



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

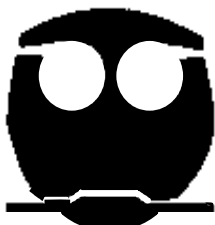
**EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS ENOLASA
NEURONESPECÍFICA (NSE) Y S-100B EN EL SUERO DE
RECIÉN NACIDOS INFECTADOS POR
*Toxoplasma gondii***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA - BIOLÓGICA

P R E S E N T A

SOLIS RÍOS DILIA NATIVIDAD



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Prof. Abel Gutiérrez Ramos
Vocal	Prof. Mónica Berenice Heras Cavaría
Secretario	Dra. Maria Dolores Correa Beltrán
1er. Suplente	Prof. Martha Patricia Neri Páez
2º. Suplente	Prof. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Este tema se desarrolló en el Instituto Nacional de Pediatría (INPed) en el Laboratorio de Inmunología Experimental, Subdirección de Medicina Experimental 8° Piso, Torre de Investigación. Av. Insurgentes Sur 3700-C, Col. Insurgentes Cuicuilco, México DF, C.P. 04530

Asesor

Sustentante

Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán

Dilia Natividad Solis Ríos

DEDICATORIA

Esta Tesis la dedico a **mis PADRES** (Pablo Solis Arizmendi y Zoila Ríos Contreras) con todo mi amor, cariño pero sobre todo agradecimiento, porque sin su amor, cariño, apoyo incondicional y comprensión, brindado sin importar las distancias u obstáculos presentes, no hubiera podido terminar mi carrera, por todo lo que me han dado y enseñado, muchísimas GRACIAS.

AGRADECIMIENTO

La presente tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Inmunología Experimental, de la Subdirección de Medicina Experimental, del Instituto Nacional de Pediatría (INPed), SSA, bajo la dirección de la Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán, con apoyo financiero parcial del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT, proyecto U43079-M

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a las personas más importantes en mi vida, sin las cuales no sería lo que ahora soy, ellos son: **mi Familia**

Mi bis-abuelita

Irene (†)

Por sus consejos, por enseñarme a vivir y luchar en la vida

Mis abuelitos

Pedro (†) y Consuelo

Por el gran amor, cariño, cuidados y consejos de vida recibidos

Francisco (†) y Esther (†)

Por su gran amor y cariño demostrado

Mis padres

Gracias por la vida, el inmenso amor, apoyo y consejos brindados

Mis hermanos

Gracias Ricardo y Pablo por apoyarme, cuidarme y quererme tanto

Mis cuñadas (Cecilia y Julieta)

Por sus consejos y apoyarme

Mis sobrinos (Arturín, Emma, Chelo, Ángel y ¿?)

Por el gran amor, cariño e inocencia reflejada en sus ojitos y enseñarme cada día algo nuevo

Tía Leticia (Pichón)

Por el gran cariño, regaños y cuidados a lo largo de mi vida

Mi novio IQ. Juan Gabriel Cruz Aguilar

Gracias por tu comprensión, apoyo, confianza y amor en todo este tiempo

En el transcurso de mi vida, en los momentos difíciles, he encontrado personas que me han ayudado brindándome un consejo sincero.

Lupita (Comadrita) (†)

Por ser mi maestra, amiga, confidente y ángel de la guarda

QFB. Laura M. Fidencio Quezada

Gracias por la confianza y el cariño de hermanas

QFB. Carolina Hernández Martínez

Gracias por brindarme tu amistad y confianza

Pas. QFB Alma Cynthia Robles García

Por tu amistad y confianza

Prof. Pedro Villanueva

Gracias por tu amistad sincera, consejos y tanto cariño

Lab. Alejandro Paredes Ayala

Por brindarme tu amistad, consejos, confianza y cariño

Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán

Por la amistad, consejos y cariño brindado

Durante mi estancia en la Facultad de Química cruzaron mi camino varias personas que al paso del tiempo terminaron siendo mis grandes amigos, a los que les debo grandes experiencias y aventuras, entre ellos están: Miguel Ángel (Manito), Alberto (Villegas), Adrián y Karina, Iris (Cosa), David (Patas), Héctor (Vector), César, Toño y Bere, Ángel, Ruth, Mónica, Jesús (Chucho), Nadiezhda.

