICYPPP	9	0.546	1.116

Tabla 3.2.7: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.545, con un mínimo de 0.272 y un máximo de 0.676. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.023. El valor promedio obtenido fue de 1.023, con un mínimo de 0.870 y un máximo de 1.213.

- **Mic1**

Según el algoritmo de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar, Mic1 contendría 15 epítopes antigénicos. De estos, sólo 7 serían epítopes lineales de células B cuando se comparan con el predictor BepiPred 2.0 (Tabla 3.2.8.).

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	87	92	DTASLL	6	0.500	1.049
2	101	107	VNCVDDC	7	0.534	1.090
3	109	116	HTIPCPGG	8	0.553	1.090
4	140	147	QRFCSPYQ	8	0.541	1.093
5	229	244	IGSVDSPCSEVEVCLP	16	0.547	1.107
6	249	255	PPVCLDE	7	0.578	1.096
7	375	382	AFDVVEVE	8	0.550	1.090

Tabla 3.2.8: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.538, con un mínimo de 0.295 y un máximo de 0.688. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.028. El valor promedio obtenido fue de 1.028, con un mínimo de 0.865 y un máximo de 1.194.

- **Rop2**

El análisis de la secuencia con el algoritmo de Kolaskar y Tongaonkar, permitió identificar un total de 22 epítopes en Rop2. De estos, sólo 12 serían epítopes de células B cuando se comparan con el predictor BepiPred-2.0 (Tabla 3.2.9). En esta tesis sólo se clonó la porción C-terminal de la proteína (aa 196 hasta el final, aa 561). En esta porción de la proteína se incluyen los epítopes 7 al 12.

N°	Inicio	Fin	Péptido	Longitud	BepiPred-2.0	Antigenicidad
1	30	38	QGAGVVRPR	9	0.582	1.069
2	58	70	RHFHSPIEPVAFI	13	0.602	1.065
3	92	97	VTPLLN	6	0.652	1.066
4	143	153	PTRLFQHLRRA	11	0.570	1.053
5	155	162	AAIPAAAS	8	0.538	1.058
6	172	178	QEPVFPP	7	0.595	1.075
7	198	204	GDDVIEE	7	0.564	1.080
8	224	232	NANHLVSTA	9	0.619	1.070
9	295	309	IKQLSEQVLRRLRLLR	15	0.517	1.071
10	318	332	KAYLRFIFPIDLVKD	15	0.512	1.076
11	459	464	YRQHHP	6	0.646	1.050
12	546	554	ELSAVLPLY	9	0.620	1.117

Tabla 3.2.9: Epítopes lineales de células B predichos por los métodos disponibles en la base IEDB. **BepiPred-2.0:** umbral de 0.500. El valor promedio obtenido fue de 0.530, con un mínimo de 0.246 y un máximo de 0.698. **Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar:** umbral de 1.027. El valor promedio obtenido fue de 1.027, con un mínimo de 0.879 y un máximo de 1.182.

3.2.4. Purificación de las proteínas recombinantes

Todas las proteínas mencionadas arriba fueron expresadas en cepas de *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad al Ni²⁺, bajo condiciones desnaturizantes en Urea 8M, a excepción de Rop2 que se purificó en condiciones nativas en Imidazol.

En la figura 3.2.1 se muestra el resultado de un gel SDS-PAGE con las eluciones de las proteínas rGra4, rGra7 y rGra8. En los geles de rGra4 y rGra8, además de las bandas esperadas, se observan bandas por debajo del peso esperado que pueden corresponder a productos de degradación de las mismas proteínas y en las eluciones de rGra7 se observa la presencia de impurezas.

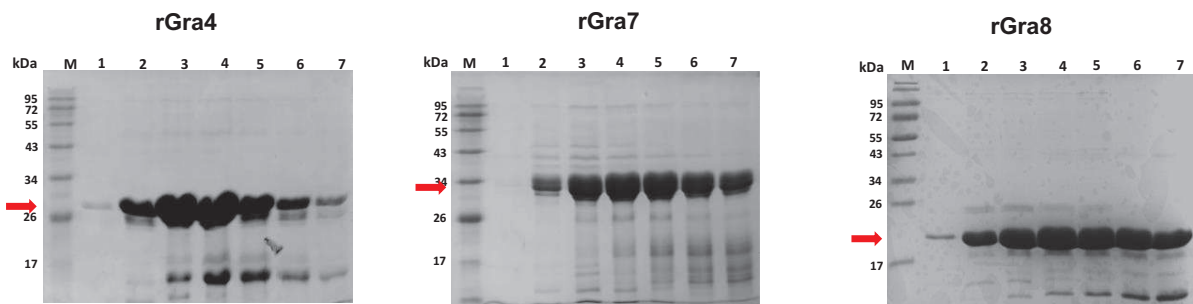


Figura 3.2.1: Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie blue con el resultado de la purificación de rGra4, rGra7 y rGra8 por cromatografía de afinidad al Ni²⁺. **M:** Marcador de peso molecular. **Líneas 1 a la 7:** eluciones de las proteínas recombinantes en Urea 8M. La flecha roja indica la proteína recombinante.

En la figura 3.2.2. se muestra el gel SDS-PAGE con los resultados de las purificaciones de r310790, r313640 y r200360. En el gel de r310790, la proteína recombinante fue mayormente purificada entre las eluciones 3 y 6, acumulándose principalmente, en las eluciones 4 y 5. En el gel de r313640 se observa que todas las eluciones contienen la proteína recombinante con una cierta cantidad de impurezas y en r200360 sólo las eluciones 2 y 3 contienen bajas cantidades de la proteína.

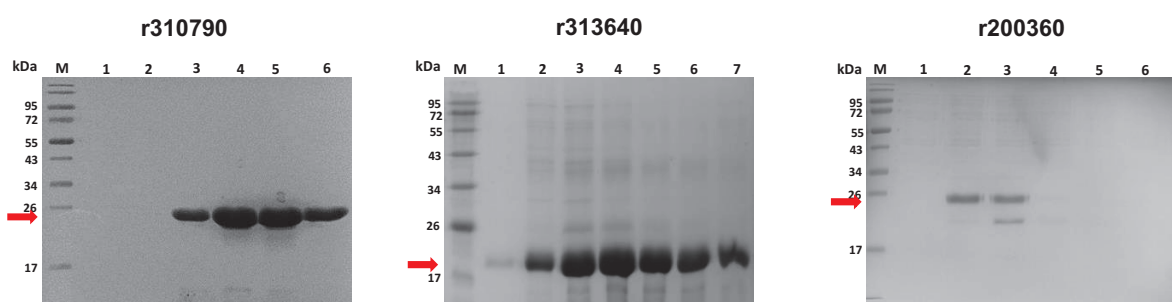


Figura 3.2.2: Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie blue con el resultado de la purificación de r310790, r313640 y r200360 por cromatografía de afinidad al Ni²⁺. **M:** Marcador de peso molecular. **Líneas 1 a la 7:** eluciones de las proteínas recombinantes en Urea 8M. La flecha roja indica la proteína recombinante.

En el gel SDS-PAGE que muestra los resultados de la purificación de rGra17, puede observarse una banda a la altura esperada de 26 kDa junto con otras bandas de mayor peso molecular (figura: 3.2.3 A). Debido a esto, se realizó un Western blot, con un anticuerpo anti-Histidina, para determinar que la banda observada a la altura esperada corresponda a la proteína purificada (figura: 3.2.3 B). El resultado indica la presencia de la proteína al peso esperado, además de algunas bandas con un peso superior lo que sugiere que podrían corresponder a oligómeros resistentes al buffer Laemmli.

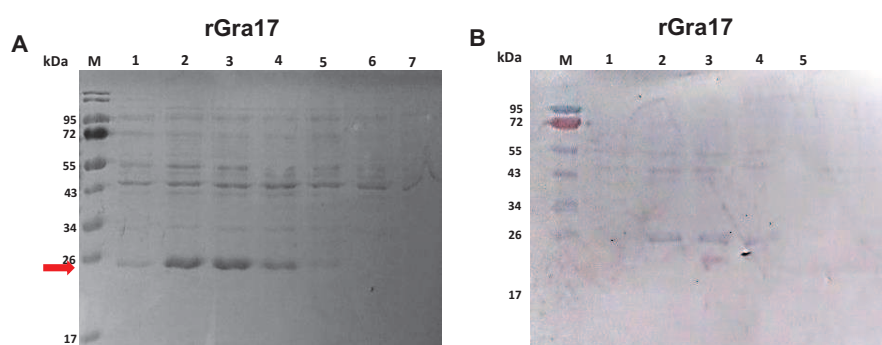


Figura 3.2.3: Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie blue con el resultado de la purificación de rGra17 por cromatografía de afinidad al Ni²⁺. **M:** Marcador de peso molecular. **A:** líneas 1 a la 7: eluciones de las proteínas recombinantes en Urea 8M. La flecha roja indica la proteína recombinante. **B:** Western blot anti-histidina de las eluciones de rGra17.

En la figura 3.2.4 se muestran los geles SDS-PAGE con las purificaciones de rMic1 y rRop2. En las eluciones de ambas proteínas recombinantes se observaron bandas a la altura esperada y bandas de un tamaño más pequeño que podrían ser productos de degradación. Es importante destacar, que la purificación de rRop2 se realizó en Imidazol y no en condiciones desnaturalizantes debido a las dificultades que se tuvieron en obtener la proteína recombinante empleando Urea.

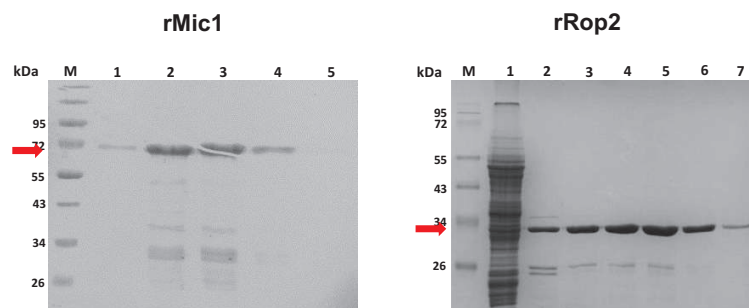


Figura 3.2.4: Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie blue con el resultado de la purificación de rMic1 (en condiciones denaturantes) y rRop2 (en condiciones nativas) por cromatografía de afinidad al Ni²⁺. **M:** Marcador de peso molecular. **rMic1:** Líneas 1 a la 5, eluciones de las proteínas recombinantes en Urea 8M. **rRop2:** Líneas 1, la resina se lavó con buffer de lavado, con 40 mM Imidazol. Línea 2 a la 7, eluciones de la proteína recombinante, con 150 mM de Imidazol. La flecha roja indica la proteína recombinante.

Por último, los resultados de la purificación de las quimeras rGra4/Gra7 y rRop2/Gra4 incluidas en este estudio se muestran en la figura 3.2.5. En ambos casos se puede observar las bandas en las eluciones al peso molecular esperado.

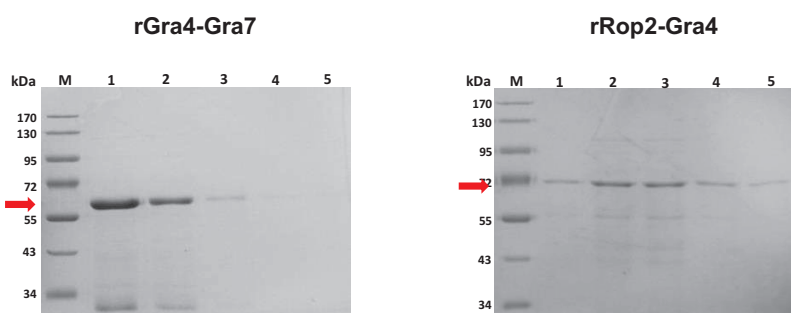


Figura 3.2.5: Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie blue con el resultado de la purificación de rMic1 (en condiciones desnaturalizantes) y rRop2 (en condiciones nativas) por cromatografía de afinidad al Ni⁺. **M:** Marcador de peso molecular. **Líneas 1 a la 5:** eluciones de las proteínas recombinantes en Urea 8M. La flecha roja indica la proteína recombinante

3.3. Conclusiones

Como se mencionó anteriormente, las técnicas moleculares, como ADN recombinante, permitieron la evaluación de forma individual de numerosos antígenos de *T. gondii*, que podrían ser de utilidad no sólo en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis, sino también en el diagnóstico de la toxoplasmosis congénita [77]. Por este motivo, en la presente tesis, se clonaron 6 proteínas de *T. gondii* (rGra8, rGra17, r310790, r200360 y r313640) junto a una quimera (rGra4-Gra7), las cuales se sumaron a la batería de antígenos ya disponibles en el laboratorio (rGra4, rGra7, rRop2, rMic1 y rRop2-Gra4). Estas pertenecen a sistema ESA del parásito, 7 son de Gránulos Densos (rGra4, rGra7, rGra8, rGra17, r310790, r200360 y r313640), 1 de Micronemas (rMic1) y 1 de Roptrias (rRop2).

Es interesante destacar, que el análisis de localización de r310790 es diferente a lo observado por otros autores; esto puede ser debido a la metodología empleada en los distintos trabajos. En nuestro análisis, se generó un anticuerpo policlonal en ratones anti-r310790, en cambio en los trabajos antes mencionados se realizaron transfecciones transientes y marcación endógena de la proteína, lo que podría explicar las diferencias obtenidas [93] [98]. Más estudios se necesitan para determinar la localización de la proteína y su función.

Por otro lado, para que estos antígenos tengan utilidad en el diagnóstico serológico deben ser antigénicos, lo que significa tener la capacidad de unirse a un anticuerpo específico [113]. Por esto, se analizó la presencia de determinantes antigénicos de células B en cada una de ellos, mediante herramientas informáticas de acceso libre disponibles en internet. Se decidió focalizar el análisis sobre eipitopes lineales ya que para predecir epitopes conformacionales, se requiere generalmente la estructura terciaria y esta información sólo está disponible para una parte de las proteínas [114]. Además, al purificar los antígenos en condiciones desnaturizantes, mediante la utilización de urea, puede resultar en una pérdida de reconocimiento de los epitopes conformacionales [114].

Gracias a los estudios experimentales y a los análisis *in silico* realizados, se ha podido detallar las características que permiten definir a los epítopes. La mayoría tienen una longitud de entre 5 y 25 aminoácidos y la accesibilidad en la superficie es su principal propiedad [99] [106]. Empleando los dos métodos mencionados aquí, se determinó la presencia de epítopes lineales de células B en cada antígeno cuyo número varía de un mínimo de 1 (r310790) a un máximo de 12 epítopes (rRop2) y con una longitud entre 6 y 23 aa. Interesantemente, rGra4 y rGra8 presentarían una mayor concentración de epítopes lineales en la porción N-terminal y C-terminal de la proteína, respectivamente, por lo que se clonaron solo esas porciones de ambas proteínas. Si bien rRop2 presentaría 12 epítopes lineales, al clonar la región C-terminal de la proteína, solo se pudieron incluir 6 de estos epítopes. Al mismo tiempo, al purificar la proteína en condiciones nativas también podrían estar incluyéndose epítopes conformacionales.

Las proteínas recombinantes se expresaron en cepas M15 y BL21 DE3 de *E. coli*, cultivadas en medio Luria-Bertani, a temperatura de 18 y 37°C y usando IPTG como inductor de la síntesis de las mismas. Estas condiciones permitieron lograr altos niveles de expresión de los antígenos. Sin embargo, no se lograron altos niveles de expresión con r200360. Dichas condiciones podrían ser ajustadas en el futuro, para obtener mayores niveles de esta proteína. También, la fusión de una etiqueta de Histidina a la secuencia de cada proteína facilitó la purificación tanto en condiciones nativas como desnaturizantes. El protocolo de purificación empleado, principalmente, fue bajo condiciones desnaturizantes en urea 8M. A su vez, no se pudo purificar rRop2 en estas condiciones, por lo que se empleó Imidazol permitiendo obtener altas cantidades de proteína soluble.

3.4. Materiales y Métodos

3.4.1. Cultivo *in vitro* de taquizoitos de *Toxoplasma gondii*

Para la realización de los experimentos se utilizaron taquizoitos de la cepa RH (Tipo I), los cuales se obtuvieron a partir del cultivo *in vitro* en células VERO (African green monkey kidney- células de riñón de mono africano verde) en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1% Penicilina/Estreptomicina a 37°C y 5% CO₂.

3.4.2. Proteínas recombinantes de *T. gondii*

3.4.2.1. rGra4, rGra7 y rRop2

Estas proteínas se obtuvieron como se describe previamente en Martín *et al.* (1998), Nigro *et al.* (2001) y Nigro *et al.* (2003) [115] [116] [117]. rGra4 comprende la región C-terminal de la proteína madura (aa 163 hasta el final, aa 345). rRop2 también comprende la región C-terminal de la proteína madura (aa 196 hasta el final, aa 561). rGra7 corresponde a la forma madura de la proteína nativa. Las secuencias génicas de estas tres proteínas se clonaron entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III del vector de expresión pQE31 (Qiagen, Valencia, CA, USA).

