

# DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS PARA PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA PROTEINA ROP18 EN INDIVIDUOS CON TOXOPLASMOSIS OCULAR

Determination of antibodies to peptides from the ROP18 protein in individuals with ocular toxoplasmosis

CLAUDIA LUCIA LÓPEZ MEJÍA<sup>1</sup> JORGE ENRIQUE GÓMEZ MARÍN MD, MSC, PHD<sup>2</sup>

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de Licenciado en Biología y Educación Ambiental.

<sup>1</sup> Programa de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, Facultad de Educación, Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío.

<sup>2</sup> Grupo de Estudio en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL), Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío.

## RESUMEN

**Introducción:** La importancia de la proteína ROP 18 de *Toxoplasma gondii* surge en su sobreexpresión de esta proteína en la invasión a la célula hospedera, la cual varía de acuerdo con el linaje clonal. No se conoce si existen diferencias en el reconocimiento por anticuerpos específicos contra esta proteína en la toxoplasmosis ocular. **Objetivo:** Establecer la presencia de anticuerpos por medio de la técnica ELISA en los individuos con toxoplasmosis ocular para los péptidos derivados de la proteína ROP18 de cada uno de los linajes clonales (I, II, y III) de *Toxoplasma gondii*. **Materiales y métodos:** Para la prueba ELISA, se usaron 24 sueros de individuos con toxoplasmosis ocular y 6 sueros de individuos IgG positivas sin lesión ocular. Para definir el punto de corte de la prueba se usaron 18 sueros de individuos negativos para toxoplasmosis. Las muestras se procesaron en duplicado y se realizaron cuatro ensayos para cada una. Una prueba ELISA de competición de péptidos se realizó en 2 sueros que tuvieron índices mayores a 1 para los tres péptidos. Se realizó un análisis bioinformático de la predicción de epitopes B para cada uno de los péptidos. **Resultados:** De los 30 sueros analizados, 13 de 30 (43%) sueros reconocieron uno o más péptidos derivados de la proteína ROP18; 7 (23%) tuvieron anticuerpos que reconocieron el péptido del linaje tipo I, 8 para el péptido del linaje tipo II (26%) y 5 para el péptido del linaje tipo III (16%). Tres sueros reconocieron los tres péptidos, dos sueros adicionales reconocieron dos péptidos, un suero los de linajes I y II y otro suero los del linaje II y III. En el ensayo de competición

de péptidos se encontró que, en dos individuos, los mejores valores se encontraban cuando predominaba el péptido de la proteína ROP 18 de la cepa I y no cuando predominaba el péptido II y III. El análisis bioinformático demostró que el péptido del tipo clonal II tenía mayor propiedad de hidrofiliidad lo cual explica porque era reconocido en mayor porcentaje que los otros péptidos **Conclusiones:** El 43% de los individuos con o sin toxoplasmosis ocular reconocen péptidos derivados de la proteína ROP18, indicando que esta proteína es capaz de inducir respuesta humoral durante la infección natural. Los péptidos analizados no permitieron distinguir entre infecciones de diferentes linajes clonales.

**Palabras claves:** ELISA, ROP 18, virulencia, *Toxoplasma gondii*

## ABSTRACT

**Introduction:** ROP 18 protein from *Toxoplasma* is differently overexpressed between clonal lineages, which results in an exaggerated increase in the proliferation and virulence of parasites. It is not known if there are antibodies against this protein during ocular toxoplasmosis. **Objective:** To determine if exist antibodies against peptides derived from the ROP18 protein of *Toxoplasma* from different clonal lineages **Materials and methods:** We studied the presence of antibodies by ELISA in 24 individuals with ocular toxoplasmosis and in 6 individuals with toxoplasmosis but without ocular damage. 18 serum from people without toxoplasmosis were used to define the cutoff of the assay. We used three peptides derived from the ROP18 protein of *Toxoplasma* from the clonal lineages I, II and III. Assays were performed in duplicates and repeated four times. Additionally, a competitive ELISA assay was also applied for the three peptides (I, II and III) in serum that recognized the three peptides simultaneously. Bioinformatic analysis were performed to determine the B immunogenicity profile of each peptide. **Results:** In 30 serum, 13 of 30 (43%) recognized one or more peptides derived from ROP18 protein; 7 (23%) had antibodies that recognized peptides from clonal lineage I, 8 against peptide from lineage type II (26%) and 5 against peptide from lineage type III (16%). Three serum recognized the three peptides and other two recognized two peptides: one of them recognized lineage I and II and another lineage II and III. Competitive ELISA assay showed that in two cases antibodies best recognized peptides from the type I lineage. Bioinformatic analysis showed that peptide from clonal lineage II had greater hidrophilicity in the region shared by the three peptides, which explain why was most recognized than other peptides **Conclusions:** 43% patients with or without ocular toxoplasmosis recognized peptides derived from ROP18 protein, indicating that this protein is able to induce humoral immune response during natural infection. The peptides we used did not distinguish between infection by different clonal lineages