Agradezco a un grupo de amigos que me demostraron su cariño y amistad, que más que amigos son una hermandad y que no mencionaré a los integrantes, pero los defino como La Banda.

También agradezco a otros amigos de la facultad pero que no pertenecen a los grupos anteriores, sin embargo, no dejan de ser grandes amigos: al Clan Malhumorado, Gabriela (Lucia), Norma, Samuel, Aurora, Pollito, Carolina y Maggy.

A mis viejos amigos de la preparatoria que siempre me han apoyado: Ing. Carlos Magaña y Walter Solís Moreno.

Agradezco infinitamente a todos los profesores de la Facultad de Química que compartieron su conocimiento y experiencias dentro y fuera de las aulas.

Facultad de Química, UNAM

Por el conocimiento adquirido y tener gran nivel académico

Prof. Héctor Verdiguél

Por tu amistad y paciencia

Prof. Norma Castellanos

Por su amistad y cariño

A los profesores de mi jurado:

Prof. Abel Gutiérrez Ramos

Por su amistad, consejos y paciencia

Prof. Mónica Heras Chavarría

Por su comprensión y paciencia

Mi agradecimiento especial al Laboratorio de Inmunología Experimental de la Torre de Investigaciones, por el apoyo prestado para la realización de la Tesis.

A la **Dra. Ma. Dolores Correa Beltrán** mi infinito agradecimiento por su enseñanza, guía y apoyo para la realización de la Tesis.

Al **Biol. José Luis Hernández Islas** por darme la oportunidad de aprender juntos, por la paciencia y amistad.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Héctor, Irma, Esther, Heriberto, Edith, Claudia, Belinda, Vanessa, Alonso, Aidé, Ernesto, Haydé, Mónica, Armando, Lilia, Cayetano, Luz, Adrián.

Al laboratorio de Farmacología por el préstamo del espectrofotómetro para placas de ELISA

A la Dra. Galván por el consentimiento dado para usar los sueros utilizados en la realización de la Tesis

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	3
<i>MORFOLOGÍA</i>	3
<i>CICLO DE VIDA</i>	4
<i>VIAS DE TRANSMISIÓN</i>	7
<i>EPIDEMIOLOGIA</i>	8
<i>RESPUESTA INMUNE</i>	9
<i>ASPECTOS CLINICOS</i>	10
<i>DIAGNOSTICO DE LABORATORIO</i>	11
<i>BIOMARCADORES DE DAÑO NEUROLOGICO</i>	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS GENERAL	16
<i>HIPÓTESIS SECUNDARIAS</i>	16
METODOLOGÍA	17
<i>TIPO DE ESTUDIO</i>	17
<i>VARIABLES</i>	17
<i>ESTRATEGIA GENERAL</i>	17
<i>CRITERIOS DE INCLUSIÓN</i>	18
<i>CRITERIOS DE NO-INCLUSION</i>	19
<i>DEFINICIONES OPERACIONALES</i>	19
MATERIAL Y MÉTODOS	21
<i>ELISA DE CAPTURA DE ANTIGENOS</i>	23
RESULTADOS	25
<i>ESTANDARIZACION</i>	25
<i>MUESTRAS PROBADAS PARA DETERMINAR S-100B</i>	34
<i>DETERMINACIÓN DE NSE EN SUEROS DE LOS NEONATOS</i>	39
<i>CORRELACION ENTRE PROTEINAS</i>	44
<i>CASO CLINICO</i>	45
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
CONCLUSIONES	49
ANEXO	50
<i>CUADRO I. NIVELES DE NSE EN INDIVIDUOS SANOS O NEGATIVOS A DAÑO NEUROLÓGICO, TOMADOS DE DIFERENTES ESTUDIOS EN LA LITERATURA</i>	51
<i>CUADRO II. NIVELES DE S-100B EN INDIVIDUOS SANOS O NEGATIVOS A DAÑO NEUROLÓGICO, TOMADOS DE DIFERENTES ESTUDIOS EN LA LITERATURA</i>	56
APÉNDICE	59
BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado como todos los miembros del Phylum Apicomplexa; es de distribución universal y, probablemente, el agente más frecuente de infección por protozoarios en el ser humano. El gato actúa como hospedador definitivo ya que es capaz de soportar el ciclo sexuado del parásito, y los mamíferos y algunas aves actúan como hospedadores intermediarios. La vía principal de transmisión de esta parasitosis es la oral, aunque existen otras que son menos frecuentes como la transmisión vertical (transplacentaria) y por trasplantes de órganos de donantes infectados a los receptores. Los pacientes inmunodeprimidos por VIH, o por terapia pueden presentar primoinfección o reactivación de una infección crónica, lo que los lleva incluso a la muerte.