3.4.2.2. rMic1, r313640 y rRop2-Gra4

La obtención de estas proteínas se realizó mediante ensayos de amplificación por PCR, utilizando ADNc como templado. Para esto, se extrajo el ARN total de la cepa RH de *T. gondii* utilizando TRIzol (Ambion/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), el cual se retrotranscribió a ADNc usando la Transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, se llevaron a cabo ensayos de PCR empleando

DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) con *primers* específicos generados a partir de la secuencia génica extraída de la base de datos ToxoDB (número de acceso: TGME49_291890 para rMic1 y TGME49_313640 para r313640). rMic1 se amplificó utilizando un *primer forward* (Mic1-F, 5'-CACCGGGCCAGAAGCATATGGAGAAG-3'), que contiene 4 bases adicionales (CACC) para el clonado direccional, y un *primer reverse* (Mic1-R, 5'-TCAAGCAGAGACGGCCGTAGG-3'). El producto de PCR se purificó de un gel de agarosa (Promega, Madison, WI, USA) y se clonó en el vector pET 200 Directional TOPO siguiendo las especificaciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). La secuencia génica de r313640 (residuo 72 hasta el final, residuo 201) se amplificó utilizando un *primer forward* (313640-F, 5'-CATATGGTTGCACGGTGCTTCTTTTCGCAC-3') con una secuencia de reconocimiento para *NdeI* y un *primer reverse* (313640-R, 5'-CTCGAGTTAGGAGCCACCTGTTTCTTTGTTG-3') con una secuencia de reconocimiento para *XhoI*. El producto de PCR se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* and *XhoI*, se purificó de un gel de agarosa y se clonó en el vector de expresión pET-28a+, previamente digerido con *NdeI/XhoI*. Para obtener la quimera rRop2-Gra4, se fusionaron las secuencias génicas a partir de los plásmidos previamente descritos en la sección 3.4.2.1. Brevemente, los fragmentos se amplificaron con *el primer forward* del gen Rop2, *el primer reverse* del gen de Gra4 y un primer interno de 40 pb, con los últimos 20 nucleótidos del gen de Rop2 que codifica para la región C-terminal de la proteína sin el codón de stop más los primeros 20 nucleótidos del gen Gra4. El fragmento así obtenido, que expresa la fusión entre las proteínas Rop2₁₉₆₋₅₉₁ y Gra4₁₆₃₋₃₄₅, se clonó en el vector de expresión pQE31.

3.4.2.3. rGra8, rGra17, r310790, r200360 y rGra4-Gra7

Las secuencias génicas de estas proteínas fueron sintetizadas por GenScript (Piscataway, NJ, USA). Para esto, se extrajeron las secuencias génicas de la base de datos ToxoDB de rGra8 (número de acceso: TGME49_254720), rGra17 (número de acceso: TGME49_222170), r310790 (número de acceso: TGME49_310790), r200360 (número de acceso: TGME49_200360), rGra4 (número de acceso: TGME49_310780) y rGra7 (número de acceso: TGME49_203310). rGra8 corresponde a la región N-terminal de la proteína madura (residuo 31 hasta el residuo 158) según lo descrito por Li *et al.* (2000) [118]. rGra17, r310790 y r200360 corresponden a la forma madura de cada una de las proteínas nativas. Estas secuencias se ligaron entre los sitios *NdeI/XhoI* del vector de expresión pET- 28a+. Con respecto a la quimera rGra4-Gra7, se obtuvieron las secuencias génicas que corresponden a la región C-terminal de rGra4 y a la forma madura de la proteína nativa de rGra7 (sección 3.4.2.1), las cuales se fusionaron con una región *linker* entre ellas compuesta de una secuencia de 5 aminoácidos (Gly-Ser-Gly-Ser-Gly) y se clonó entre los sitios *NdeI/BamHI* del vector de expresión pET- 14b.

3.4.3 Ensayo de localización de r310790

3.4.3.1 Anticuerpo policlonal anti-r310790

El anticuerpo policlonal anti-310790 fue generado en ratones Balb/c. Brevemente, los ratones fueron inmunizados subcutáneamente con 50 µg de proteína recombinante con adyuvante completo de Freund (Sigma). Pasadas 3 semanas, los ratones fueron inmunizados 3 veces más, con la misma dosis de antígeno con adyuvante incompleto de Freund (Sigma), con un intervalo de 2 semanas entre cada una de ellas. Los ratones fueron sacrificados 1 semana después de la última inmunización y se recolectó la sangre para la obtención del suero. La reactividad del suero se analizó por Western blot e IFI.

3.4.3.2 Análisis por Western blot

Para el análisis de reactividad se usaron taquizoitos extracelulares de la cepa RH de *T. gondii*, los cuales se resuspendieron en buffer de SDS-PAGE (50 mM Tris–HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 100 mM DTT y 0.1% bromophenol blue), fueron calentados a 95°C durante 5 minutos y sembrados en un gel SDS-PAGE de 15%. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de polyvinylidene fluoride (PDVF, Amersham GE Healthcare). Luego, la membrana se bloqueó con solución de bloqueo (5% de leche descremada en 0.05% Tween-20-PBS) 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas fueron incubadas con el suero anti-r310790 ó el suero pre-inmune, en solución de bloqueo a una dilución de 1:200, 1:1000 y 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las membranas con solución de lavado (0.05% Tween-20-PBS), se incubaron con el anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:15000 en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente (ThermoFisher Scientific). Finalmente, se procedió con el revelado de las membranas usando NBT/BCIP (Promega).

3.4.3.3 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Los ensayos de IFI se llevaron a cabo en taquizoitos extracelulares e intracelulares de la cepa RH de *Toxoplasma gondii*. Los taquizoitos extracelulares, obtenidos del cultivo in vitro en células VERO, se fijaron en cubreobjetos con 4% de formaldehído, 20 min a temperatura ambiente. Luego de bloquear con solución de bloqueo (3% BSA en 0.01% Triton-X100-PBS) por 1 h a temperatura ambiente, se incubaron con el suero policlonal anti-r310790 en una dilución de 1:200 en solución de bloqueo toda la noche a 4°C. También, se utilizó un suero policlonal anti-Gra4 obtenido en conejo como marcador de gránulos densos, a una dilución de 1:500 en solución de bloqueo. Después de varios lavados con PBS, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con Alexa Flúor 568 y anti-rabbit IgG conjugado con Alexa 488, ambos diluidos 1:4000 en solución

de bloqueo (ThermoFisher Scientific). Finalmente, luego de varios lavados con PBS se montaron en medio de montaje con DAPI y los preparados fueron analizados por microscopía de epifluorescencia (Carl Zeiss, Axio Imager.M2). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Image J (Versión 5.2.0, 2014, US National Institutes of Health).

Los taquizoitos que se dividen intracelularmente, se fijaron en cubreobjetos con metanol 7 min a -20°C . Las células infectadas se bloquearon con solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de bloquear, se incubaron con el suero policlonal anti-r310790 en una dilución de 1:200 en solución de bloqueo toda la noche a 4°C . Después de varios lavados con PBS, se incubaron 1 h a temperatura ambiente con anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con Alexa Flúor 488 diluido 1:4000 en solución de bloqueo (ThermoFisher Scientific). Finalmente, luego de varios lavados con PBS se montaron en medio de montaje con DAPI y los preparados fueron analizados por microscopía de epifluorescencia (Carl Zeiss, Axio Imager.M2). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Image J.

3.4.4 Predicción de epítopes lineales de células B

Para determinar la presencia de epítopes lineales de células B en la secuencia aminoacídica de cada proteína, se utilizaron la escala de antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar [105] y el predictor de epítopes lineales de células B BepiPred-2.0 [106]. Estas herramientas son de acceso libre y se encuentran disponibles en la página “Immune Epitope Database” (<http://tools.iedb.org/bcell/>). El Threshold o umbral y demás criterios utilizados en cada herramienta empleada fueron los establecidos por default.

3.4.5 Expresión de proteínas recombinantes

Las proteínas recombinantes se expresaron en cepas competentes de *E. coli* como M15 (rGra4, rGra7, rRop2 y rRop2-Gra4) y BL21 Star (DE3) (rMic1, r313640,

rGra8, rGra17, r310790, r200360 y rGra4-Gra7). Brevemente, las células se cultivaron a partir de un pre-inoculo, crecido toda la noche a 37°C, el cual se diluyó 100 veces (1:100) en medio de cultivo LB, suplementado con Ampicilina (50 µg/ml) o Kanamicina (30 µg/ml). La expresión de las proteínas se indujo mediante la adición de IPTG. La concentración de IPTG y los tiempos de inducción se resumen en la Tabla 5.3.1 (Anexo: Sección 5.3). Una vez alcanzado el tiempo de inducción, se cosecharon las células por centrifugación a 5000g por 10 minutos a temperatura ambiente y el pellet se conservó hasta el posterior protocolo de purificación.

3.4.6 Purificación de proteínas recombinantes

Gracias al agregado de una etiqueta de 6 aminoácidos Histidina en el extremo N-terminal de cada proteína recombinante se pudo realizar la purificación mediante cromatografía de afinidad al Níquel usando una resina de Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetic acid resin, Qiagen, Valencia, CA, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.4.6.1 Purificación en condiciones desnaturizantes

Las proteínas rGra4, rGra7, rMic1, r313640, rGra8, rGra17, r310790, r200360, rRop2-Gra4 y rGra4-Gra7 se purificaron en condiciones desnaturizantes. Para esto, el pellet de células se resuspendió en buffer de lisis (Urea 8 M, NaHPO₄ 20 mM, NaCl 300 mM, pH 8). Luego, se sonicaron durante 5 min (con pulsos de 15s ON/15s OFF y amplitud del 30%) usando un procesador ultrasónico (Vibra Cell™; Sonic, Newtown, CT, USA), se obtuvo la fracción soluble mediante centrifugación a 15000g por 45 min a 4°C y se incubó con la resina de Ni-NTA a temperatura ambiente. Posteriormente, se eluyeron las proteínas bacterianas con buffer de lavado (Urea 8 M, NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 300 mM, pH 6). Finalmente, se eluyeron las proteínas recombinantes con 5-10 ml de buffer de elución (Urea 8 M, NaH₂PO₄ 20 mM, NaCl 300 mM, pH 4).

3.4.6.2 Purificación en condiciones nativas

La proteína rRop2 se purificó en condiciones nativas. Para esto, se empleó el equipo Akta 3D system (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Brevemente, se resuspendió el pellet de células en buffer de lisis (NaHPO₄ pH 7.4, NaCl 100 mM, Glicerol 5%, PMSF 1 mM). Luego, se sonicaron durante 5 min (con pulsos de 15s ON/15s OFF y amplitud del 30%) usando un procesador ultrasónico (Vibra Cell™; Sonic, Newtown, CT, USA) y se obtuvo la fracción soluble mediante centrifugación a 15000g, por 45 min a 4°C. La fracción soluble se cargó en una columna Hi-Trap Q FF Ni²⁺ (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Las proteínas bacterianas se eluyeron de la columna con buffer de lavado (20 mM NaHPO₄ pH 7.4, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM PMSF y 40 mM imidazol). La proteína recombinante se eluyó con buffer de elución (20 mM NaHPO₄ pH 7.4, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 1 mM PMSF y 150 mM imidazol).

Los resultados de las purificaciones se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie blue.

Capítulo 4

Ensayo de antigenicidad

4.1. Introducción

Una vez obtenido el antígeno recombinante, el siguiente paso fue analizar su utilidad en el diagnóstico de la toxoplasmosis. La técnica más comúnmente empleada para este tipo de estudios ha sido el ELISA indirecto para la detección de anticuerpos específicos, tanto en investigación como en el diagnóstico clínico. Las principales ventajas de esta técnica son: la alta sensibilidad que permite determinar los niveles de anticuerpos de forma cuantitativa o semicuantitativa, simple de llevar a cabo y puede procesarse un alto número de muestras en un periodo corto de tiempo [119].

En el diagnóstico de la toxoplasmosis, los primeros antígenos empleados con esta técnica fueron TLA, los cuales mostraban valores satisfactorios de sensibilidad y especificidad. Sin embargo, también presentan limitaciones como la contaminación con materiales extra parasitarios debido al método de obtención del parásito, además de discrepancias en los resultados y la incapacidad de discriminar entre las distintas fases de la infección [45]. Reemplazar al TLA con antígenos recombinantes es una alternativa importante para mejorar el desempeño de esta técnica. Por esta razón, en los últimos 30 años una determinada cantidad de proteínas recombinantes han sido analizadas, con diferentes valores de sensibilidad y especificidad, que no sólo mejorarían el diagnóstico, sino que ayudarían, también, a discriminar entre las distintas fases de la infección, con la importancia que esto tiene, principalmente en el diagnóstico de la mujer embarazada [37]. La utilización de estas proteínas recombinantes presenta la ventaja de poder conocer con exactitud el antígeno que compone el ensayo y puede usarse una combinación de antígenos para lograr mayor sensibilidad. Por otro lado, la obtención de estos antígenos a través de técnicas de biología molecular ayudaría a evitar el riesgo de contaminación del personal encargado al estar en contacto con el parásito y disminuiría los tiempos y costos de producción [112].

En este capítulo se muestran los resultados del análisis de antigenicidad de los antígenos obtenidos en el capítulo anterior, mediante la técnica de IgG- ELISA.

Capítulo 4

Este análisis no solo se realizó con el objetivo de estudiar la capacidad de estos antígenos de discriminar entre la fase aguda y crónica de la infección por *T. gondii*, sino que también, en el diagnóstico temprano de TV.

4.2. Resultados y Discusión

4.2.1. Perfil de anticuerpos específicos en ratones infectados con *T. gondii*

La antigenicidad se basa en la interacción real entre un anticuerpo y un antígeno, y de esta forma un epítipo adquiere identidad cuando un anticuerpo puede unirse a él. Esta interacción involucra tanto los aminoácidos polimórficos que comprenden el epítipo como otras configuraciones cruciales de aminoácidos polimórficos que actúan como sitios de contacto [113]. Por lo tanto, se realizó un IgG-ELISA, con sueros de ratones infectados con la cepa ME49 de *T. gondii*, para determinar si las proteínas recombinantes son reconocidas por los anticuerpos específicos presentes en el suero. En total se inocularon 15 ratones C57BL/6 y se analizaron los niveles de anticuerpos IgG circulantes a los días 0, 7, 15, 21 y 30 post-infección mediante un test de IgG-ELISA.

Dubey *et al.* (1997) propuso un modelo del desarrollo del ciclo de *T. gondii* en distintos órganos de ratones inoculados con quistes/bradizoitos de este parásito, en donde determinó que la conversión de bradizoitos a taquizoito ocurre a las 6 horas post-infección (h.p.i.) y después de las 24 h.p.i. hasta los 6 días post-infección (d.p.i.) se producía la diseminación del parásito por el organismo llegando a invadir los pulmones, el cerebro y otros órganos [120]. Desde los 6 d.p.i. en adelante comienza a aparecer quistes tisulares, lo que genera el comienzo del pasaje de la fase aguda a la fase crónica de la infección [120]. Por otro lado, Aviles *et al.* (2008) estableció que aproximadamente a los 20 d.p.i. el ratón llegaba a controlar la infección [121].

Con el objetivo de estudiar el valor antigénico de rGra17, r200360, r310790 y r313640, se analizó la respuesta humoral en ratones experimentalmente infectados y, además, se comparó con la respuesta observada por los antígenos ya conocidos (rGra4, rGra7, rGra8, rRop2 y rMic1). En la Figura 4.2.1 se puede observar como aumentan los niveles de anticuerpos a partir del 7 d.p.i. y continúa

aumentando hasta los 30 d.p.i. Esto es similar a lo obtenido por *Aviles et al.* (2008), en donde se inocularon ratones C57BL/6 con la cepa ME49 de *T. gondii* y pudieron observar que los niveles de anticuerpos IgG circulantes aumentaban a partir del 10 d.p.i. y continuaban aumentando hasta los 30 d.p.i. [121].

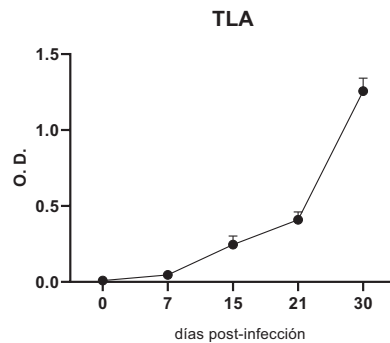


Figura 4.2.1: Ensayo IgG-ELISA para analizar la respuesta humoral en ratones infectados con *T. gondii* a diferentes tiempos post-infección. Cada placa se sensibilizó con 5 $\mu\text{g/ml}$ de TLA. Los sueros se usaron en una dilución 1:100. Cada punto representa la media \pm el error medio estándar.

Luego de determinar los niveles de anticuerpos IgG anti-antígenos de *T. gondii* totales, se procedió a estudiar la presencia de anticuerpos IgG específicos para cada antígeno recombinante utilizado en el presente trabajo. La Figura 4.2.2 muestra resultados obtenidos para rGra4, rGra7 y rGra8. El perfil es similar para los tres antígenos, en el cual se observa que a partir de los 7 d.p.i. comienzan a aumentar los niveles de anticuerpos específicos, llegando a un pico máximo e iniciando a descender a los 21 d.p.i.