**Keywords:** ELISA, ROP 18, virulence, *Toxoplasma gondii*

## INTRODUCCIÓN

*Toxoplasma gondii* es un protozoo parásito intracelular obligado y según la última clasificación propuesta por la sociedad internacional de protistólogos, es un protozoo que pertenece al super grupo *Cromalveolata*, primer rango *Alveolata* y segundo rango *Apicomplexa* (1). El cual es capaz de infectar una gran variedad de animales homeotermos. Su nombre se debe a su forma arqueada y proviene del griego *toxón* que significa *arco* y *plasma* que significa forma; el parásito existe en tres formas infectantes como el ooquiste que es la forma de resistencia en el exterior, el taquizoito es la forma semilunar de él parásito y el bradizoito, el cual está contenido en los quistes intratisulares. (2)

Generalmente las infecciones son muy extendidas en los seres humanos y pueden conducir a una enfermedad grave en individuos inmunodeficientes. (3)

La toxoplasmosis ocular es una enfermedad producida por el parásito *Toxoplasma gondii*. La infección ocurre por la ingestión de carne cruda, vegetales mal lavados o bebidas que contienen ooquistes del parásito (4).

El diagnóstico de la toxoplasmosis ocular se basa en los hallazgos oculares. La mayoría de los casos se distinguen por presentar focos discretos de retinocoroiditis. Las lesiones en su fase inicial se caracterizan por la presencia de exudado inflamatorio y luego de resolver la inflamación inician un proceso de pigmentación característico. Uno de los sitios donde se encuentra con mayor frecuencia la retinocoroiditis es la mácula (5).

Otra característica de la forma ocular de la toxoplasmosis es su tendencia a recurrir lo cual puede llevar a extensión en el tamaño de la lesión o a la aparición de nuevos focos. Las recurrencias suelen tomar lugar en los bordes de estas cicatrices.

Es así que las muestras de laboratorio solamente comprueban que la persona ha tenido con anterioridad contacto con el parásito, pero no confirman el diagnóstico de la enfermedad.

En Colombia se ha presentado, de acuerdo con el Estudio Nacional de Salud, que el 47% de la población posee anticuerpos IgG contra el parásito *Toxoplasma*, lo que evidencia contacto con el protozooario en alguna época de la vida. Por lo tanto, su adquisición pasa inadvertida para el individuo con un estado inmunocompetente. (6)

La toxoplasmosis tiene una amplia prevalencia en la región del departamento del Quindío, con cifras considerables para toxoplasmosis congénita, en las cuales puede ocurrir mortalidad hasta el 10% de los casos, síntomas neurológicos en 36%, y síntomas oculares en 30%. (7)

La toxoplasmosis ocular es la causa más frecuente de uveítis en Colombia según lo encontrado en un estudio realizado en dos centros de referencia oftalmológica en Bogotá, Colombia, causando ceguera legal en el 33% de los casos y la cual afecta principalmente a población en edad productiva. (5)

*Toxoplasma gondii* se caracteriza por presentar organelos citoesqueléticos y secretorios especializados, llamado el complejo apical, que desempeña un papel crítico en la invasión del parásito a la célula hospedera. (8) dentro de estos organelos apicales se

encuentran las Roptrías, que contienen una variedad de proteínas llamadas ROP, entre las cuales se encuentra la ROP 18, que es una proteína quinasa serina - trionina perteneciente a la familia de proteínas Roptrías que determinan la virulencia en *T. gondii*, la cual es secretada dentro de la célula hospedera durante el proceso de invasión (9). Se ha encontrado que la importancia de la sobreexpresión de la proteína ROP 18 se traduce en un aumento exagerado en la proliferación de los parásitos.