La infección de mujeres embarazadas puede dar origen a una toxoplasmosis congénita, ya que el parásito puede llegar al feto a través del cordón umbilical y puede resultar en una de las formas más severas, con una mayor incidencia de secuelas irreversibles y hasta muerte del bebé.

Sin embargo, la mayoría de las infecciones congénitas son subclínicas al nacimiento, aunque en un periodo que va de 3 meses a 20 años se pueden generar problemas neurológicos, oftalmológicos o auditivos. Aunque el diagnóstico precoz y el tratamiento profiláctico de los casos asintomáticos puede reducir la incidencia y la gravedad de las secuelas posteriores, existen casos que de no ser detectados oportunamente presenten problemas a futuro. Una posible explicación a este fenómeno es que al nacer ya tengan daño neurológico a nivel tisular o celular, y que no se detecta por medio del examen clínico.

En el sistema nervioso central (SNC) existen sustancias que se han utilizado como indicadores de daño neuronal, entre ellas las isoenzimas de la creatinina-cinasa, la lactato deshidrogenasa, la aspartato aminotransferasa, la hidroxibutirato deshidrogenasa, el ácido láctico, el glutamato, el aspartato, algunas citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α), la hipoxantina y la xantina. La proteína S-100B y la enolasa específica de neuronas (NSE) son indicadores de daño cerebral. Se han reportado en la literatura incrementos en los niveles plasmáticos de ambas

proteínas después de trauma craneal o daño cerebral por hipoxia posterior a un paro cardíaco.

No existen estudios que determinen si los niveles elevados de S-100B o NSE en suero se relacionan con daño del sistema nervioso central en niños infectados con *Toxoplasma gondii*.

La tesis tuvo por objeto comparar los niveles séricos de S-100B y NSE a partir de un banco de sueros de infantes con status clínico y de infección conocidos, de entre los cuales se estudiaron recién nacidos sanos y 3 grupos de bebés infectados por *Toxoplasma gondii*: asintomáticos, con síntomas neurológicos y con otros problemas clínicos.

Se estudiaron infantes de cada grupo, y la medición se hizo por ELISA de captura de antígenos usando anticuerpos monoclonales contra las enzimas, previa estandarización. Las comparaciones de los valores de concentración se hicieron por el método de Kruskal-Wallis, en su caso seguido de U de Mann-Whitney. La frecuencia de bebés con valores anormales de cada marcador se comparó entre grupos por la prueba de Fisher exacta.

ANTECEDENTES

Toxoplasma gondii es un protozoo intracelular obligado como todos los miembros del Phylum Apicomplexa, subclase coccidia¹; etimológicamente *Toxoplasma* viene de la palabra griega Toxon y hace referencia a su forma en arco o media luna de su citoesqueleto²; es de distribución universal y, probablemente, el agente más frecuente de infección por protozoarios en el ser humano.³

Morfología

Toxoplasma gondii presenta diferentes formas durante su ciclo de vida:

Ooquiste

Mide aproximadamente 10-12 μm , es ovoide y está rodeado por un fino velo electrolúcido, y tiene un micropilo (depresión discoide) localizado en la superficie de la pared. Al madurar produce 8 esporozoitos infecciosos, que son capaces de permanecer en el medio ambiente durante meses, particularmente en climas cálidos, donde la humedad es alta. El ooquiste y los quistes tisulares son las formas parasitarias más importantes desde el punto de vista de transmisión.^{1,3,8,9,10}