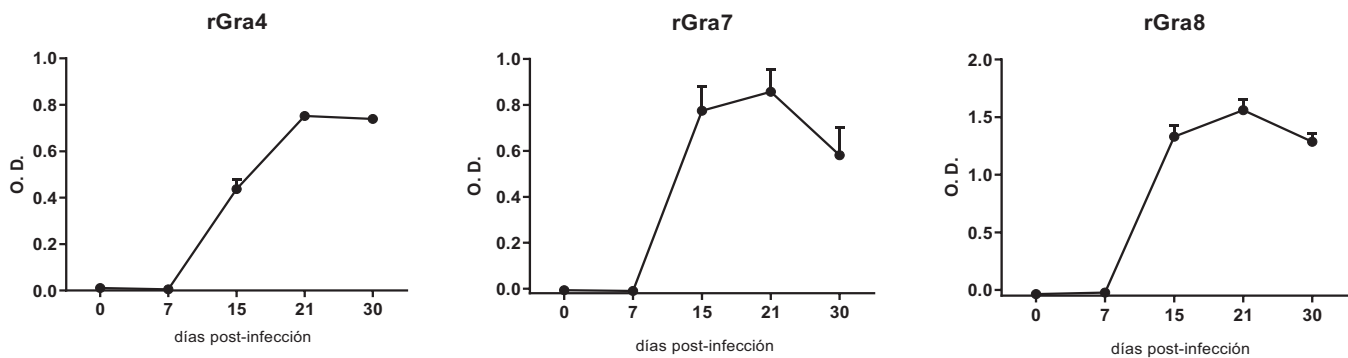


Figura 4.2.2: Ensayo IgG-ELISA para determinar la cinética de anticuerpos específicos para rGra4, rGra7 y rGra8 en ratones infectados con *T. gondii*. Cada placa se sensibilizó con 5 µg/ml de cada antígeno recombinante. Los sueros se usaron en una dilución 1:100. Cada punto representa la media ± el error medio estándar.

Gatkowska *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares cuando analizaron rGra7 y rGra8 mediante ELISA con sueros de ratones infectados intraperitonealmente con la cepa DX de *T. gondii*. Los sueros fueron recolectados a los 7, 21 y 56 d.p.i., y el pico máximo de absorbancia para ambos antígenos se observó al día 21 [122]. Todos estos resultados muestran que estos tres antígenos reaccionan principalmente con sueros en fase aguda y los niveles de anticuerpos comienzan a decaer en el momento en que el ratón llega a controlar la infección; sugiriendo que podrían ser de utilidad en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis.

A diferencia de lo obtenido con rGra4, rGra7 y rGra8, r310790 alcanza un pico máximo en los niveles de anticuerpos anti-r310790 a los 15 d.p.i. y disminuyen notablemente hacia la fase crónica de la infección. Estos resultados sugieren que este antígeno puede ser de mucha utilidad en detectar tempranamente la infección por *T. gondii*.

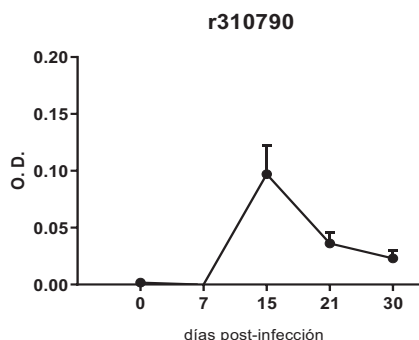


Figura 4.2.3: Ensayo IgG-ELISA para determinar la cinética de anticuerpos específicos para r310790 en ratones infectados con *T. gondii*. La placa se sensibilizó con 5 µg/ml del antígeno recombinante. Los sueros se usaron en una dilución 1:100. Cada punto representa la media ± el error medio estándar.

Con respecto a rGra17, r313640 y r200360, el perfil obtenido demuestra que estos antígenos no estarían interaccionando con el sistema inmune del huésped y no se generaría una respuesta humoral significativa en el período de tiempo analizado.

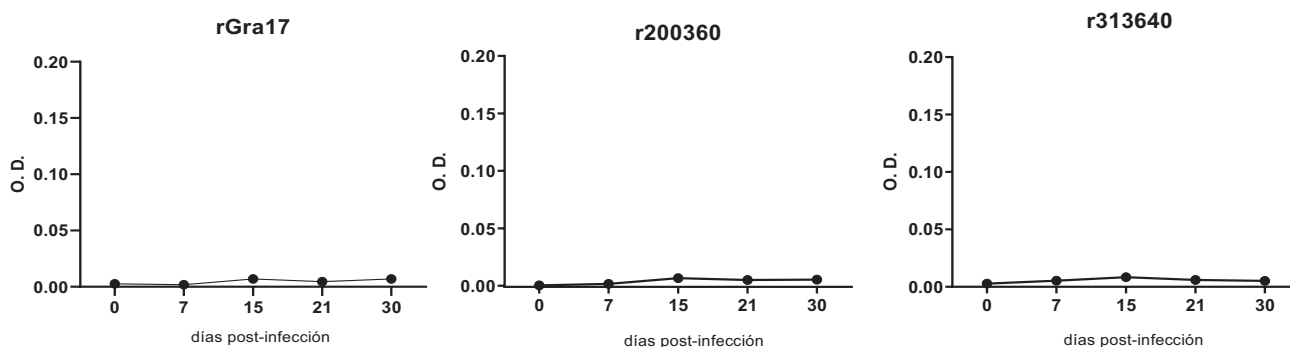


Figura 4.2.4: Ensayo IgG-ELISA para determinar la cinética de anticuerpos específicos para rGra17, r200360 y r313640 en ratones infectados con *T. gondii*. Cada placa se sensibilizó con 5 µg/ml de cada antígeno recombinante. Los sueros se usaron en una dilución 1:100. Cada punto representa la media ± el error medio estándar.

rRop2 presenta un perfil similar a rGra4, rGra7 y rGra8 (Figura 4.2.5), en donde los niveles de anticuerpos comienzan a aumentar a los 7 d.p.i., alcanzando un máximo a los 21 d.p.i., a partir de cual inician a decaer. Esto concuerda con lo observado por Gatkowska *et al.* (2010) mediante ELISA con sueros de ratones infectados intraperitonealmente con la cepa DX de *T. gondii*, en donde los niveles de anticuerpos alcanzaban un máximo a los 21 d.p.i. [123]. Esto indica que rRop2 induce una respuesta humoral que varía de acuerdo a la fase de la infección, pudiendo ser considerado también en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis. Por último, rMic1 muestra un perfil similar al observado para TLA. Los niveles de anticuerpos continúan aumentando más allá de los 21 d.p.i., lo que podría clasificarlo como un antígeno que podría utilizarse para determinar la respuesta humoral hacia el parásito tanto en el estadio de taquizoito como de bradizoito.

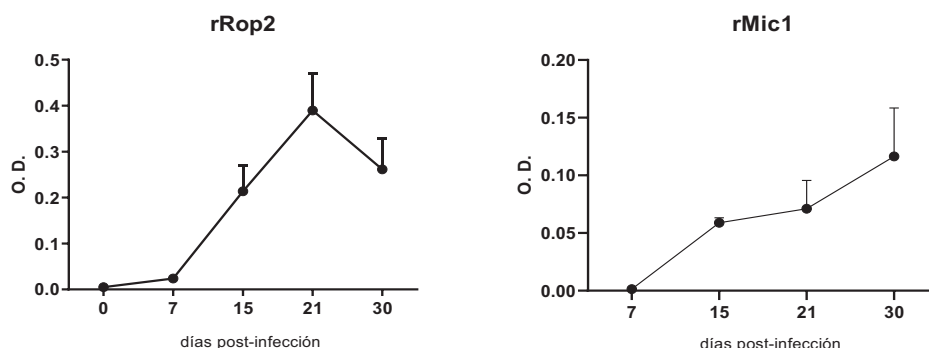


Figura 4.2.5: Ensayo IgG-ELISA para determinar la cinética de anticuerpos específicos para rRop2 y rMic1 en ratones infectados con *T. gondii*. Cada placa se sensibilizó 5 µg/ml de cada antígeno recombinante. Los sueros se usaron en una dilución 1:100. Cada punto representa la media ± el error medio estándar.

4.2.2. Detección diferencial de IgG de fase aguda y de fase crónica

Para poder estudiar la capacidad de cada antígeno de discriminar entre IgG de fase aguda y de fase crónica, se utilizaron sueros de mujeres embarazadas en fase aguda y crónica de la infección, y muestras seronegativas provenientes del laboratorio de toxoplasmosis del Hospital Alemán (CABA) [117]. En total se utilizaron 176 sueros, de los cuales 52 son negativos (IgG-/IgM-), 64 en fase crónica de la infección (IgG+/IgM-) y 60 en fase aguda (IgG+/IgM+). Los resultados del IgG-ELISA se resumen en la Tabla 4.2.2 (Ver también Anexo: Sección 5.4, con los valores de O.D.).

Estos resultados indican que tanto rGra4, rGra7 y rGra8, siendo proteínas importantes para el ciclo lítico del parásito, tienen una mayor reactividad con los sueros en fase aguda comparados con los de fase crónica. Esto concuerda con lo obtenido por Nigro *et al.* (2003), donde se demostró la capacidad de estos antígenos de reaccionar principalmente con sueros de pacientes en fase aguda de la infección [117].

Antígeno recombinante	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	
		Agudos	Crónicos
rGra4	98.08	76.67	17.19
rGra7	96.15	91.67	17.18
rGra8	98.08	86.66	15.62
r310790	98.1	36.7	6.25
r200360	98.08	3.33	4.69
r313640	100	0	1.59
rGra17	100	1.67	3.14
rRop2	100	83.33	23.44
rMic1	98.08	73.33	21.88
rGra4-Gra7	98.08	71.67	23.44
rRop2-Gra4	100	53	18.75

Tabla 4.2.2: Reactividad de las proteínas recombinantes con sueros de individuos con infección toxoplásmica, en fase aguda, crónica y muestras seronegativas como control.

De los nuevos antígenos de gránulos densos estudiados en esta tesis, sólo r310790 muestra serorreactividad, en su mayoría con sueros de fase aguda pero notablemente menor en comparación con rGra4, rGra7 y rGra8. Por otra parte, rGra17, r200360 y r313640 no reaccionan con los sueros en ninguna de las fases de la infección, similar a lo obtenido en la sección anterior en donde no se ha observado una reactividad con los sueros de ratones infectados experimentalmente. rRop2 también presenta una mayor reactividad con sueros en fase aguda, al igual que lo demostrado por Nigro *et al.* (2003), pero con una reactividad a los sueros crónicos ligeramente superior al resto de los antígenos [117]. rMic1 tiene una serorreactividad similar a rRop2, demostrando ambos la capacidad de discriminar entre fase aguda y crónica, pero en menor medida que rGra4, rGra7 o rGra8. Las dos quimeras ensayadas en este trabajo, no mostraron mejorar la detección de anticuerpos de fase aguda en comparación con los antígenos analizados de manera individual.

4.2.3. Análisis cinético de la respuesta humoral en bebés con TV

En esta sección se estudió la utilidad de los antígenos recombinantes en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita. Dado al pequeño volumen disponibles de las muestras, este ensayo se realizó sólo con aquellos antígenos que no han sido estudiados con sueros de pacientes con TV (rGra8, rMic1, rGra4-Gra7 y rRop2-Gra4). A su vez, también se evaluó r310790 ya que presenta una reactividad con sueros en fase aguda, tanto en ratones como en pacientes infectados con *T. gondii*. Se descartaron rGra17, r200360 y r313640 por no presentar seroreactividad con las muestras de sueros en ninguna de las fases de la infección. Por otro lado, Altech *et al.* (2006), demostraron que tanto rGra4 como rGra7 son capaces de diferenciar significativamente bebés con TV de NI, principalmente en pacientes menores de 4 meses [124]. En bebés NI, los anticuerpos específicos contra estos dos antígenos decaen a niveles indetectables a diferentes tiempos. Esta negatividad temprana en estos pacientes puede ser debido a que estos antígenos generan una fuerte respuesta humoral predominantemente en la fase aguda de la infección.

Para este análisis se utilizaron 38 muestras de sueros de 7 bebés con TV, con una edad media de $3,46 \pm 2,72$ meses, y 46 muestras de sueros de 10 bebés con una edad media de $2,1 \pm 2,47$ meses. Estas muestras no se tomaron de manera sincronizada por lo que el número de sueros recolectadas en cada tiempo varía entre los bebés (Ver anexo: Sección 5.5, Tabla 5.5.1 con los datos de los pacientes).

Los resultados obtenidos muestran que las muestras de sueros de bebés con TV reaccionaron con rGra8, rMic1 y rGra4-Gra7 durante todo el seguimiento y es mayor a la observada con los sueros de bebés NI. Además, prácticamente todas las muestras de los bebés NI eran negativas a los dos meses de edad (Figura 4.2.6 A). Es importante destacar, que el valor observado en los bebés con TV a los 3 meses de edad es distinto a los demás y esto posiblemente se deba a que solo se ha analizado una muestra a esa edad. Los niveles de anticuerpos específicos contra estos antígenos mostraron una correlación entre madres y bebés, y entre TV y NI, al menos en sueros que pertenecían al primer mes de edad.

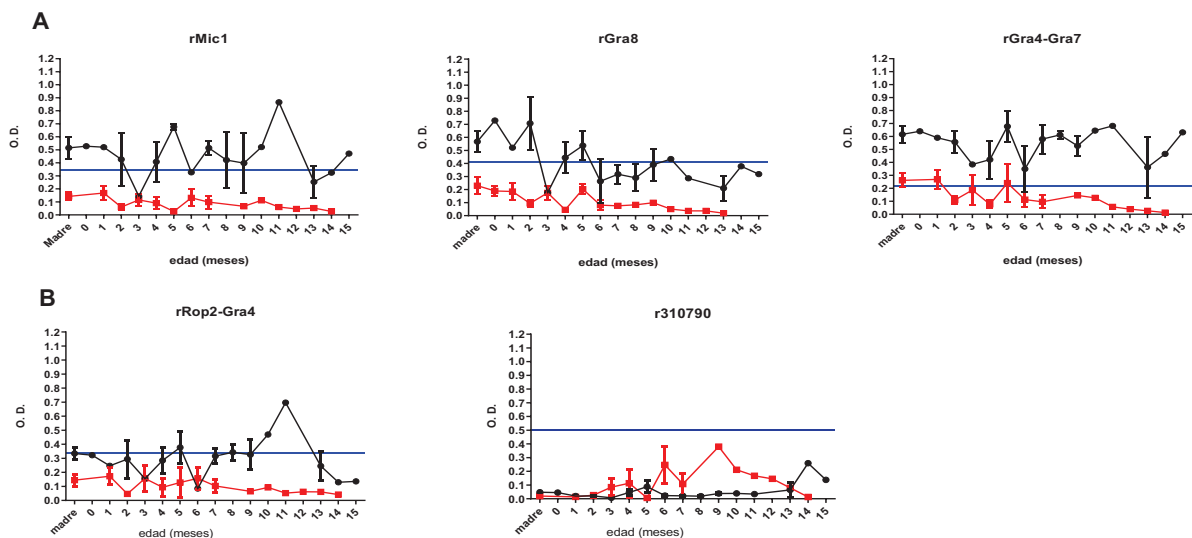


Figura 4.2.6: Perfil cinético de la respuesta de anticuerpos IgG contra los antígenos recombinantes en bebés con TC y NI. **A:** rMic1, rGra8 y rGra4-Gra7. **B:** eRop2-Gra4 y r 310790. En negro: muestras de sueros de 7 bebés con TC. En rojo: muestras de sueros de 10 bebés NI. Se incluyeron también las muestras de las madres, tomadas al mismo día de la primera muestra del bebé. Cada punto representa la media \pm error medio estándar. La línea azul representa el *cutoff*, calculado como la media de 11 sueros negativos de niños NI + 3 desviaciones estándar.

Sin embargo, estos niveles de IgG disminuyen rápidamente en bebés NI que presentan títulos altos de anticuerpos provenientes de la madre. En contraste, algunos sueros de niños con TV muestran un incremento de la reactividad en los primeros meses de edad, especialmente con rGra4-Gra7 y rMic1. En cambio, r310790 y rRop2-Gra4 mostraron perfiles de reactividad similares entre ellos, con la mayoría de los sueros que se encuentran por debajo o muy cerca al *cutoff* (Figura 4.2.6 B).

En general, los estudios basados en el diagnóstico de la infección congénita emplean sueros de bebés con TV y NI provenientes de los primeros meses de vida. No obstante, en esos casos el diagnóstico se ve interferido por la presencia de anticuerpos IgG anti-*T. gondii* pertenecientes a la madre. En esta tesis se tuvo en cuenta los títulos de las IgG de la madre al momento de evaluar la capacidad de los antígenos recombinantes para discriminar entre niños con TV y NI. De todos modos, los niveles de IgG específicos para cada antígeno disminuye rápidamente en sueros de niños NI con madres que presentan altos niveles de IgG (Ver Anexo, Sección 5.5: Figura 5.5.1, Figura 5.5.2 y Figura 5.5.3).