Recientemente se ha descubierto la funcionalidad de la proteína ROP 18 con actividad quinasa y su importancia en la virulencia de *Toxoplasma gondii*, abriendo los caminos para entender la interacción parasito-hospedero. (10)

*Toxoplasma*, a pesar de tener la capacidad de un ciclo sexuado y asexuado, tiene una gran homogeneidad genética y se puede agrupar en tres grupos clónales o genotipos I, II, III. La cepa RH tipo I y otras cepas de este tipo que son genéticamente similares mostraron una dosis letal del 100% (número de parásitos en la cual la infección termina siempre en la muerte del ratón) de un solo parásito viable. En contraste las cepas no virulentas tipo II y III demuestran una dosis letal 50, concentración en la cual mueren el 50% de los ratones infectados. (11) No obstante debido al gran porcentaje (63%) de individuos con toxoplasmosis en nuestra región, pero de los cuales solo un pequeño porcentaje (alrededor del 5%) terminan con lesión ocular, (7) se plantea por lo tanto la importancia de encontrar un marcador que permita predecir cuando existe una infección por una cepa con tropismo por el ojo.

Dada la importancia de la toxoplasmosis ocular sobre la salud visual en nuestra región, es importante comprobar si los péptidos de la proteína ROP 18 son un marcador de

virulencia en toxoplasmosis ocular. En el presente trabajo se tuvo como objetivo establecer la presencia de anticuerpos por medio de la técnica ELISA en los individuos con toxoplasmosis ocular para los péptidos derivados de la proteína ROP18 de cada uno de los linajes clónales (I, II, y III) de *Toxoplasma gondii* y determinar si estos péptidos permiten diferenciar entre infecciones por cada uno de los linajes clónales.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de muestras**

Las muestras fueron obtenidas del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, donde llegaban individuos a los que se les realizó el diagnóstico de toxoplasmosis ocular, de acuerdo a los criterios de diagnóstico descritos previamente (12)

En total se evaluaron 30 muestras de sueros de individuos con toxoplasmosis, todos estos pacientes eran positivos para la prueba IgG anti-*Toxoplasma*, 24 de ellos tenían toxoplasmosis ocular y seis eran de individuos IgG positivos sin lesión ocular. Adicionalmente se utilizaron para determinar el punto de corte 18 sueros que eran negativos para las prueba ELISA IgG e IgM anti-*Toxoplasma* realizadas con un estuche comercial (VIRCELL, Granada, España).

### **Selección de los péptidos**

Se seleccionaron 3 secuencias de péptidos de la proteína ROP18 de *Toxoplasma gondii* para cada tipo clonal, de esta manera, para la proteína ROP18 de 554 aminoácidos se seleccionó la secuencia entre los aminoácidos 448 a 466 (cerca de los extremos carboxi-terminal) de cada linaje clonal:

ROP18 I: P P E R P F Q A T G I T Y T F P T D A

ROP18 II: P P E R P F Q T T D I T Y T F T T D A

ROP18 III: P P E Q P F H S Y G V T Y T F A T D A

Entre el péptido ROP I y ROP II se compartieron muchos más aminoácidos: 16 (84%), mientras que fue mucho menos con el de ROP III. Entre el péptido ROP I y ROP III se compartieron 12 aminoácidos (63%) y entre ROP II y ROP III, se compartieron 13 aminoácidos (68%). Estos tres péptidos comparten 12 de 19 aminoácidos (63%).

Para la síntesis se utilizó el método de síntesis de péptidos en fase sólida desarrollada por Bruce Merrifield. Los péptidos fueron suministrados por el Dr. Manuel Alfonso Patarroyo de la FIDIC (Bogotá).

### **Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) para péptidos derivados de la proteína ROP18**

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (Elisa) con cuatro repeticiones para cada suero de cada individuo, para los tres péptidos derivados de la proteína ROP 18.

Se realizó una ELISA indirecta, que se basa en la reacción antígeno-anticuerpo. Para llevar a cabo esta prueba, se utilizaron los antígenos (péptidos derivados de ROP 18 de los linajes I, II, y III de *Toxoplasma gondii*). Primero se sensibilizó la placa con 100 µL, (1 mg por ml de péptido) de cada péptido diluido en tampón carbonado pH 9.6 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: 0,159 g/100 mL, NaHCO<sub>3</sub>: 0,293 g/100 ml) durante 3 periodos de incubación seguidos, uno de 1 h a 37°C, luego por 48 h a 4°C y finalmente por 1 h a 37°C. Luego se lavó con tampón fosfato más 0,05% de Tween 20. En seguida se agregó una solución de bloqueo con 100 µL de tampón caseína fosfato al 2% por 1 h a 37°C. Se lavó con tampón fosfato + 0,05% de Tween 20. Se agregó 100 µL de suero a cada pozo con dilución 1:100 en 5% de tampón caseína fosfato o albúmina bovina 1%.