Taquizoíto

Mide aproximadamente de 2 a 4 μm de ancho y de 4 a 8 μm de largo; tiene forma de media luna u oval. Está compuesto de un extremo anterior que termina en punta y uno posterior redondo; además, cuenta con un complejo apical que está constituido por el conoide, los anillos polares, los microtúbulos, las roptrias y el micronemo, estructuras involucradas en los procesos de motilidad, secreción e invasión celular. Esta es la forma activa de replicación, por lo que es la responsable de la multiplicación y diseminación de la infección, así como de la destrucción de las células nucleadas donde se aloja. Se le encuentra en la sangre y los tejidos durante la infección aguda.^{1,2,3,7,8,9}

Bradizoíto

Es la forma crónica y de lenta multiplicación, contenida en los quistes, capaz de permanecer inactivo durante largos períodos de tiempo. Puede reactivarse cuando se deteriora la inmunidad celular.^{3,8,9}

Quiste tisular

Pueden contener varios miles de bradizoítos y persisten indefinidamente; pueden medir entre 15-100 μm , están rodeados por una cutícula quística que les permite permanecer en los tejidos durante largo tiempo. Se les encuentra principalmente en miocardio, músculo estriado y sistema nervioso central (SNC).^{3,7,8,9}

Ciclo de vida

Se desarrolla en dos tipos de hospederos: uno definitivo y varios intermediarios:

Fase de reproducción sexual

Los miembros de la familia de los felinos son los hospederos definitivos (incluido el gato doméstico) y pueden infectarse de dos maneras: a) pueden ingerir presas infectadas (ratones o aves) en cuyos tejidos se encuentran alojados los quistes tisulares, o b) pueden ingerir ooquistes del medio ambiente (tierra, agua y pasto). Al romperse el quiste tisular o el ooquiste por las enzimas digestivas, se liberan los bradizoítos o esporozoitos e inician una proliferación en las células epiteliales del intestino delgado, iniciando así la fase sexual, por su transformación en gametos masculinos y femeninos, que al fusionarse dan origen al cigoto y posteriormente al ooquiste, el cual se elimina por medio de las heces del gato (aproximadamente de 3-10 días después de la ingesta de la infección). Estos ooquistes son liberados al medio ambiente en forma no esporulada, que en un periodo de 18 días y, en condiciones adecuadas de temperatura y humedad, son capaces de esporular, produciendo 2 esporoquistes con 4 esporozoitos cada uno, formas infectivas. Un gato infectado puede liberar hasta 10 millones de ooquistes por día, durante un periodo de hasta 3 semanas, y éstos pueden permanecer viables en la tierra o

agua hasta 18 meses, contaminando el suelo, hortalizas, jardines y zonas de recreo donde conviven personas y animales domésticos.^{3,8,11}

Fase de reproducción asexual

Los animales de sangre caliente, incluyendo al ser humano y las aves, son los hospederos intermediarios, que pueden infectarse por ingestión directa de quistes tisulares presentes en carne mal cocida o de ooquistes en agua, frutas y verduras contaminadas. Por acción de los jugos gástricos, son liberados los bradizoítos o esporozoítos al ambiente intestinal e invaden células epiteliales, dando lugar a los taquizoítos, que a su vez invaden a casi todas las células nucleadas, multiplicándose dentro de ellas hasta formar rosetas de 2 a 32 taquizoítos; después ocurre la ruptura de las células y la invasión de otras nuevas; también pueden circular en el torrente sanguíneo, saliva y leche, infectando otros tejidos. Finalmente, los taquizoítos comienzan a convertirse en bradizoítos, que se enquistan.^{8,11}