Debido a que las muestras de los sueros se obtuvieron a diferentes tiempos, el análisis comparativo fue difícil de implementar. Por lo tanto, para estimar el valor diagnóstico de cada antígeno se examinó el tiempo en el cual se produce la seronegatividad de las muestras. La frecuencia de la pérdida de serorreactividad de cada antígeno se determinó basándose en la edad (en meses) en la cual se detecto la primera muestra negativa mediante ELISA. Cabe destacar, que en algunos casos hubo un intervalo largo entre los tiempos de recolección de las muestras, dificultando la determinación de la edad exacta a la cual una muestra se negativiza para cada antígeno. Al mismo tiempo, basándonos en el diagnóstico estándar de la TV (por ejemplo, serorreactividad promedio hasta los 5-7 meses de vida) todas las muestras con serorreactividad a los 7 meses de vida, se agruparon juntas.

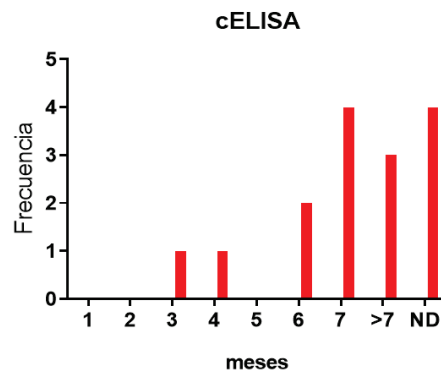


Figura 4.2.7: Pérdida de reactividad contra los antígenos de los sueros de bebés NI, según el diagnóstico de rutina llevado a cabo en el laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil Ricardo Gutiérrez (cELISA). Las barras rojas representan las muestras de bebés NI. **ND:** no determinado (casos que fueron positivos dentro de los 7 meses de edad, pero para los cuales no se dispuso de muestras de sueros después de los 7 meses y, por lo tanto, no se pudo determinar el momento en el que se perdió la seroreactividad).

Luego de este ordenamiento y análisis de los datos, se pudo determinar que rMic1 tiene el mejor rendimiento, con la mayor frecuencia de sueros NI negativos entre 1-2 meses de edad, y la frecuencia más alta o la más cerca a la más alta de sueros con IC positivos a edades mayores a los 7 meses. rGra8 y rGra4-Gra7 tienen patrones similares entre sí (Figura 4.2.8 A). En contraste, r310790 y rRop2-Gra4 tienen muchos sueros de niños con TV negativos a temprana edad (Figura 4.2.8 B). Como era de esperar, hubo muchos sueros NI positivos luego de los 5 meses de edad con el cELISA, usado de rutina por el laboratorio del Hospital.

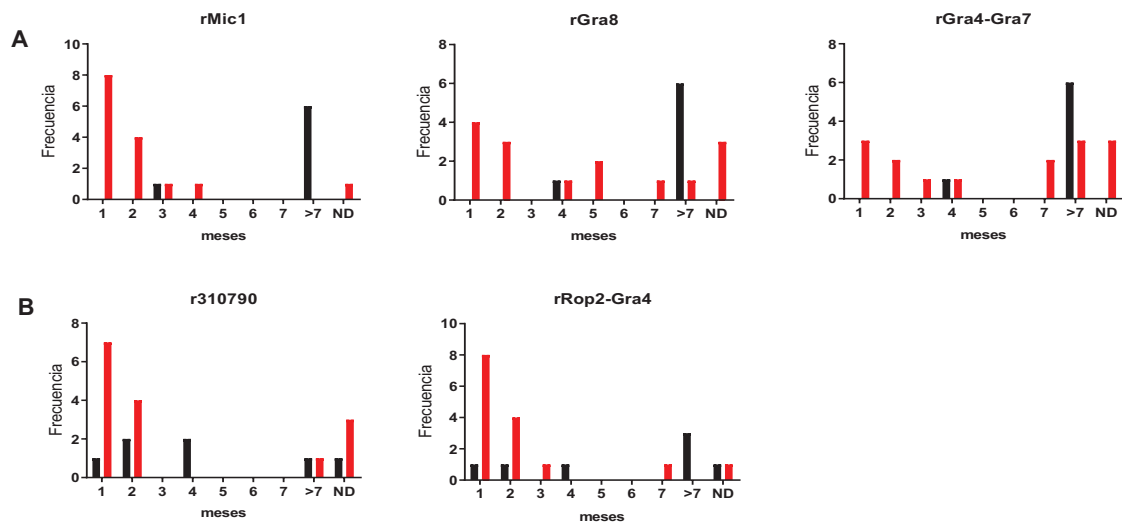


Figura 4.2.8: Pérdida de reactividad contra los antígenos de los sueros de bebés TC y NI. Las barras negras representan las muestras de bebés TC. Las barras rojas representan las muestras de bebés NI. **ND:** no determinado (casos que fueron positivos dentro de los 7 meses de edad, pero para los cuales no se dispuso de muestras de sueros después de los 7 meses y, por lo tanto, no se pudo determinar el momento en el que se perdió la seroreactividad).

4.3. Conclusiones

La toxoplasmosis es considerada una enfermedad desatendida no solo en países en desarrollo sino también en países desarrollados como Estados Unidos [17] [125] [126] [127]. Por lo tanto, el desarrollo de un test simple y rápido que permita el diagnóstico temprano de la toxoplasmosis es de gran importancia para la aplicación de un tratamiento adecuado y reducir las consecuencias que esto puede producir en el paciente. Hasta la fecha se han estudiado diversos antígenos como posibles marcadores de infección reciente en mujeres embarazadas con distintos resultados [77]. En la presente tesis se identificaron diversos antígenos, pertenecientes al sistema ESA del parásito, con capacidad de discriminar entre la fase aguda y crónica de la infección por *T. gondii* en sueros de mujeres embarazadas, siendo rGra7 el que mejor rendimiento posee, demostrando ser de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis. Si bien, rGra4 al igual que rGra7, mostró una mayor reactividad con sueros en fase aguda, la fusión de estos antígenos para formar la quimera rGra4-Gra7 no mejoró la sensibilidad para la detección de la fase aguda en pacientes con toxoplasmosis reciente. Una posible explicación es que ambos antígenos poseen sensibilidades similares; es decir que, las muestras de sueros de fase aguda que son negativas para una proteína también son negativas para la otra y, por lo tanto, su combinación no aumenta la sensibilidad. Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico temprano de TV estuvo en línea con las expectativas.

Además, se identificaron 2 nuevos antígenos y una proteína quimera como posibles marcadores tempranos de infección congénita, los cuales son rMic1, rGra8 y rGra4-Gra7, para ser incorporados al panel existente. El resto de los antígenos analizados (rGra17, r310790, r200360, r313640 y rRop2-Gra4) fueron descartados ya que no poseen valor clínico para el diagnóstico de la TV y de la toxoplasmosis en general. Este estudio se suma a los pocos estudios realizados hasta el momento en este campo, los cuales se focalizaron principalmente en rSag1, rMic2, rGra4 y rGra7 [124] [128].

Nuestro modelo de detección temprana de TV está basado en el hecho de que la respuesta humoral en contra de una proteína en particular se genera durante la fase aguda pero rápidamente decae y es negativa en pacientes NI que presentan anticuerpos maternos. En este contexto, era esperable la utilidad de rGra8 como posible marcador de TV, debido a lo observado en esta tesis, y a lo reportado por Li *et al* (2000), en donde se demostró que es un marcador de fase aguda en pacientes con toxoplasmosis reciente al igual que rGra4 y rGra7 [118]. Estos últimos dos antígenos mencionados, exhiben perfiles cinéticos consistentes con los de un marcador de fase aguda en bebés NI, con una pérdida de reactividad a los 0.9 y 1.7 meses de vida, respectivamente [124]. En este estudio, se observó que rGra8 presenta un perfil de anticuerpos similar al de rGra4-Gra7. Casi todas las muestras de niños con TV mostraron reactividad a rGra8 y rGra4-Gra7 a lo largo del primer año de vida mientras que las muestras de los niños NI fueron negativas. A su vez, rMic1 resultó ser un marcador interesante para la detección de la TV temprana. Previamente, rMic1 fue detectada en pacientes con toxoplasmosis adquirida [130], pero no había sido identificado como marcador específico de fase aguda. Nuestros resultados mostraron que, rMic1 tiene un valor de sensibilidad intermedio para distinguir entre fase aguda y crónica de la infección. Esta discrepancia entre los resultados y los reportados previamente pueden ser atribuidos a la región de rMic1 empleada y/o a las diferencias en los valores de los títulos de las muestras entre los estudios.

Para identificar nuevos antígenos útiles para el diagnóstico de la toxoplasmosis aguda y congénita, se evaluaron diversas proteínas involucradas en el ciclo lítico del parásito, con un mayor enfoque en aquellas que pertenecen a gránulos densos, basados en el hecho que son altamente expresadas por el parásito y se encuentran en circulación en pacientes con infección reciente siendo de esta forma de mayor relevancia en la respuesta inmune del huésped [107]. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en esta tesis, es interesante remarcar como algunas de estas proteínas de gránulos densos generan una respuesta humoral mientras que otras no. En consecuencia, la antigenicidad de una proteína no se puede predecir en base a la residencia en el mismo compartimiento subcelular

que las proteínas con alto valor antigénico, a pesar de ser expuestas a las mismas condiciones en el momento de la infección. En ese sentido, es interesante destacar que r310790 pareciera ser una proteína que solo estaría en gránulos densos en su fase extracelular. Como incide esa particularidad en la respuesta humoral generada es desconocido. Sin embargo, esto nos indica que debiéramos confirmar la localización subcelular de las proteínas r200360 y r313640 para poder relacionar su posible localización en GD y, en este caso, falta de antigenicidad.

A diferencia de lo observado con rGra8 y rGra4-Gra7, r310790 no tiene utilidad en el diagnóstico de TV; sin embargo, si mostró una reactividad de 36.7% y 6.25% con sueros de pacientes en fase aguda y crónica respectivamente. Interesantemente, el perfil de IgG obtenido en ratones muestra un pico en el comienzo de la fase aguda, para luego disminuir rápidamente en la fase crónica. Se requieren posteriores análisis para determinar si esto refleja una función de r310790 en una etapa muy temprana de la infección aguda o si está asociado con un evento clínico específico.

En todos los bebés con TV, la respuesta humoral contra rGra8, rMic1 y rGra4-Gra7 disminuyen durante el primer año de vida, consistente con la cinética de infección aguda. Lo que demuestra su utilidad en el diagnóstico de toxoplasmosis congénita.

Por lo mencionado hasta el momento, en esta tesis se buscó emplear antígenos recombinantes de *T. gondii* para el desarrollo de un método diagnóstico que se pueda implementar en el seguimiento de la mujer embarazada y el recién nacido. El empleo de esta metodología tiene como finalidad mejorar los algoritmos de seguimientos actuales, ya que los mismos requieren de la extracción de más de una muestra de sangre y la realización de distintos ensayos para determinar el estado de la infección del paciente aumentando los tiempos y costos del diagnóstico. El método propuesto se basa en la detección, principalmente, de inmunoglobulinas G, tanto de fase aguda como las generadas solamente por el recién nacido, que podría resultar en un ensayo que requiera una sola extracción de sangre, no se necesite trasladar la muestra largas distancias a laboratorios

Capítulo 4

especializados y no requiera equipamientos costosos. Todo esto permitiría obtener un diagnóstico exacto y en un lapso de tiempo más reducido. Además, la combinación entre marcadores de fase aguda y crónica, podría permitir el análisis de un mayor número de muestras para estudios poblacionales.

4.4. Materiales y Métodos

4.4.1. Sueros de ratones infectados con *T. gondii*

15 Ratones C57BL/6 hembras, de entre 6 y 8 semanas, se obtuvieron del bioterio central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires; los cuales fueron mantenidos según los lineamientos institucionales de la Universidad de General San Martín y su uso fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (CICUAE IIB-UNSAM, 09/2016). Los ratones tuvieron libre acceso a comida y agua y se mantuvieron a una temperatura de 21-22°C, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Estos fueron infectados con 20 quistes de la cepa ME49 de *T. gondii* vía oral, para imitar el modo natural de infección, según lo descrito por Laguía-Becher *et al* (2010) [130]. Las muestras de suero fueron recolectadas de cada ratón antes de la infección (Día 0), 7 días, 14 días (Fase aguda de la infección), 21 días y 30 días (fase crónica de la infección) post-infección. Los ratones se sacrificaron a los 30 días post-infección en una cámara de CO₂ y se analizó la presencia de quistes en el cerebro por microscopía. Finalmente, se analizaron los niveles de anticuerpos IgG totales de cada ratón mediante la técnica de IgG-ELISA utilizando TLA como antígeno. Los sueros se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4.4.2. Obtención de TLA de *T. gondii*

El TLA se obtuvo a partir de taquizoitos de la cepa RH (Tipo I) de *T. gondii*, crecidos *in vitro* como se mencionó en la sección 3.4.1 (Capítulo 3). Brevemente, los taquizoitos fueron resuspendidos en agua ultra pura a 4°C, con una densidad de 10⁸ taquizoitos/ml y se sonicaron (pulsos de 10 s ON con intervalos de 30 s OFF, durante 1 min) usando un procesador ultrasónico (Vibra Cell™; Sonic, Newtown, CT, USA) hasta que las células fueran completamente lisadas. Luego, se agregó un volumen de NaCl 0.3M y se centrifugo a 10000xg durante 5 minutos a 4°C. Se

conservó el sobrenadante que contiene los antígenos totales, se cuantificó mediante la técnica de Bradford y se almacenó a -80°C hasta su uso.

4.4.3. IgG-ELISA con sueros de ratones infectados con *T. gondii*

Placas de ELISA MaxiSorp multiwell (Nunc, Roskilde, Denmark) se sensibilizaron toda la noche a 4°C con TLA o con los antígenos recombinantes (rGra4, rGra7, rGra8, r310790, r200360, rGra17, r313640, rRop2 y rMic1) a una concentración final de $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ en buffer de adhesión ($50\ \text{mM NaHCO}_3$, pH 9.6). Tras esta incubación, las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado (0.05% Tween-20 en PBS) y se bloquearon con $200\ \mu\text{l}$ de solución de bloqueo (5% de leche descremada en 0.05% Tween-20-PBS), 1 hora a 37°C . Posteriormente, se agregó un volumen de $100\ \mu\text{l}$ de suero (diluido 1:100 en solución de bloqueo) a cada well, seguido de una incubación de 1 hora a 37°C . Luego de lavar las placas 3 veces con buffer de lavado, se incubaron con un volumen de $100\ \mu\text{l}$ por well con anticuerpo anti-mouse IgG conjugado con HRP (Sigma-Aldrich) diluido 1:3000 en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C . Finalmente, luego de lavar las placas 3 veces con solución de lavado, se agregó un volumen de $50\ \mu\text{l}$ de TMB a cada well y se incubaron 20 min a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a $655\ \text{nm}$ en un lector de placas multiuso (Synergy hybrid microplate reader. Biotek, Winooski, VT, USA).

4.4.4. Sueros de pacientes con serología positiva para *T. gondii*

Para poder analizar la utilidad de cada antígeno recombinante en el diagnóstico diferencial de la toxoplasmosis, se obtuvieron un total de 176 sueros provenientes del laboratorio de Toxoplasmosis del Hospital Alemán, CABA, como se describe en [117]. Los mismos se clasificaron en tres grupos: 52 seronegativos (IgG-/IgM-), 64 sueros en fase crónica (IgG+/IgM-) y 60 sueros en fase aguda de la infección (IgG+/IgM+). Además, en los pacientes agudos se realizó la prueba de avididad para confirmar una infección reciente; en aquellos pacientes en donde la

avidez no era determinante, se analizó la presencia de IgA e IgE para confirmar una infección reciente.

Además, 38 muestras de sueros de 7 pacientes con diagnóstico de TC, con un promedio de edad de 3.46 ± 2.72 meses, y 46 muestras de sueros de 10 bebés NI con un promedio de edad de 2.1 ± 2.47 meses fueron incluidos en este trabajo. Estos pacientes son bebés con diagnóstico sospechoso de infección por *T. gondii* (con signos clínicos de TC y/o niveles de IgG reactivos altos tanto en la madre como en el lactante) y fueron tratados en el Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil Ricardo Gutiérrez, CABA. Todos estos pacientes fueron evaluados con ensayos diagnósticos de rutina, disponibles comercialmente mediante un ensayo de detección de IgG ELFA (VIDAS TOXO IgG II; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) y ELFA de inmunocaptura de IgM (VIDAS TOXO IgM).

El protocolo del estudio fue revisado por el comité de Investigación y Docencia, y el Comité de Bioética del Hospital Infantil "Ricardo Gutiérrez", y el Comité de la Secretaría de Investigaciones con Sujetos Humanos (DI-2014-221). Es importante destacar que las muestras de suero empleadas en este trabajo se obtuvieron en el marco de los controles clínicos y bioquímicos habituales durante el seguimiento de los pacientes. Estas muestras se conservaron a -20°C , con codificación y adecuada protección de los datos personales.