Luego se incubó por 1h a 37°C. Se lavó con tampón fosfato, más 0,05% de Tween 20. Se agregaron 100µL de conjugado anti-humano para peroxidasa de rábano con dilución 1:6000 en tampón fosfato más albúmina bovina al 1%, se incubó por 1 hora a 37°C. Luego se lavó 5 veces con tampón fosfato más 0,05% de Tween 20. Se agregó TMB por 30 minutos a 37°C y se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%. Luego se procedió a leer a 450 nm en un lector de ELISA (Dynatech 5.000, USA). Los datos obtenidos en las pruebas ELISA fueron la densidad óptica (DO) para cada muestra de suero analizada.

El punto de corte (*cut-off*) se calculó como el promedio de los sueros negativos  $\pm$  3 desviaciones estándar. (13) Con el fin de homogenizar los resultados y eliminar la variación en lectura y permitir la comparación de resultados se calculó un índice para cada suero en cada ensayo. El índice se obtuvo de la relación entre el promedio de las dos lecturas en densidad óptica dividido entre el punto de corte del ensayo (OD prueba/OD *cut-off*) (14) Un índice mayor a 1 se consideró positivo. Los índices de las cuatro repeticiones se promediaron y se calculó el coeficiente de variación interensayo ( $\sigma$  desviación estándar / promedio de los índices de los 4 ensayos). Sólo se retuvieron los resultados de índices con coeficientes de variación menores a 30% entre ensayos.

### **Ensayo ELISA competición de péptidos**

Esta prueba se realizó con el fin de comparar dos péptidos en diferentes concentraciones, para así poder determinar cuál de los dos presentaba una mayor reacción inmunológica frente al otro.

Para realizar la prueba de competición de péptidos, se utilizaron los tres péptidos de la proteína ROP 18. Se colocaron a competir los péptidos con dos sueros problemas de individuos con toxoplasmosis ocular, los péptidos que se utilizaron y las concentraciones fueron puestos de esta manera, ROP I vs ROP III, en proporciones 1:1, 1:10 y 10:1, respectivamente; ROP I vs ROP II, en proporciones 1:1, 1:10 y 10:1 respectivamente; y ROP II vs ROP III, en proporciones 1:1, 1:10 y 10:1 respectivamente. Este ensayo se realizó con el protocolo ya estandarizado por Cardona y colaboradores (13)

### **Predicción de epitopes B por herramientas bioinformáticas**

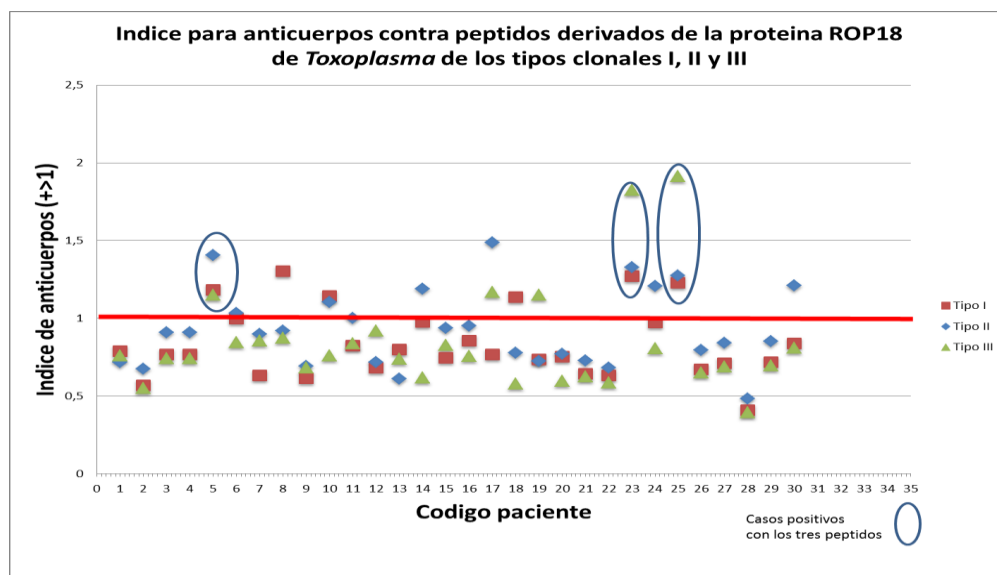
Se utilizó la herramienta en línea “Immune Epitope Database Analysis Resource” ([http://tools.immuneepitope.org/main/html/bcell\\_tools.html](http://tools.immuneepitope.org/main/html/bcell_tools.html).) Esta herramienta permite calcular parámetros como hidrofiliidad, flexibilidad, accesibilidad, giros y superficie expuesta. Los cálculos se hacen para cada uno de los aminoácidos de la secuencia, el puntaje para cada residuo es el promedio de los valores de la escala para estos aminoácidos. Se aplicó el modelo de predicción de Parker para hidrofiliidad (15) Entre mayor puntaje en la hidrofiliidad mayor propensión del péptido para generar anticuerpos.