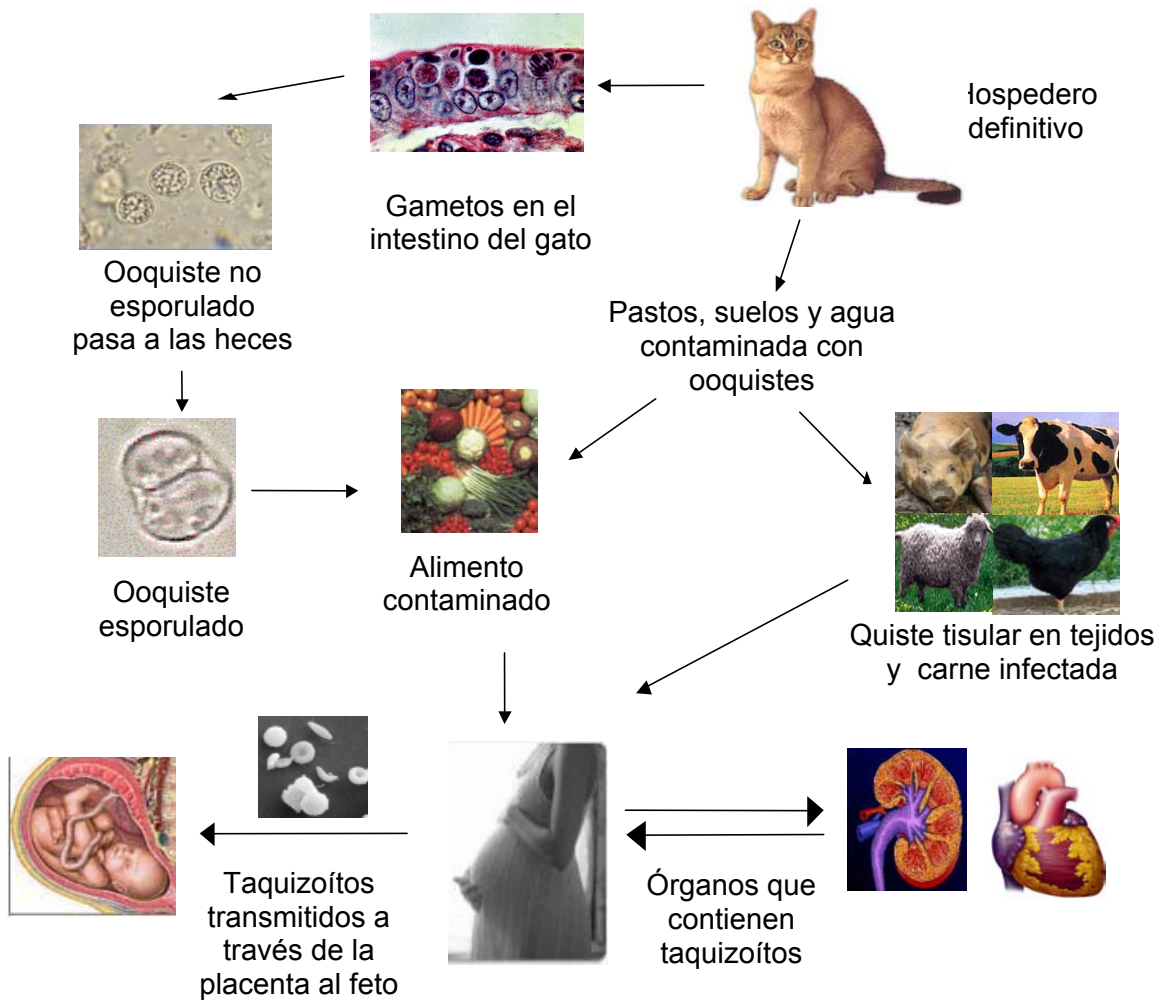


Figura 1. Ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*

Vías de transmisión

Transmisión por vía oral

La infección por *T. gondii* se adquiere por la ingestión de carne cruda o poco cocida que contenga quistes tisulares, o por la ingestión de ooquistes excretados por las heces de gatos parasitados y madurados en el ambiente. La contaminación de aguas u hortalizas por ooquistes, o la manipulación de tierra o plantas (jardineros o amas de casa) que estén en contacto con excrementos de gato, pueden acarrear la contaminación de los alimentos crudos o la transmisión directa a la boca. Por otro parte, las personas que manipulan carne (amas de casa, tablajeros, veterinarios, personal de rastros), y que presentan lesiones cutáneas y trabajan sin algún tipo de protección, también están expuestas directamente a una contaminación accidental.¹²

Transmisión transplacentaria

La toxoplasmosis adquirida durante el embarazo es responsable de más defectos congénitos que el herpes, la rubéola y la sífilis juntos y es más común e insidiosa de lo que hasta ahora han creído médicos e investigadores.¹³