4.4.5. IgG-ELISA con sueros de pacientes con serología positiva para *T. gondii*

Placas de ELISA MaxiSorp multiwell (Nunc, Roskilde, Denmark) se sensibilizaron toda la noche a 4°C con los antígenos recombinantes (rGra4, rGra7, rGra8, r310790, r200360, rGra17, r313640, rRop2 y rMic1) y las quimeras (rGra4–Gra7 and rRop2–Gra4) a una concentración final de $5 \mu\text{g/ml}$ en buffer de adhesión (50 mM NaHCO_3 , pH 9.6). Tras la incubación, las placas se lavaron 3 veces con buffer de lavado (0.05% Tween-20 en PBS) y se bloquearon con $200 \mu\text{l}$ de solución de bloqueo (5% de leche descremada en 0.05% Tween-20-PBS), 1 hora a 37°C .

Posteriormente, se agregó un volumen de 100 μ l de cada suero por well (diluido 1:100 en solución de bloqueo), seguido de una incubación de 1 hora a 37°C. Luego de lavar las placas 3 veces con buffer de lavado, se incubaron con un volumen de 100 μ l por well con anticuerpo anti-human IgG conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) en solución de bloqueo durante 1 hora a 37°C. Finalmente, luego de lavar las placas 3 veces con solución de lavado, se agregó un volumen de 50 μ l de TMB a cada well y se incubaron 20 min a temperatura ambiente antes de medir la absorbancia a 655 nm en un lector de placas multiuso (Synergy hybrid microplate reader. Biotek, Winooski, VT, USA). Se tomó como valor final la OD de los pocillos medidos por duplicado. Una muestra se considera positiva si el valor final de OD es superior al valor del *Cutoff*, calculado como la media de los valores de OD de las muestras negativas más 3 DS. Las concentraciones óptimas de cada antígeno, la dilución de cada suero y del anticuerpo secundario fueron determinadas mediante la técnica de titulación *chessboard/checkboard* [131]. Para cada antígeno recombinante se calcularon los valores de Especificidad ($E = VN/(FP+VN)$) y los valores de sensibilidad a sueros con infección crónica (SIC. $SIC = VP/(VP+FN)$) y a sueros con infección aguda (SIA. $SIA = VP/(VP+FN)$) [132].

Anexo

Fecha Epidemiológica Toxoplasmosis			N° INTERNO			
FECHA	Día	Mes	Año			
<table border="1" style="margin: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30px; height: 20px;"></td> <td style="width: 30px; height: 20px;"></td> <td style="width: 30px; height: 20px;"></td> </tr> </table>						
DATOS DEL PACIENTE						
Apellidos:		Nombres:				
Edad:		TE:				
Edad gestacional:		Suero (Nro):				
DNI:		Inicio de tratamiento:				
Fecha probable de parto:						
DATOS DEL SOLICITANTE						
Apellido y nombre:		Mail de contacto:				
Sector solicitante:		Teléfono:				
DATOS EPIDEMIOLOGICOS						
Lugar de nacimiento:		País:				
Lugar de residencia:		País:				
Residencia: <u>Siempre urbano</u> <input type="checkbox"/> <u>Rural y Urbano</u> <input type="checkbox"/> <u>Rural</u> <input type="checkbox"/>						
Realiza trabajos de jardinería? No <input type="checkbox"/>		Cria animales No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/>				
1 vez p/sem. <input type="checkbox"/> Más de 1 vez <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez <input type="checkbox"/>		Fuente de agua en el hogar: Red <input type="checkbox"/> Pozo <input type="checkbox"/>				
Posee gato Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
Vegetariano Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
Consumo carne de Vaca? No <input type="checkbox"/>		1 vez p/semana <input type="checkbox"/> Más de 1 vez <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez <input type="checkbox"/>				
Consumo carne de pollo? No <input type="checkbox"/>		1 vez p/semana <input type="checkbox"/> Más de 1 vez <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez <input type="checkbox"/>				
Consumo carne de cerdo? No <input type="checkbox"/>		1 vez p/semana <input type="checkbox"/> Más de 1 vez <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez <input type="checkbox"/>				
Consumo carne de oveja? No <input type="checkbox"/>		1 vez p/semana <input type="checkbox"/> Más de 1 vez <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez <input type="checkbox"/>				
Consumo embutidos? No <input type="checkbox"/>		1 vez p/semana <input type="checkbox"/> Más de 1 vez <input type="checkbox"/> Menos de 1 vez <input type="checkbox"/>				
DATOS CLINICOS						
Tiene síntomas: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>						
Fiebre: <input type="checkbox"/>		Encefalitis <input type="checkbox"/> Cefalea <input type="checkbox"/>				
Linfoadenopatía: <input type="checkbox"/>		Uveítis/corioretinitis <input type="checkbox"/> Recibió Transplan/Tranfus <input type="checkbox"/>				
Abortos espontáneos: <input type="checkbox"/>		Alteraciones motoras <input type="checkbox"/>				
Otros:						
Observaciones:						
RESULTADOS DE LABORATORIO						
1er suero (títulos)/Fecha:		2do suero (títulos)/Fecha:				
IgG:		3er suero (títulos)/Fecha:				
IgM:						
Otras serologías (Ej. Avidéz):						
Observaciones/Tratamiento:						

Tabla 5.1: Ficha epidemiológica completada por mujeres embarazadas en el hospital Municipal San Vicente de Paul, Chascomús, entre abril del 2016 y diciembre 2017.

Sección 5.1

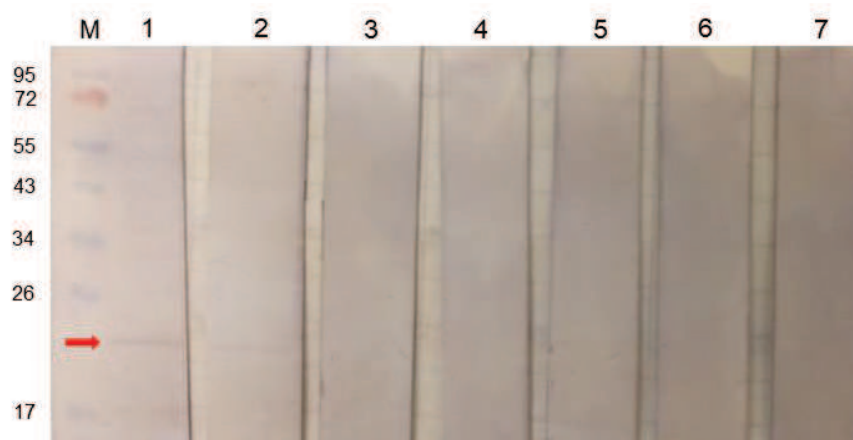


Figura 5.1.1: Western blot con un lisado total de antígenos de *T. gondii*. Se sembraron 2×10^6 parásitos por calle. Líneas: **M:** marcador de peso molecular. **1:** anti-310790 1:200. **2:** anti-310790 1:1000. **3:** anti-310790 1:5000. **4:** Pre-inmune 1:200. **5:** Pre-inmune 1:1000. **6:** Pre-inmune 1:5000. **7:** Anticuerpo anti-IgG totales conjugado con fosfatasa alcalina 1:15000.