## RESULTADOS

### Ensayo inmunoenzimático (ELISA):

En total se procesaron 30 sueros, de ellos 13 de 30 (43%) de los sueros reconocieron uno o más péptidos derivados de la proteína ROP18; 7 (23%) tuvieron anticuerpos que reconocieron el péptido del linaje tipo I; 8 de los sueros analizados reconocieron el péptido del linaje tipo II (26%) y 5 el péptido del linaje tipo III (16%).

Tres sueros reconocieron los tres péptidos, dos sueros adicionales reconocieron dos péptidos, un suero los de linajes I y II y otro suero los del linaje II y III (Figura 1).



**Figura 1.** Índice promedio para cada suero para los péptidos derivados de ROP18 de cada uno de los linajes clonales de *Toxoplasma*.

Los coeficientes de variación entre cada prueba no superaron en promedio el 30% (Anexo 1). Uno de los sueros pertenecía a una paciente quien tuvo una infección en el laboratorio con cepa tipo I y cuyo suero fue positivo en las pruebas para dos péptidos. Esto demuestra que estos péptidos no permiten discriminar entre linajes, lo cual se refuerza con el hecho de 6 de los 13 sueros (46%) que fueron positivos por la ELISA reconocieron más de un péptido.

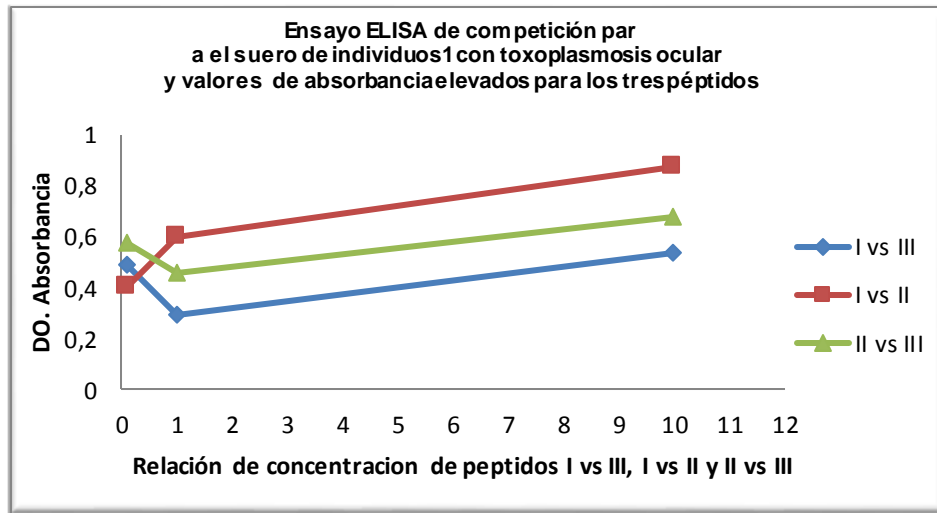
Cuando se hizo el análisis para buscar si estas pruebas se encontraban positivas en mayor porcentaje entre pacientes con toxoplasmosis ocular comparada con pacientes sin lesión ocular o entre pacientes en fase activa o inactiva no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### **Ensayo de competición de péptidos**