Se produce durante la fase de parasitemia, por infección de la placenta; a través del cordón umbilical puede producirse la infección del feto, causando secuelas irreversibles y hasta muerte. Diversos factores como el inóculo parasitario, la virulencia de la cepa, el estado inmunológico de la mujer y el estadio evolutivo de la placenta van a condicionar la posibilidad de una infección fetal, el tiempo que media entre ambos procesos y su gravedad. El trimestre de gestación en el cual se infecta la madre es determinante sobre la infección fetal: las primoinfecciones en el primer trimestre se relacionan con un 1 a 10% de transmisión vertical, mientras que en el otro extremo del periodo gestacional la tasa de infección fetal llega a ser del 80%.¹² El daño que ocasiona el parásito al embrión o feto cuando éste se infecta, presenta un patrón invertido: en las primeras semanas de gestación el daño es muy grave, mientras que los bebés infectados en el último

periodo nacen asintomáticos aunque la mayoría de ellos desarrollará secuelas posteriormente.^{12,14}

La infección fetal puede ser prevenida o cuando menos atenuada por medio de detección precoz de las gestantes y su posterior seguimiento serológico, así como por aplicación de terapia a las que tienen una infección aguda.^{13,15}

Epidemiología

La epidemiología global de la infección por *Toxoplasma gondii* varía ampliamente de acuerdo a las condiciones climatológicas, culturales y los factores de riesgo asociados a la transmisión. La infección es más frecuente en regiones de clima cálido-húmedo que en las de clima frío y seco.^{17,18} Se ha encontrado alta prevalencia en diversos lugares como Francia, numerosas islas del Pacífico, y países de América Central tales como Panamá y Costa Rica. En países Escandinavos, Japón e Islandia se ha encontrado baja prevalencia.¹⁰

En México, existen pocos estudios epidemiológicos en la población en general; uno de ellos es el de Roch y Varela, que en 1966, utilizando la técnica de Sabin y Feldman describieron una seropositividad de 30%. En la Encuesta Nacional Seroepidemiológica de 1987, se reportó una frecuencia de anticuerpos de 50% con variaciones de acuerdo al área geográfica desde 17.1% para Baja California Sur, hasta 67.5% para Tabasco.^{18,31} En fechas más recientes, en una población de donadores de sangre de Jalisco, se encontró una prevalencia de anticuerpos de clase IgG del 29% y de clase IgM de 3.6%.²⁵

En relación a la infección perinatal, tampoco hay muchos datos. En mujeres con embarazo normal en Jalisco, se informaron frecuencias de 20% y 3% para anticuerpos IgG e IgM, respectivamente;³¹ mientras que en una población de mujeres embarazadas en una localidad semi-rural en Jojutla, Morelos, se encontró una frecuencia muy alta de anticuerpos tanto IgG como IgM (85 y 11%, respectivamente).²⁶ Más recientemente, se demostró una tasa de 2 recién nacidos infectados por cada 1000 nacidos en la ciudad de México, ambos asintomáticos.²⁷

Respuesta inmune

En una infección por *T. gondii* se produce respuesta inmune tanto humoral como celular; primero se inicia con la respuesta innata, debida principalmente a células asesinas naturales (NK) y macrófagos no activados, que intentan la destrucción del parásito o de las células infectadas por mecanismos inespecíficos. Posteriormente aparece la respuesta adaptativa, que es mediada por los linfocitos T CD4+ y CD8+, y B, células dendríticas y los mismos NK y fagocitos monocucleares, pero activados y opsonizados por anticuerpos.²³

Inmunidad Celular

La infección por *T. gondii* resulta en una fuerte y persistente respuesta de tipo Th1 (T-helper-1) caracterizada por la producción de interleucina-12 (IL-12), interferón-gamma (INF- γ) y citocinas proinflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α). La acción combinada de estas citocinas y otros mecanismos inmunológicos protegen al hospedero contra la rápida replicación de los taquizoítos y subsecuentes cambios patológicos en ambas fases de infección, aguda y crónica, además de que son capaces de activar a más linfocitos-T CD8+ y CD4+.¹

Las células T CD4+ actúan sinérgicamente con las células T CD8+ para producir y mantener la inmunoprotección. Las células T CD8+ actúan induciendo la muerte necrótica o apoptótica de células infectadas; después de ser estimuladas por antígenos de *T. gondii* y en la presencia de IL-12 también actúan como mediadoras, secretando INF- γ .^{22-24,29,30}