Sección 5.2

- Gra7

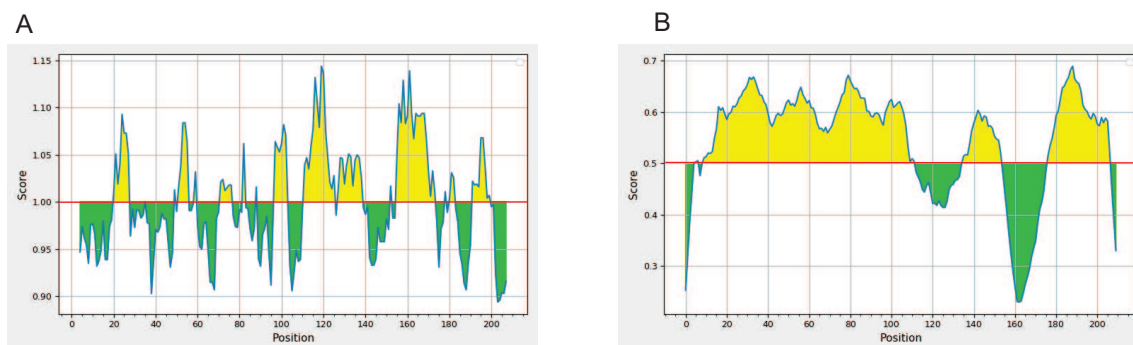


Figura 5.2.1: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- rGra4

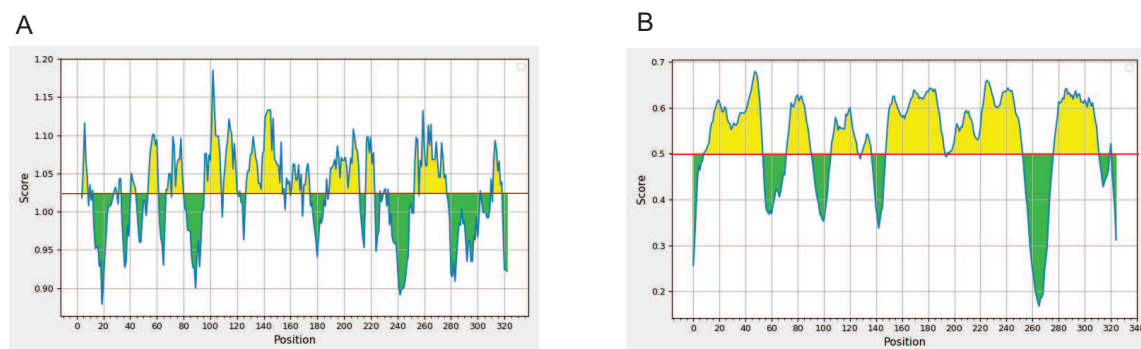


Figura 5.2.2: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- rGra 8

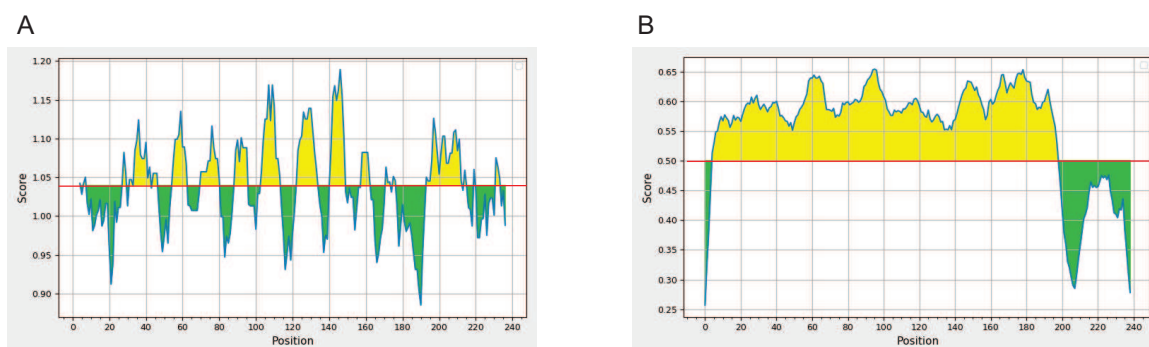


Figura 5.2.3: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- rGra17

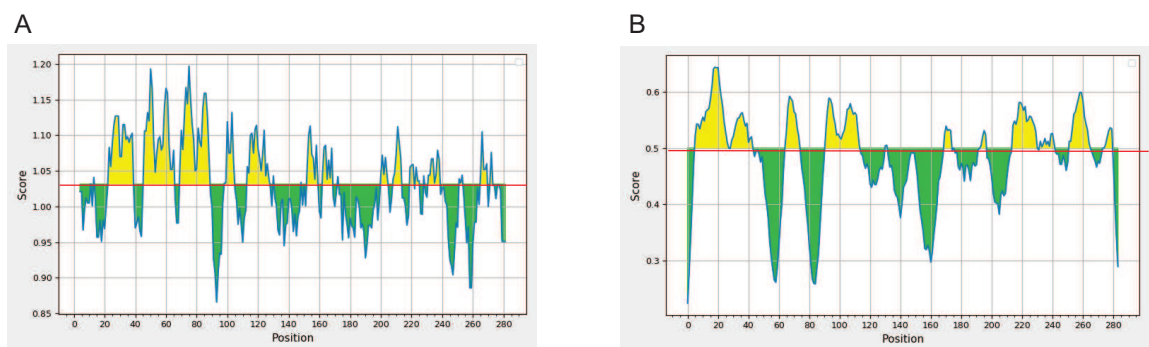


Figura 5.2.4: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- r310790

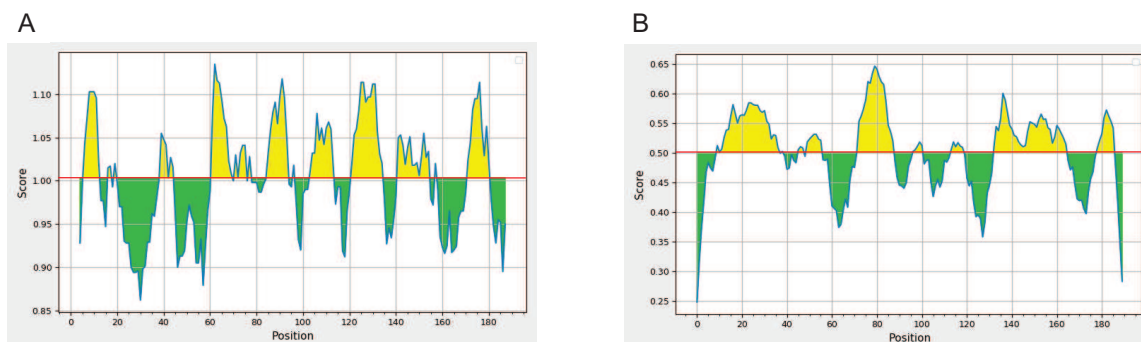


Figura 5.2.5: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- r200360

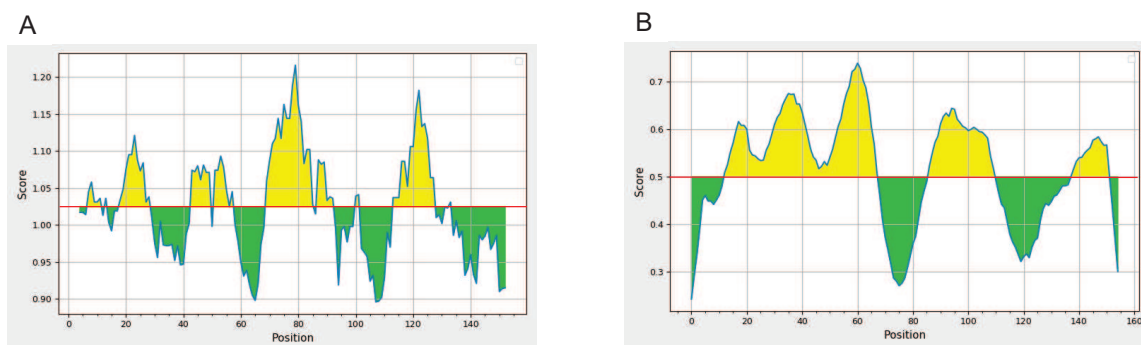


Figura 5.2.6: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- r313640

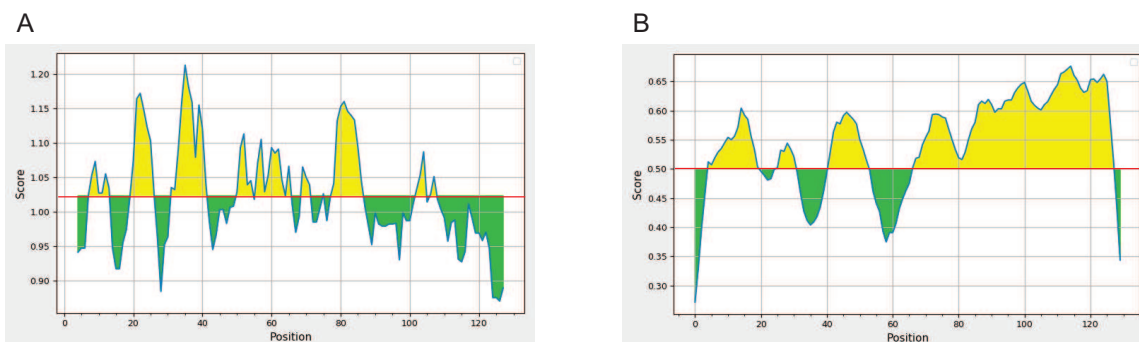


Figura 5.2.7: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- rMic1

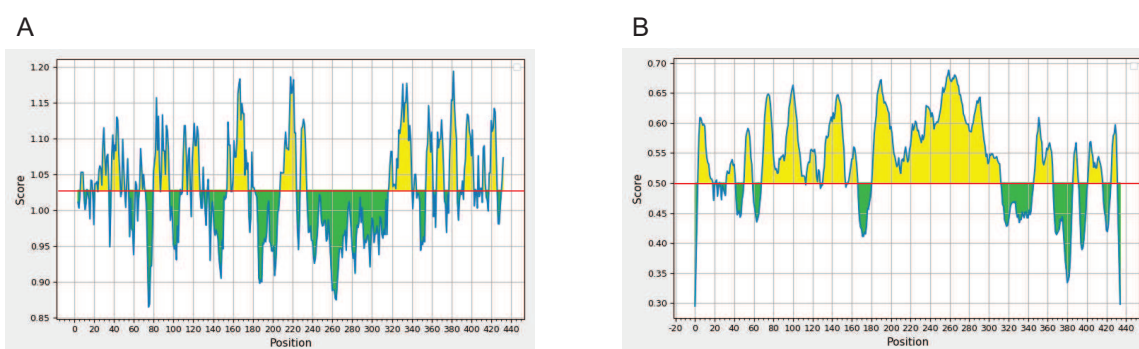


Figura 5.2.8: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

- rRop2

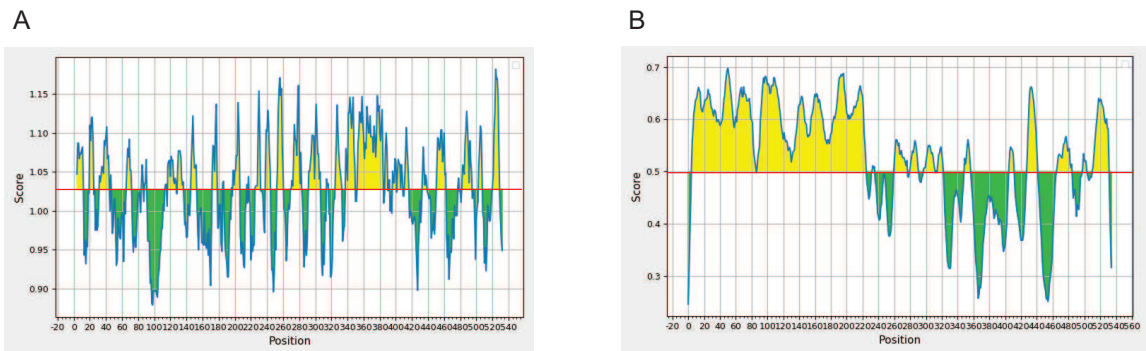


Figura 5.2.9: Resultados de los predictores empleados: A: Antigenicidad de Kolaskar y Tongaonkar. B: BepiPred 2.0. El eje X representa la posición del aminoácido en la secuencia. El eje Y representa el puntaje asignado a cada aminoácido. La línea roja muestra el umbral. El color amarillo en cada gráfico indica que el aminoácido tiene una mayor probabilidad de formar parte del epítipo, mientras que el color verde representa lo contrario.

Sección 5.3

Proteína	Antibiótico	Concentración final de IPTG	Temperatura de inducción	Tiempo de inducción
rGra4	Ampicilina Kanamicina	1 mM	37 °C	4 horas
rGra7	Ampicilina	0.5 mM	37 °C	4 horas
rGra8	Kanamicina	1 mM	37 °C	4 horas
rGra17	Kanamicina	0.5 mM	37 °C	4 horas
r200360	Kanamicina	0.5 mM	18 °C	18 horas
r310790	Kanamicina	1 mM	37 °C	4 horas
r313640	Kanamicina	0.5 mM	37 °C	4 horas
rMic1	Kanamicina	0.5 mM	37 °C	18 horas
rRop2	Ampicilina	0.5 mM	18 °C	18 horas
rGra4-Gra7	Ampicilina	0.5 mM	37 °C	4 horas
rRop2-Gra4	Ampicilina Kanamicina	0.5 mM	18 °C	18 horas

Tabla 5.3.1: Condiciones óptimas de expresión de las proteínas recombinantes analizadas en el presente trabajo.

Sección 5.4

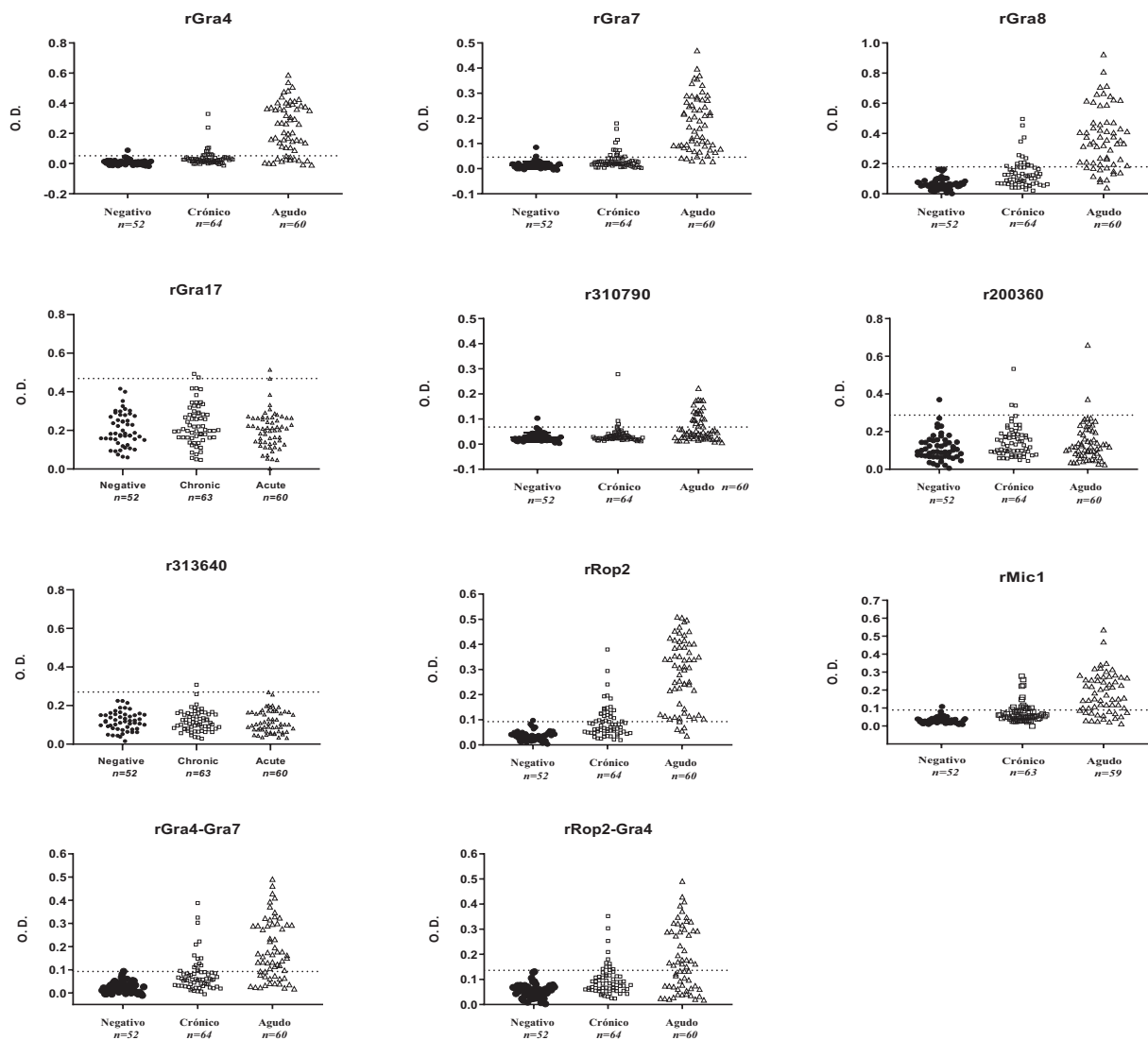


Figura 5.4.1: IgG-ELISA con sueros de pacientes con serología positiva, en fase aguda y crónica, y negativos para *T. gondii*. Las placas se sensibilizaron con 5 µg de proteína y los sueros se usaron en una dilución 1:100. La línea de puntos representa la línea de corte, la cual se calculó como la media de los sueros negativos más 3 DS.

Sección 5.5

Paciente	Edad al diagnóstico (meses)	Síntomas
1707	1	Coriorretinitis, calcificaciones cerebrales, hidrocefalia
1724	2	Coriorretinitis activa en ambos ojos
1737	3	Coriorretinitis cicatricial en el ojo izquierdo
1750	4	Coriorretinitis cicatricial en ambos ojos, calcificaciones cerebrales
1791	7	Coriorretinitis activa en ambos ojos
1811	7	Coriorretinitis cicatricial en ambos ojos, calcificaciones cerebrales
1910	0,2	Asintomático

Tabla 5.5.1: Datos clínicos de bebés con infección congénita. El diagnóstico se realizó en el laboratorio de Laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil Ricardo Gutiérrez.

Paciente	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	
Serología	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	IgG/IgM	N
Madre	1600/-	243/-	199/-	68/-	594/3.21	59/-	189/-	164/-	256/-	436/+	10
Bebé (edad en meses)											
1	NA	NA	151/-	77/-	195/-	49/-	NA	681/-	204/-	NA	6
2	NA	126/-	NA	NA	NA	18/-	123/-	432/-	89/-	118/-	6
3	NA	31/-	46/-	NA	NA	NA	58/-	NA	0/-	96/-	5
4	NA	NA	28/-	27/-	NA	0/-	NA	NA	NA	NA	3
5	NA	16/-	NA	NA	18/-	NA	NA	NA	NA	NA	2
6	NA	17/-	0/-	NA	NA	NA	NA	0/-	NA	NA	3
7	NA	0/-	0/-	0/-	0/-	NA	NA	NA	NA	0/-	5
8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
9	34/-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
10	147/-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
11	40/-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
12	0/-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
13	0/-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1
14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0/-	NA	NA	NA	1

Tabla 5.5.2: Datos de serología de bebés no infectados congénitamente. Estos datos corresponden a 10 bebés NI, con una edad media de 2.1 ± 2.47 meses, junto con la serología de la madre. El diagnóstico se realizó en el laboratorio de Parasitología del Hospital Infantil Ricardo Gutiérrez. Los ensayos realizados fueron IgG ELFA (VIDAS TOXO IgG II; bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) y ELFA de inmunocaptura de IgM (VIDAS TOXO IgM).

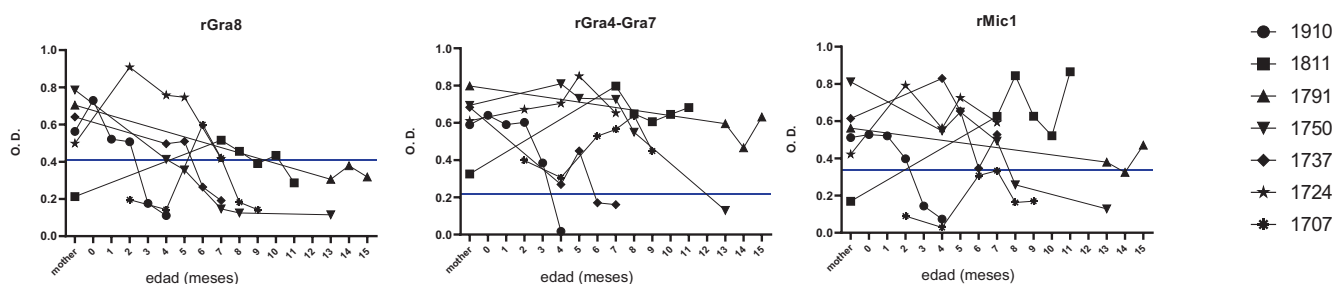


Figura 5.5.1: Perfil cinético de la repuesta humoral de anticuerpos IgG contra rGra8, rGra4-Gra7 y rMic1 en TC. Los sueros de la madre, obtenidos el mismo día de la primera muestra del bebé, también fueron incluidos. La línea azul representa la línea de corte ó *cutoff*, calculada como la media de 11 sueros negativos de niños NI + 3 DS.

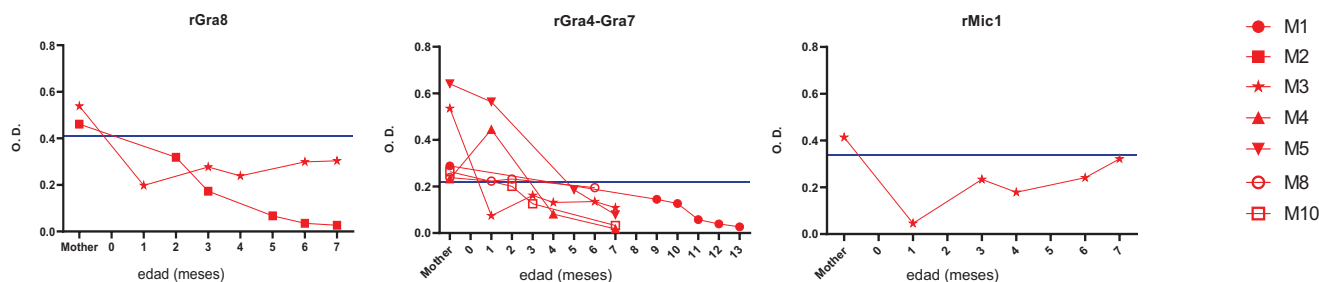


Figura 5.5.2: Perfil cinético de la repuesta humoral de anticuerpos IgG contra rGra8, rGra4-Gra7 y rMic1 en bebés sin infección congénita. Se incluyeron solamente aquellas muestras cuyos valores de O.D. del suero de la madre, obtenidos el mismo día de la primera muestra del bebé, superan la línea de corte ó *cutoff* (azul), la cual se calculó como la media de 11 sueros negativos de niños NI + 3 DS.

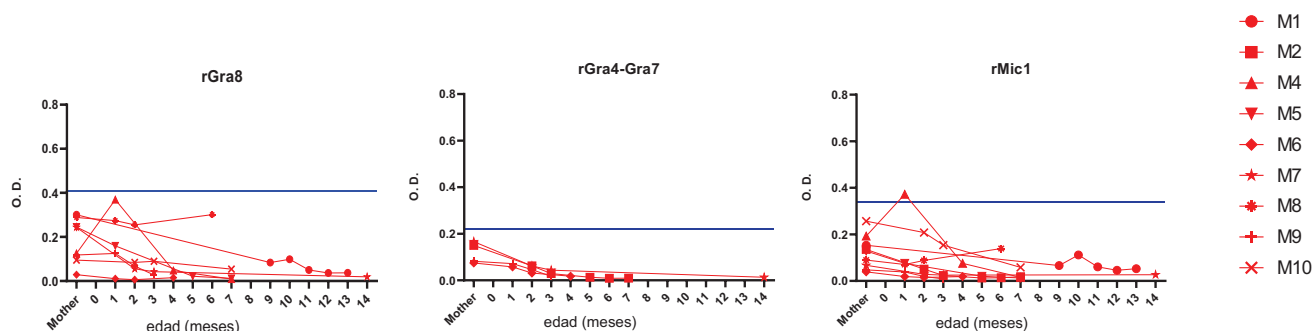


Figura 5.5.3: Perfil cinético de la repuesta humoral de anticuerpos IgG contra rGra8, rGra4-Gra7 y rMic1 en bebés sin infección congénita. Se incluyeron solamente aquellas muestras cuyos valores de O.D. del suero de la madre, obtenidos el mismo día de la primera muestra del bebé, no superan la línea de corte ó *cutoff* (azul), la cual se calculó como la media de 11 sueros negativos de niños NI + 3 DS.

Bibliografía

Referencias

- 1- J. E. SMITH, A Ubiquitous Intracellular Parasite: The Cellular Biology of *Toxoplasma Gondii*, Int J Parasitol. Vol 25 (1995) 1301 – 1309.
- 2- L. M. Weiss and K. Kim, *Toxoplasma gondii* The Model Apicomplexan - Perspectives and Methods. Ed. Elsevier Ltd. (2011).
- 3- J. W. Ajioka, N. S. Morrissette, A century of *Toxoplasma* research, Int J Parasitol. Vol 39 (2009) 859 – 860.
- 4- L. Galal A. Hamidović, M. L. Dardé, M. Mercier, Diversity of *Toxoplasma gondii* strains at the global level and its determinants, Food Waterborne Parasitol. Vol 15 (2019).
- 5- E. Bertranpetit, T. Jombart, E. Paradis, H. Pena, J. Dubey, C. Su, A. Mercier, S. Devillard, D. Ajzenberg, Phylogeography of *Toxoplasma gondii* Points to a South American Origin. Infect Genet Evol. Vol 48 (2017) 150 – 155.
- 6- J. Xiao, R. H. Yolken, Strain hypothesis of *Toxoplasma gondii* infection on the outcome of human diseases, Acta Physiol (Oxf). Vol 2013 (2015) 828 – 845.
- 7- J. P. Dubey, Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*, Int J Parasitol. Vol 28 (1998) 1019 – 1024.
- 8- K. J. Pittman, L. J. Knoll, Long-Term Relationships: The Complicated Interplay between the Host and the Developmental Stages of *Toxoplasma gondii* during Acute and Chronic Infections, Microbiol Mol Biol Rev. Vol 79 (2015) 387 – 401.
- 9- J. L. Jones, J. P. Dubey, Waterborne toxoplasmosis – Recent developments, Exp Parasitol. Vol 124 (2010) 10 – 25.
- 10-B. M. Di Genova, S. K. Wilson, J. P. Dubey, L. J. Knoll, Intestinal delta-6-desaturase activity determines host range for *Toxoplasma* sexual reproduction, PLoS Biol. Vol 17 (2019).
- 11-K. Shapiro, L. Bahia-Oliveira, B. Dixon, A. Dumètre, L. A. de Wit, E. VanWormer, I. Villena, Environmental transmission of *Toxoplasma gondii*: Oocysts in water, soil and food, Food Waterborne Parasitol. Vol 15 (2019).