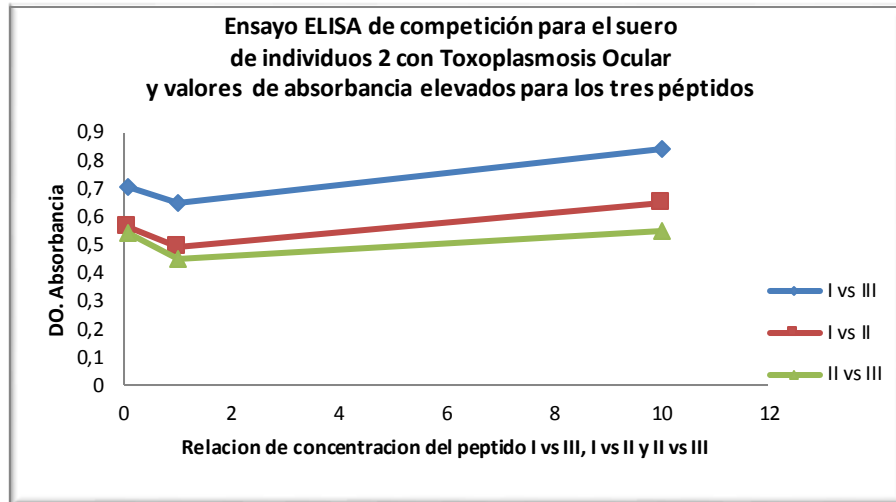
Para el ensayo de competición de péptidos, se usaron dos sueros de dos pacientes con toxoplasmosis ocular, que presentaron resultados por encima del punto de corte para los tres péptidos en el proceso de realización del ensayo ELISA. Se colocaron dos péptidos de la proteína ROP 18 a competir en concentraciones diferentes, de tal manera que se lograra diferenciar a cual péptido estaban reconociendo los anticuerpos del paciente y eliminar de esta manera el problema de reacción cruzada.

En el caso del paciente 1, los anticuerpos lograban mayores valores frente al péptido de la cepa I, que para péptidos de la cepa II y III. (Figura 2). De igual manera se realizó el mismo procedimiento con el paciente 2, donde se encontró una reacción cruzada a

las tres diferentes cepas de *Toxoplasma gondii*. (Figura 3) Estos resultados demuestran que los anticuerpos tienen mayor afinidad para el péptido derivado de la proteína ROP18 del linaje I.



**Figura 2.** ELISA competición de péptidos, para el paciente 1 con Toxoplasmosis Ocular y su respectivo valor de absorbancia.



**Figura 3.** ELISA competición de péptidos, para el paciente 2 con toxoplasmosis ocular y su respectivo valor de absorbancia.

### Análisis bioinformatico

El análisis bioinformatico demostró que el péptido del tipo clonal II tenía mayor propiedad de hidrofiliidad lo cual explica porque era reconocido en mayor porcentaje que los otros péptidos derivados de la proteína ROP 18 (anexo 3)

- a) Tipo I (Promedio hidrofiliidad: 1,46)
- b) Tipo II (Promedio hidrofiliidad: 2,16)
- c) Tipo III (Promedio hidrofiliidad: 1,36)

## DISCUSIÓN

El presente trabajo demostró que en 43% de los individuos con y sin toxoplasmosis ocular producen anticuerpos contra péptidos derivados de la proteína ROP 18 de *Toxoplasma*, Sin embargo estos péptidos no permiten discriminar entre individuos con infecciones de diferentes linajes, pues incluso se encuentra reconocimiento contra un péptido del linaje II que no se ha encontrado en Colombia (12), teniendo en cuenta que los individuos eran todos originarios del Quindío y sin viajes al exterior.

A pesar de que se seleccionó una región polimórfica los análisis bioinformáticos nos mostraron que el mayor reconocimiento es contra los péptidos iniciales que son compartidos entre los tres péptidos. Este mismo análisis bioinformático permitió explicar porque se encontró mayor positividad para el péptido tipo II de la proteína ROP 18 ya que es muy hidrofílico.

Cabe señalar que la gran variabilidad en las absorbancias interensayo se pueden explicar por los factores que afectan la medida de la actividad enzimática tales como la temperatura, el pH, la composición del tampón, la reducción del sustrato, la desnaturalización de la enzima y en algunos casos la exposición a la luz, aunque estos factores se controlaron. También se debe tener en cuenta que al realizar una ELISA casera, se presentan condiciones de mayor variabilidad.

Dado que en dos casos que presentaban títulos muy altos de resultados para los tres péptidos fueron positivos, se planteaba entonces como explicación dos posibilidades, o se trataban de individuos infectados por las tres cepas (infección mixta o simultánea

por varias cepas) o reacciones cruzadas. Para dilucidar esto se diseñó una ELISA de competición de péptidos en la cual se probaron diferentes condiciones: una condición equimolar y otra condición en que uno de los péptidos predominaba en factor 10 sobre el otro. Se encontró que en estos dos individuos los mejores valores se encontraban cuando predominaba el péptido de la proteína ROP 18 de la cepa I y no cuando predominaba el péptido II y III de la proteína en cuestión.

En conclusión se pudo utilizar esta técnica para determinar la frecuencia de anticuerpos contra péptidos derivados de la proteína ROP18 en individuos con toxoplasmosis ocular, pero no se pudo determinar por medio de este método cual era el tipo clonal que infectaba al individuo. Se logró evidenciar que también las predicciones de modelos bioinformáticos basados en hidrofobicidad permiten identificar efectivamente regiones con alta inmunogenicidad para linfocitos B.



## **PERSPECTIVAS**

Hacia el futuro será necesario buscar si otras regiones de la proteína ROP18 son mejores candidatos para discriminar o si será necesario desarrollar pruebas serológicas contra otras proteínas que sí lo permitan, tales como la ROP16 o un ensayo contra la región de inserción de ROP18.

La identificación de una posible correlación entre el tipo de enfermedad y el tipo de cepa podría ser muy importante para la determinación de un adecuado diagnóstico y un adecuado tratamiento para este tipo de enfermedades.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los docentes y compañeros de la carrera de Licenciatura en Biología y Educación Ambiental, de igual manera al personal del centro de Investigaciones Biomédicas y al grupo en Parasitología y Micología Molecular (GEPAMOL).