Bibliografía

- 12-D. J. P. Ferguson, *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore, Mem Inst Oswaldo Cruz. Vol 104 (2009) 133 – 148.
- 13-D. Salman, L. H. Okuda, A. Ueno, G. Dautu, F. Zhang, M. Igarashi, Evaluation of novel oocyst wall protein candidates of *Toxoplasma gondii*, Parasitol Int. Vol 66 (2017) 643 – 651.
- 14- F. Robert-Gangneux, M. L. Dardé, Epidemiology of and Diagnostic Strategies for Toxoplasmosis, Clin Microbiol Rev. Vol 25 (2012) 264 – 296.
- 15-A. Sanecka, E. M. Frickel, Use and abuse of dendritic cells by *Toxoplasma gondii*, Virulence. Vol 3 (2012) 678 – 689.
- 16- I. Blader, B. Coleman, C. Chen, M. J. Gubbels, The lytic cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 years later, Annu Rev Microbiol. Vol 69 (2015) 463 – 485.
- 17-J. L. Jones, M. E. Parise, A. E. Fiore, Neglected Parasitic Infections in the United States: Toxoplasmosis, Am J Trop Med Hyg. Vol 90 (2014) 794 – 799.
- 18-P. R. Torgerson, B. Devleeschauwer, N. Praet, N. Speybroeck, A. L. Willingham, F. Kasuga, M. B. Rokni, X.-N. Zhou, E. M. Fèvre, B. Sripan, N. Gargouri, T. Fürst, C. M. Budke, H. Carabin, M. D. Kirk, F. J. Angulo, A. Havelaar, N. de Silva, World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis, PLoS Med. Vol 12 (2015).
- 19-R. Durlach et al, Consenso Argentino de Toxoplasmosis congénita 2020, Medicina (Buenos Aires). Vol 81 (2021) 257 – 268.
- 20- K. Zhang, G. Lin, Y. Han, J. Li, Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization, Clin Chim Acta. Vol 461 (2016) 83 – 89.
- 21- T. Nayeri, S. Sarvi, M. Moosazadeh, A. Amouei, Z. Hosseinienejad, A. Daryanil, The global seroprevalence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in women who had spontaneous abortion: A systematic review and meta-analysis, PLoS Negl Trop Dis. Vol 14 (2020).
- 22- J. G. Montoya, O. Liesenfeld, Toxoplasmosis, Lancet. Vol 363 (2004) 1965 – 1976.

Bibliografía

- 23- M. Martinez Hampton, Congenital Toxoplasmosis: A Review, Neonatal Netw. Vol 34 (2015) 274 – 278.
- 24- A. Elbez-Rubinstein, D. Ajzenberg, M.-L. Dardé, R. Cohen, A. Dumètre, H. Yera, E. Gondon, J.-C. Janaud, P. Thulliez, Congenital Toxoplasmosis and Reinfection during Pregnancy: Case Report, Strain Characterization, Experimental Model of Reinfection, and Review, J Infect Dis. Vol 199 (2009) 280 – 285.
- 25- B. Bobić, I. Villena, E. Stillwaggon, Prevention and mitigation of congenital toxoplasmosis. Economic costs and benefits in diverse settings, Food Waterborne Parasitol. Vol 16 (2019).
- 26- S. A. Fard, A. Khajeh, A. Khosravi, A. Mirshekar, S. Masoumi, F. Tabasi, T. Hassanzadeh, M. M. Mortazavi, Fulminant and Diffuse Cerebral Toxoplasmosis as the First Manifestation of HIV Infection: A Case Presentation and Review of the Literature, Am J Case Rep. Vol 21 (2020).
- 27- N. J. Butler, J. M. Furtado, K. L. Winthrop, J. R. Smith, Ocular toxoplasmosis II: clinical features, pathology and management, Clin Exp Ophthalmol. Vol 41 (2013) 95 – 108.
- 28- A. de la Torre, J. Gómez-Marín, Disease of the Year 2019: Ocular Toxoplasmosis in HIV-infected Patients, Ocul Immunol Inflamm. Vol 12 (2020) 1 – 9.
- 29- M. Antczak, K. Dzitko, H. Długowska, Human toxoplasmosis—Searching for novel chemotherapeutics, Biomed Pharmacother. Vol 82 (2016) 677 – 684.
- 30- N. Konstantinovic, H. Guegan, T. Stäjner, S. Belaz, F. Robert-Gangneux, Treatment of toxoplasmosis: Current options and future perspectives, Food Waterborne Parasitol. Vol 15 (2019).
- 31- F. Robert-Gangneux, J.-B. Murat, H. Fricker-Hidalgo, M.-P. Brenier-Pinchart, J.-P. Gangneux, H. Pelloux, The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis?, Trends Parasitol. Vol 27 (2011) 530 – 536.
- 32- A. Kompalic-Cristo, C. Frotta, M. Suárez-Mutis, O. Fernandes, C. Britto, Evaluation of a real-time PCR assay based on the repetitive B1 gene for the

- detection of *Toxoplasma gondii* in human peripheral blood, *Parasitol Res.* Vol 101 (2007) 619 – 625.
- 33-B. Edvinsson, M. Lappalainen, B. Evenga, Real-time PCR targeting a 529-bp repeat element for diagnosis of toxoplasmosis, *Clin Microbiol Infect.* Vol 12 (2006) 131 – 136.
- 34- A. Calderaro, S. Peruzzi, G. Piccolo, C. Gorrini, S. Montecchini, S. Rossi, C. Chezzi, G. Dettori, Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection, *Int. J. Med. Sci.* Vol 6 (2009) 135 – 136.
- 35-I. Reiter-Owona, E. Petersen, D. Joynson, H. Aspöck, M. L. Dardé, R. Disko, O. Dreazen, H. Dumon, R. Grillo, U. Gross, M. Hayde, R. Holliman, D. O. Ho-Yen, K. Janitschke, P. A. Jenum, K. Naser, M. Olszewski, P. Thulliez, H. M. Seitz, The past and present role of the Sabin-Feldman dye test in the serodiagnosis of toxoplasmosis, *Bull World Health Organ.* Vol 77 (1999) 929 – 935.
- 36-M. Saraei, S. Shojaee, A. R. Esmaeli, H. Jahani-Hashemi, H. Keshavarz, Evaluation of confounders in toxoplasmosis indirect fluorescent antibody assay, *Iran J Parasitol.* Vol 5 (2010) 55 – 62.
- 37-R. Haidee, D. Ybañez, A. P. Ybañez, Y. Nishikawa, Review on the Current Trends of Toxoplasmosis Serodiagnosis in Humans, *Front Cell Infect Microbiol.* Vol 10 (2020).
- 38-A. Voller, D. E. Bidwell, A. Bartlett, D. G. Fleck, M. Perkins, B. Oladehin, A microplate enzyme-immunoassay for toxoplasma antibody, *J. clin. Path.* Vol 29 (1976) 150 – 153.
- 39-V. Sudan, A. K. Jaiswal, D. Shanker, Recent trends in the diagnosis of toxoplasmosis, *Clin. Rev. Opinions.* Vol 5 (2013) 11 – 17.
- 40-E. Rorman, C. Stein Zamir, I. Rilkis, H. Ben-David, Congenital toxoplasmosis—prenatal aspects of *Toxoplasma gondii* infection, Vol 21 (2006) 458 – 472.
- 41-K. T. Duffy, P. J. Wharton, J. D. Johnson, L. New, R. E. Holliman, Assessment of Immunoglobulin-M immunosorbent agglutination assay (ISAGA) for detecting toxoplasma specific IgM, *J Clin Pathol.* Vol 42 (1989) 1291 – 1295.

Bibliografía

- 42-J. S. Remington, P. Thulliez, J. G. Montoya, Recent Developments for Diagnosis of Toxoplasmosis, *J. clin. Microbiol.* Vol 42 (2004) 941 – 945.
- 43-D. H. Joynson, R. A. Payne, B. K. Rawal, Potential Role of IgG Avidity for Diagnosing Toxoplasmosis, *J Clin Pathol.* Vol 43 (1990) 1032 – 1033.
- 44- A. H. Rahbari, H. Keshavarz, S. Shojaee, M. Mohebbali, M. Rezaeian, IgG Avidity ELISA Test for Diagnosis of Acute Toxoplasmosis in Humans, *Korean J Parasitol.* Vol 50 (2012) 99 – 102.
- 45- A. Rostami, P. Karanis, S. Fallahi, Advances in serological, imaging techniques and molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection, *Infection.* Vol 46 (2018) 303 – 315.
- 46- D. Hill, J. P. Dubey, *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention, *Clin Microbiol Infect.* Vol 8 (2002) 634 – 640.
- 47-O. Djurković-Djaković, J. Dupouy-Camet, J. Van der Giessen, J. P. Dubey, Toxoplasmosis: Overview from a One Health perspective, *Food Waterborne Parasitol.* Vol 15 (2019).
- 48-F. García, L. Vázquez M. A. Sarubbi, Guía de prevención y tratamiento de las infecciones congénitas y perinatales, Ministerio de Salud de la República Argentina.
- 49-G. Pappas, N. Roussos, M. E. Falagas, Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis, *International Journal for Parasitology.* Vol 39 (2009) 1385 – 1394.
- 50-O. Diaz-Suárez, J. Estevez, Seroepidemiology of Toxoplasmosis in women of childbearing age from a marginal community of Maracaibo, Venezuela, *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* Vol 51 (2009) 13 – 17.
- 51-A. L. Fonseca, R. Andrade Silva, B. Fux, A. P. Madureira, F. Furtado de Sousa, Epidemiologic aspects of toxoplasmosis and evaluation of its seroprevalence in pregnant women, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol 45 (2012) 357 – 364.
- 52-H. Silva-Díaz, E. V. Arriaga-Deza, V. E. Failoc-Rojas, Y. R. Alarcón-Flores, S. Y. Rojas-Rojas, L. K. Becerra-Gutiérrez, K. M. Mera-Villasis, F. R. Aguilar-

Bibliografía

- Gamboa, T. Silva-García, Seroprevalence of toxoplasmosis in pregnant women and its associated factors among hospital and community populations in Lambayeque, Peru, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* Vol 53 (2020).
- 53-D. A. Romero, C. González Vatteone, I. de Guillen, L. Aria, T. Meza, A. Rojas, B. Infanzón, M. E. Acosta, Seroprevalence and associated risk factors of toxoplasmosis among women in reproductive age who attended district Hospital of Lambaré, Paraguay, *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* Vol 15 (2017) 83 – 88.
- 54-C. Munoz-Zanzi, C. Campbell, S. Berg, Seroepidemiology of toxoplasmosis in rural and urban communities from Los Rios Region, Chile, *Infection Ecology and Epidemiology.* Vol 6 (2016).
- 55-L. Carral, F. Kaufer, P. Olejnik, C. Freuler, and R. Durlach, Prevención de la Toxoplasmosis congénita en un hospital de Buenos Aires, *Medicina (Buenos Aires)* Vol 73 (2013) 238–242.
- 56-M.T. Messina, M. V. Schneider, L. Carral, E. Outón, M. Pari, M. Rodríguez, J. Daquarti, G. G. Amoia, M. Nadal, C. Freuler, F. Kaufer, Prevalencia de anticuerpos anti-Toxoplasma gondii en embarazadas en siete hospitales de Buenos Aires. Comparación entre 2006 Y 2017, *Medicina (Buenos Aires)* Vol 79 (2019) 433 – 437.
- 57- K. Awoke, E. Nibret, A. Munshea, Sero-prevalence and associated risk factors of *Toxoplasma gondii* infection among pregnant women attending antenatal care at Felege Hiwot Referral Hospital, northwest Ethiopia. *Asian Pac J Trop Med.* Vol 8 (2015) 549 – 554.
- 58- F. J. Kaufer, L. A. Carral, M. T. Messina, and M. V. Schneider, Prevalencia de anticuerpos anti Toxoplasma gondii en hemodonantes en la ciudad de buenos aires, desde 1967 a 2017, *Medicina (Buenos Aires)* Vol 77 (2017) 475 – 480.
- 59- M. Gontijo da Silva, M. C. Vinaud, A. M. de Castro, Prevalence of toxoplasmosis in pregnant women and vertical transmission of Toxoplasma gondii in patients from basic units of health from Gurupi, Tocantins, Brazil, from 2012 to 2014. *PLoS One* Vol 10 (2015) 1 – 15.

Bibliografia

- 60- S. Fallahi, A. Rostami, M. Nourollahpour Shiadeh, H. Behniafar, S. Paktinat, An updated literature review on maternal-fetal and reproductive disorders of *Toxoplasma gondii* infection, *J Gynecol Obstet Hum Reprod*. Vol 47 (2018) 133 – 140.
- 61- C. Dard, H. Fricker-Hidalgo, M.-P. Brenier-Pinchart, H. Pelloux, Relevance of and new developments in serology for toxoplasmosis, *Trends in Parasitology*. Vol 32 (2016) 492 – 506.
- 62- J. L. Jones, D. Kruszon-Moran, S. Elder, H. N. Rivera, C. Press, J. G. Montoya, G. M. McQuillan, *Toxoplasma gondii* infection in the United States, 2011-2014, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* Vol 98 (2018) 551 – 557.
- 63- H. Wilking, M. Thamm, K. Stark, T. Aebischer, F. Seeber, Prevalence, incidence estimations, and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study, *Scientific Reports*. Vol 6 (2016).
- 64- C. Alvarado-Esquivel, F. Campillo-Ruiz, O. Liesenfeld, Seroepidemiology of infection with *Toxoplasma gondii* in migrant agricultural workers living in poverty in Durango, Mexico, *Parasites & Vectors*. Vol 6 (2013).
- 65- A. D. de Melo Inagaki, N. Pereira Cardoso, R. J. Porto Leite Lopes, J. A. Barreto Alves, J. R. Freire Mesquita, K. Conceição Gomes Machado de Araújo, S. Katagiri, Análise espacial da prevalência de toxoplasmose em gestantes de Aracaju, Sergipe, Brasil, *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* Vol 36 (2014).
- 66- A. Rostami, S. J. Seyyedtabaei, S. Aghamolaie, H. Behniafar, Z. Lasjerdi, A. Abdolrasouli, S. Mehravar, C. Alvarado-Esquivel, Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* infection among rural communities in northern Iran, *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. Vol 58 (2016).
- 67- E. Afonso, E. Germain, M.-L. Poulle, S. Ruetter, S. Devillard, L. Say, I. Villena, D. Aubert, E. Gilot-Fromont, Environmental determinants of spatial and temporal variations in the transmission of *Toxoplasma gondii* in its definitive hosts, *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. Vol 2 (2013) 278 – 285.

Bibliografía

- 68-S. Rougier, J. G. Montoya, F. Peyron, Lifelong Persistence of *Toxoplasma* Cysts: A Questionable Dogma?, *Trends in Parasitology*. Vol 33 (2017) 93 – 101.
- 69- E. M. Metsers, P. J. Seddon, Y. M. van Heezik, Cat-exclusion zones in rural and urban-fringe landscapes: how large would they have to be?, *Wildlife Research*. Vol 37 (2010) 47 – 56.
- 70-E. Van Wormer, H. Fritz, K. Shapiro, J. A. K. Mazet, P. A. Conrad, Molecules to modeling: *Toxoplasma gondii* oocysts at the human–animal–environment interface, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. Vol 36 (2013) 217 – 231.
- 71-Ministerio de Economía de la Provincia de Buenos Aires, 2011. Censo 2010 Provincia de Buenos Aires Resultados Definitivos por Partido
- 72-Montero, J.C., 2009. Contribución al desarrollo local y regional de Chascomús a través de la actividad turística
- 73-Caviglione, J., 2011. Plan estratégico de turismo sustentable en el partido de Chascomús, Ministerio Economía y de la Producción de La Nación. Secretaria Política Económica, Dirección Nacional de Preinversión (DINAPREI), Programa Multisectorial Preinversión III. <https://www.mininterior.gov.ar/>
- 74-Q. Liu, Z.-D. Wang, S.-Y. Huang, X.-Q. Zhu, Diagnosis of toxoplasmosis and typing of *Toxoplasma gondii*, *Parasites & Vectors*. Vol 8 (2015).
- 75-A. M. Tenter, A. R. Heckeroth, L. M. Weiss, *Toxoplasma gondii*: from animals to humans, *International Journal for Parasitology*. Vol 30 (2000) 1217 – 1258.
- 76-Tauber, F., 1993. Chascomús: pautas para una estrategia de desarrollo, Munic. Chascomús.
- 77-J. G. Costa, M. J. Vilariño, Antigens to detect the acute phase of toxoplasmosis in pregnant women: standardized comparison, *Biomark.Med*. Vol 12 (2018) 517 – 534.
- 78-Y.-H. Wang, X.-R. Li, G.-X. Wang, H. Yin, X.-P. Cai, B.-Q. Fu, D.-L. Zhang, Development of an immunochromatographic strip for the rapid detection of *Toxoplasma gondii* circulating antigens, *Parasitol Int*. Vol 60 (2011) 105 – 107.