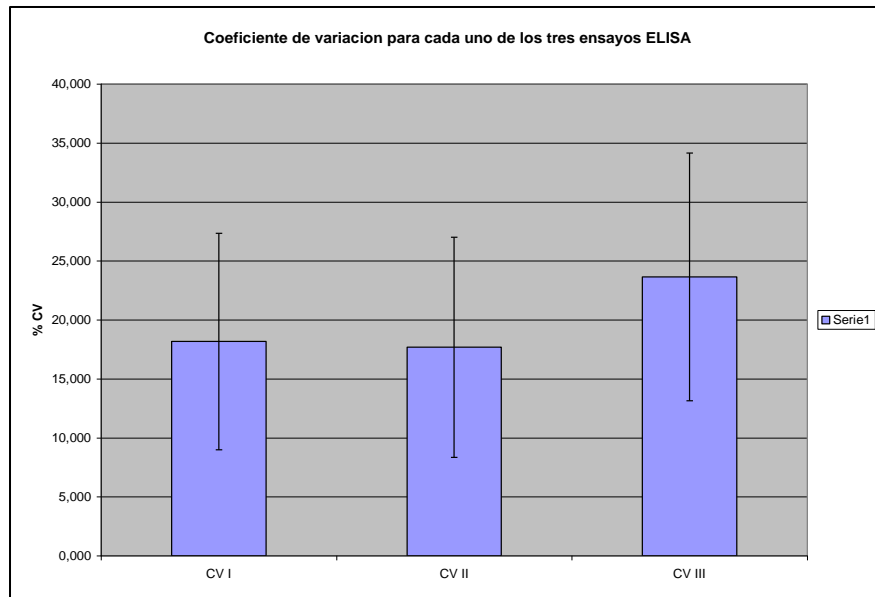
## REFERENCIAS

1. Sina M. ADL, Alastair G. B. Simpson, Mark A. Farmer, Robert A. Andersen O. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Eukaryot. Microbiol.* 52(5), 2005 pp. 399–45
2. Martín - Hernández I, García – izquierdo, S M. Toxoplasmosis en el hombre. Artículo de revisión.
3. Saeij JP. J, Boyle JP, Collier S, Taylor S, Sibley ID, Brooke-Powell ET, Ajioka J.W. y Boothroyd J.C. Polymorphic Secreted Kinases are key virulence factors in toxoplasmosis. 2006 *Science* 3141780; doi: 10.1126/ science. 1133690
4. Gómez JE, *Protozoología Médica. Manual Moderno.* 2010
5. De-la-Torre A, López-Castillo CA, Rueda JC, Mantilla RD, Gómez-Marín JE, Anaya JM. Clinical patterns of uveitis in two ophthalmology centres in Bogota, Colombia. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2009; 37: 458-466.
6. Gómez JE, Castaño JC, Montoya MT, *Toxoplasmosis congénita en Colombia: un problema subestimado de salud pública,* 1995.
7. Gómez. JE, Ruíz B, Silva P, Beltrán S, Cortés J, Montoya J. y Agudelo A. Guía de práctica clínica para toxoplasmosis durante el embarazo y Toxoplasmosis Congénita en Colombia. 2007 *infectio* 11 (3): 129-141
8. Dufremetz J, Régues N, Conseil F, Invited review apical organelles and host-cell invasión by Apicomplexa.
9. Taylor S, Barragan A, Su C, Fox B, Fentress SJ, Tang K, Beatty W I, El Hajj H, Jerome M, Behnke MS, White M, Wootton JC. y Sibley Ld. A secreted serine-

threonine kinase determines virulence in the eukaryotic pathogen *Toxoplasma gondii*. 2006; *science* 314: 1776-1780.

10. El Hajj H, Lebreun M, Arold ST, Vial H, Labesse G. y Dubremetz JF. ROP18 is a Rhoptry Kinase controlling the intracellular proliferation of *Toxoplasma gondii* 2007; *PLoS Pathogen*.
11. Sibley ID. y Boothroyd JC. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage 1999; *Nature* 359: 82-8.
12. De-la-Torre, A., González, G., Díaz - Ramírez, J., Gómez - Marín, J.E., 2007. Screening by ophthalmoscopy for toxoplasma retinochoroiditis in Colombia. *American Journal of Ophthalmology* 143, 354–356.
13. Cardona NI, Lora F, y Gómez. JE. Estandarización del inmunoensayo ELISA para la detección de IgG anti-toxoplasma gondii en ratón. 2006; *Parasitol latino am* 60: 97 – 101.
14. Marcelino, J., Barroso, H., Gonc., alves, F., Marques Silva, S., Novo, C., Gomes, P., Camacho, R., Taveira, N., 2006. Use of a New Dual-Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay To Detect and Characterize the Human Antibody Response to the Human. *Journal of Clinical Microbiology* 607–611
15. Parker JM, Guo D, Hodges RS. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 1986 Sep 23; 25(19):5425-32.

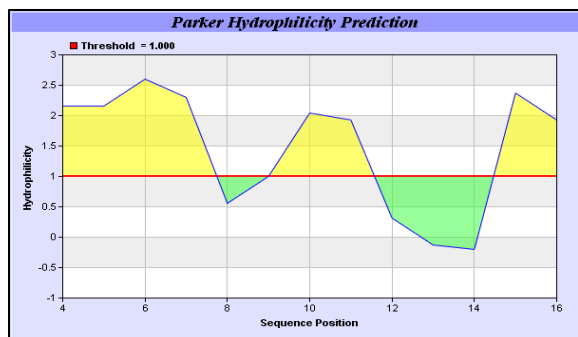
## ANEXO (1 y 2)



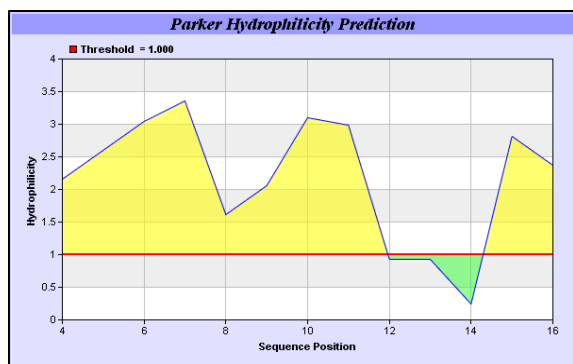
Anexo 1. Coeficiente de variación de tres ensayos para la proteína ROP18.

## Anexo 2. Perfil de hidrofiliidad para cada péptido derivado de la proteína ROP18

### 1) Tipo I (Promedio hidrofiliidad: 1,46)



### 2) Tipo II (Promedio hidrofiliidad: 2,16)



### 3) Tipo III (Promedio hidrofiliidad: 1,36)