Bibliografia

- 79-D. Kotresha, R. Noordin, Recombinant proteins in the diagnosis of toxoplasmosis, *APMIS*. Vol 118 (2010) 529 – 542.
- 80-M. B. Melo, K. D. C. Jensen, J. P. J. Saeij, *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response, *Trends Parasitol.* Vol 27 (2011) 487 – 495.
- 81-M. S. Roiko, K. La Favers, D. Leland, G. Arrizabalaga, *Toxoplasma gondii*-positive human sera recognise intracellular tachyzoites and bradyzoites with diverse patterns of immunoreactivity, *Int J Parasitol.* Vol 48 (2018) 225 – 232.
- 82-M. Döşkaya, L. Liang, A. Jain, H. Can, S. G. İz, P. L. Felgner, A. D. Döşkaya, D. H. Davies, A. Yüksel Gürüz, Discovery of new *Toxoplasma gondii* antigenic proteins using a high throughput protein microarray approach screening sera of murine model infected orally with oocysts and tissue cysts, *Parasit Vectors.* Vol 11 (2018).
- 83-W. Jiang, J.-X. Xue, Y.-C. Liu, T. Li, X.-G. Han, S.-H. Wang, Y.-J. Chen, J. Qi, S.-Q. Yu, Q. Wang, Identification and characterization of an immunogenic antigen, enolase 2, among excretory/secretory antigens (ESA) of *Toxoplasma gondii*, *Protein Expr Purif.* Vol 127 (2016) 88 – 97.
- 84-J. Felgner, S. Juarez, C. Hung, L. Liang, A. Jain, M. Döşkaya, P. L. Felgner, A. Caner, Y. Gürüz, D. H. Davies, Identification of *Toxoplasma gondii* antigens associated with different types of infection by serum antibody profiling, *Parasitology.* Vol 142 (2015) 827 – 838.
- 85-H.-W. Nam, GRA Proteins of *Toxoplasma gondii*: Maintenance of Host-Parasite Interactions across the Parasitophorous Vacuolar Membrane, *Korean J Parasitol.* Vol 47 (2009) 29 – 37.
- 86-E. Labruyere, M. Lingnau, C. Mercier, L. D. Sibley, Differential membrane targeting of the secretory proteins GRA4 and GRA6 within the parasitophorous vacuole formed by *Toxoplasma gondii*, *Mol Biochem Parasitol.* Vol 102 (1999) 311 – 324.
- 87-A. Neudeck, S. Stachelhaus, N. Nischik, B. Striepen, G. Reichmann, H.-G. Fischer, Expression variance, biochemical and immunological properties of

Bibliografía

- Toxoplasma gondii* dense granule protein GRA7, *Microbes Infect.* Vol 4 (2002) 581 – 590.
- 88-K. L. Carey, C. G. Donahue, G. E. Ward, Identification and molecular characterization of GRA8, a novel, proline-rich, dense granule protein of *Toxoplasma gondii*, *Mol Biochem Parasitol.* Vol 105 (2000) 25 – 37.
- 89-R. D. Díaz-Martín, C. Mercier, C. T. Gómez de León, R. Mondragón González, S. González Pozos, E. Ríos-Castro, R. Arguello García, B. A. Fox, D. J. Bzik, R. Mondragón Flores, The dense granule protein 8 (GRA8) is a component of the sub-pellicular cytoskeleton in *Toxoplasma gondii*, *Parasitol Res.* Vol 118 (2019) 1899 – 1918.
- 90-T. Paredes-Santos, Y. Wang, B. Waldman, S. Lourido, J. P. Saeij, The gra17 parasitoporous vacuole membrane permeability pore contributes to bradyzoites viability, *Front Cell Infect Microbiol.* Vol 9 (2019).
- 91-D. A. Gold, A. D. Kaplan, A. Lis, G. C. L. Bett, E. E. Rosowski, K. M. Cirelli, A. Bougdour, S. M. Sidik, J. R. Beck, S. Lourido, P. F. Egea, P. J. Bradley, M.-A. Hakimi, R. L. Rasmusson, J. P. J. Saeij, The *Toxoplasma* Dense Granule Proteins GRA17 and GRA23 Mediate the Movement of Small Molecules between the Host and the Parasitophorous Vacuole, *Cell Host Microbe.* Vol 17 (2015) 642 – 652.
- 92-M. Pan, M. Li, L. Li, Y. Song, L. Hou, J. Zhao, B. Shen, Identification of Novel Dense-Granule Proteins in *Toxoplasma gondii* by Two Proximity-Based Biotinylation Approaches, *J Proteome Res.* Vol 18 (2019) 319 – 330.
- 93-A. Lorestani, F. D. Ivey, S. Thirugnanam, M. A. Busby, G. T. Marth, I. M. Cheeseman, M.-J. Gubbels, Targeted proteomic dissection of *Toxoplasma* cytoskeleton subcompartments using MORN1, *Cytoskeleton (Hoboken).* Vol 69 (2012) 1069 – 1085.
- 94-A. M. Alonso, M. M. Corvi, L. Diambra, Gene target discovery with network analysis in *Toxoplasma gondii*, *Sci Rep.* Vol 9 (2019).
- 95-O. Céréde, J. F. Dubremetz, M. Soête, D. Deslée, H. Vial, D. Bout, M. Lebrun, Synergistic role of micronemal proteins in *Toxoplasma gondii* virulence, *J Exp Med.* Vol 201 (2005) 453 – 463.

Bibliografia

- 96-J. A. Garnett, Y. Liu, E. Leon, S. A. Allman, N. Friedrich, S. Saouros, S. Curry, D. Soldati-Favre, B. G. Davis, T. Feizi, S. Matthews, Detailed insights from microarray and crystallographic studies into carbohydrate recognition by microneme protein 1 (MIC1) of *Toxoplasma gondii*, *Protein Sci.* Vol 18 (2009) 1935 – 1947.
- 97-H. El Hajj, E. Demey, J. Poncet, M. Lebrun, B. Wu, N. Galéotti, M. N. Fourmaux, O. Mercereau-Puijalon, H. Vial, G. Labesse, J. F. Dubremetz, The ROP2 family of *Toxoplasma gondii* rhoptry proteins: Proteomic and genomic characterization and molecular modeling, *Proteomics.* Vol 21 (2006) 5773 – 5784.
- 98-V. Tu, T. Tomita, T. Sugi, J. Mayoral, B. Han, R. R. Yakubu, T. Williams, A. Horta, Y. Ma, L. M. Weiss, The *Toxoplasma gondii* Cyst Wall Interactome, *mBio.* Vol 11 (2020)
- 99-L. Potocnakova, M. Bhide, L. Borszekova Pulzova, An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction, *J Immunol Res.* (2016).
- 100-H. Singh, H. Rahman Ansari, G. P. S. Raghava, Improved Method for Linear B-Cell Epitope Prediction Using Antigen's Primary Sequence, *PLoS One.* Vol 8 (2013).
- 101-J. E. Pontoppidan Larsen, O. Lund, M. Nielsen, Improved method for predicting linear B-cell epitopes, *Immunome Res.* Vol 2 (2006).
- 102-J. V. Kringelum, M. Nielsen, S. B. Padkjær, O. Lunda, Structural analysis of B-cell epitopes in antibody:protein complexes, *Mol Immunol.* Vol 53 (2013) 24 – 34.
- 103-T. M. Fieser, J. A. Tainer, H. M. Geysen, R. A. Houghten, R. A. Lerner, Influence of protein flexibility and peptide conformation on reactivity of monoclonal anti-peptide antibodies with a protein α -helix, *Proc Natl Acad Sci.* Vol 84 (1987) 8568 – 8572.
- 104-J.-L. Pellequer, E. Westhof, M. H.V. Van Regenmortel, Correlation between the location of antigenic sites and the prediction of turns in proteins, *Immunol Lett.* Vol 36 (1993) 83 – 99.

Bibliografia

- 105-A.S. Kolaskar, P. C. Tongaonkar, A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens, *FEBS Lett.* Vol 276 (1990) 172 – 174.
- 106-M. C. Jespersen, B. Peters, M. Nielsen, P. Marcatili, BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes, *Nucleic Acids Res.* Vol 45 (2017) 24 – 29.
- 107-E. Beghetto, A. Spadoni, W. Buffolano, M. Del Pezzo, O. Minenkova, E. Pavoni, A. Pucci, R. Cortese, F. Felici, N. Gargano, Molecular dissection of the human B-cell response against *Toxoplasma gondii* infection by lambda display of cDNA libraries, *Int J Parasitol.* Vol 33 (2003) 163 – 173.
- 108-M. N. Mévélec, O. Mercereau-Puijalon, D. Buzoni-Gatel, I. Bourguin, T. Chardès, J. F. Dubremetz, D. Bout, Mapping of B epitopes in GRA4, a dense granule antigen of *Toxoplasma gondii* and protection studies using recombinant proteins administered by the oral route, *Parasite Immunol.* Vol 20 (1998) 183 – 195.
- 109-P. Maksimov, J. Zerweck, A. Maksimov, A. Hotop, U. Gross, U. Pleyer, K. Spekker, W. Däubener, S. Werdermann, O. Niederstrasser, E. Petri, M. Mertens, R. G. Ulrich, F. J. Conraths, G. Schares, Peptide microarray analysis of in silico-predicted epitopes for serological diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans, *Clin Vaccine Immunol.* Vol 19 (2012) 865 – 874.
- 110-J. G. Costa, L. E. Peretti, V. S. García, L. Peverengo, V. D. G. González, L. M. Gugliotta, M. L. Dalla Fontana, C. M. Lagier, I. S. Marcipar, P35 and P22 *Toxoplasma gondii* antigens abbreviate regions to diagnose acquired toxoplasmosis during pregnancy: toward single-sample assays, *Clin Chem Lab Med.* Vol 55 (2017) 595 – 604.
- 111-K. Hajjisa, R. Zakaria, R. Suppian, Z. Mohamed, Design and evaluation of a recombinant multi-epitope antigen for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in humans, *Parasit Vectors.* Vol 8 (2015).
- 112-L. Holec-Gasior, *Toxoplasma gondii* Recombinant Antigens as Tools for Serodiagnosis of Human Toxoplasmosis: Current Status of Studies, *Clin Vaccine Immunol.* Vol 20 (2013) 1343 – 1351.

Bibliografía

- 113-J. V. Ponomarenko, M. H. V. van Regenmortel, B-Cell epitope prediction, Structural Bioinformatics, Second Edition (2009).
- 114-J. L. Sanchez-Trincado, M. Gomez-Perosanz, P. A. Reche, Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction, J Immunol Res. Vol 2017 (2017).
- 115-V. Martin, M. Arcavi, G. Santillan, M. R. Amendoeira, E. De Souza Neves, G. Griemberg, E. Guarnera, J. C. Garberi, S. O. Angel, Detection of Human Toxoplasma-Specific Immunoglobulins A, M, and G with a Recombinant *Toxoplasma gondii* Rop2 Protein, Clin Diagn Lab Immunol. Vol 5 (1998) 627 – 631.
- 116-M. Nigro, V. Martin, F. Kaufer, L. Carral, S. O. Angel, V. Pszenny, High Level of Expression of the *Toxoplasma gondii*-Recombinant Rop2 Protein in Escherichia coli as a Soluble Form for Optimal Use in Diagnosis, Mol Biotechnol. Vol 18 (2001) 269 – 273.
- 117-M. Nigro, A. Gutierrez, A. M. Hoffer, M. Clemente, F. Kaufer, L. Carral, V. Martin, E. A. Guarnera, S. O. Angel, Evaluation of *Toxoplasma gondii* recombinant proteins for the diagnosis of recently acquired toxoplasmosis by an immunoglobulin G analysis, Diagn Microbiol Infect Dis. Vol 47 (2003) 609 – 613.
- 118-S. Li, G. Maine, Y. Suzuki, F. G. Araujo, G. Galvan, J. S. Remington, S. Parmley, Serodiagnosis of Recently Acquired *Toxoplasma gondii* Infection with a Recombinant Antigen, J Clin Microbiol. Vol 38 (2000) 179 – 184.
- 119-Z. Mohamed, K. Hajissa, Effective Diagnostic Marker for Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* Infection: New Developments and Perspectives, Toxoplasmosis (2017) Edited by Isin Akyar.
- 120-J. P. Dubey, Bradyzoite-Induced Murine Toxoplasmosis: Stage Conversion, Pathogenesis, and Tissue Cyst Formation in Mice Fed Bradyzoites of Different Strains of *Toxoplasma gondii*, J Eukaryot Microbiol. Vol 44 (1997) 592 – 602.
- 121-H. Aviles, J. Stiles, P. O'Donnell, J. Orshal, J. Leid, G. Sonnenfeld, F. Monroy, Kinetics of systemic cytokine and brain chemokine gene expression in murine *Toxoplasma* infection, J Parasitol. Vol 94 (2008) 1282 – 1288.

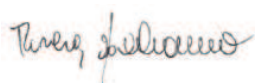
Bibliografia

- 122-J. Gatkowska, E. Hiszczynska-Sawicka, J. Kur, L. Holec, H. Długonska, *Toxoplasma gondii*: An evaluation of diagnostic value of recombinant antigens in a murine model, *Exp Parasitol*. Vol 114 (2006) 220 – 227.
- 123-J. Gatkowska, B. Dziadek, A. Brzostek, J. Dziadek, K. Dzitko, H. Długońska, Determination of Diagnostic Value of *Toxoplasma gondii* Recombinant ROP2 and ROP4 Antigens in Mouse Experimental Model, *Pol J Microbiol*. Vol 59 (2010) 137 – 141.
- 124-J. Altcheh, N. S. Diaz, C. M. Pepe, V. Martin, M. Nigro, H. Freilij, S. O. Angel, Kinetic analysis of the humoral immune response against 3 *Toxoplasma gondii*-recombinant proteins in infants with suspected congenital toxoplasmosis, *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. Vol 56 (2006) 161 – 164.
- 125-S. H. Mosawi, Z. Zarghona, A. Dalimi, P. Jokelainen, A. H. Safa, M. R. Mohammadi, Particularly neglected in countries with other challenges: High *Toxoplasma gondii* seroprevalence in pregnant women in Kabul, Afghanistan, while a low proportion know about the parasite. *PLoS One* Vol 14 (2019).
- 126-O. T. Oyeyemi, I. T. Oyeyemi, I. A. Adesina, A. M. Tihamiyu, Y. D. Oluwafemi, R. I. Nwuba, R. F. Q. Grenfell, Toxoplasmosis in pregnancy: a neglected bane but a serious threat in Nigeria. *Parasitology*. Vol 147 (2020) 127 – 134.
- 127-M. Wallon, F. Peyron, Congenital Toxoplasmosis: A Plea for a Neglected Disease. *Pathogens*. Vol 7 (2018) 7 – 25.
- 128-W. Buffolano, E. Beghetto, M. Del Pezzo, A. Spadoni, M. Di Cristina, E. Petersen, N. Gargano, Use of recombinant antigens for early postnatal diagnosis of congenital toxoplasmosis. *J. Clin. Microbiol*. Vol (2005) 5916 – 5924.
- 129-(Holec, L., Gasior, A., Brillowska-Dabrowska, A., and Kur, J. (2008). *Toxoplasma gondii*: enzyme-linked immunosorbent assay using different fragments of recombinant microneme protein 1 (MIC1) for detection of immunoglobulin G antibodies. *Exp. Parasitol*. 119, 1-6.)
- 130-M. Laguía-Becher, V. Martín, M. Kraemer, M. Corigliano, M. L. Yacono, A. Goldman, M. Clemente, Effect of codon optimization and subcellular targeting

Bibliografía

- on *Toxoplasma gondii* antigen SAG1 expression in tobacco leaves to use in subcutaneous and oral immunization in mice. BMC Biotechnol. Vol 10 (2010).
- 131-J. R. Crowther, (2009). Titration of Reagents. In: The ELISA Guidebook. Ed. Springer Protocols (2009) 79 – 110.
- 132-J. Cerda, L. Cifuentes, Uso de curvas ROC en investigación clínica: Aspectos teórico-prácticos, Rev Chilena Infectol. Vol 29 (2012) 138 – 141.

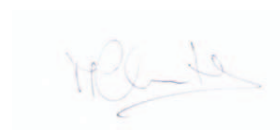
La presente tesis doctoral corresponde a la versión final de la misma, la cual incluye las correcciones sugeridas por los jurados seleccionados para su evaluación.



Biol. Elias Maximiliano Rivera
Becario Doctoral



Dr. Sergio Angel
Director



Dra. Marina Clemente
Co-directora