Al inicio de la infección algunos linfocitos T-CD4+ liberan IL-2 que activa a los linfocitos B con receptores específicos y éstos se diferencian a células plasmáticas para después dar origen a anticuerpos séricos dirigidos contra antígenos del parásito. Asimismo, algunos antígenos de *T. gondii* interactúan directamente con receptores de linfocitos B y éstos son capaces de producir inmediatamente anticuerpos de clase IgM (fase aguda de la infección).²²⁻²⁴

Inmunidad humoral

Las primera inmunoglobulina producida es de clase IgM, seguida por la de clase IgA; ambas pueden ser detectadas durante la fase aguda de la enfermedad, es decir, durante los dos primeros meses después de la infección; sin embargo, la IgM puede circular hasta dos años después, por lo que su presencia no siempre se liga a una infección reciente. La inmunoglobulina G aparece más tardíamente, alcanzando el máximo en uno o dos meses, y luego persiste en valores estables durante años.^{22-24,28,29}

Aspectos clínicos

Cuadro clínico

Cuando existe toxoplasmosis con signos y síntomas aparentes en el recién nacido, por lo general se trata de una forma clínica grave con presencia de cuadro neurológico prominente, y regularmente conduce a secuelas importantes o la muerte. Puede presentarse como un cuadro de meningoencefalitis con datos de síndrome infeccioso, cráneo hipertensivo, irritación meníngea y signos de lesión neurológica variable, que se acompaña de hidrocefalia, macro o microcefalia y frecuentemente lesiones oculares. En uno de cada tres casos puede presentarse daño hepato-celular manifestándose como síndrome icterico de evolución prolongada, coluria (coloración oscura de la orina debida a la excreción de bilirrubina por vía urinaria), acolia (ausencia o disminución de la secreción biliar) y hepato-esplenomegalia.

En ocasiones el niño nace aparentemente normal y empieza a manifestar sintomatología algunas semanas, e incluso dos o tres meses después del nacimiento. Las secuelas o recidivas de una infección previa son la mayor parte de naturaleza neurológica y ocular y aparecen en edades tardías.

Con el diagnóstico de laboratorio se podrán identificar casos asintomáticos o con escasas manifestaciones clínicas. La toxoplasmosis congénita debe ser diferenciada de otras enfermedades del síndrome TORCH (rubéola,

citomegalovirus y *Herpes simplex*), sífilis, *Listeria* y otras infecciones bacterianas, encefalopatías infecciosas, eritroblastosis fetal y sepsis.³

Diagnóstico

El diagnóstico de la toxoplasmosis se basa en el cuadro clínico, auxiliado de pruebas de laboratorio y estudios de gabinete para reforzarlo; dentro de éstos, se encuentran la radiografía, el ultrasonido, la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RM) para la búsqueda de calcificaciones cerebrales.³

Diagnóstico de laboratorio

Debido a que la mayoría de los casos de infección por *T. gondii* son subclínicos, el diagnóstico se basa en pruebas de laboratorio indirectas, basadas en la detección de anticuerpos en suero, o directas, buscando a los parásitos o partes de ellos directamente.

Las técnicas indirectas más empleadas son hemaglutinación, inmunofluorescencia indirecta (IFI), Sabin y Feldman, ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) y Western blot (Inmunoelctrotransferencia); de entre éstas la más utilizada es ELISA, ya que es una técnica fácil de realizar, sencilla y altamente sensible con respecto a las demás.^{3,5,6,19-21}

Las técnicas directas incluyen la histopatología, el aislamiento *in vivo* (en ratones) o *in vitro* (en cultivos celulares), o la detección del DNA del parásito por procedimientos de hibridación o amplificación.^{8,9,32,33}

Tratamiento

El diagnóstico temprano de la toxoplasmosis congénita es esencial para iniciar cuanto antes el tratamiento de la infección.^{12,16} Cuando no ha habido transmisión vertical se aconseja la espiramicina hasta el fin de la gestación, es parasitostática, se concentra en la placenta donde bloquea la diseminación parasitaria y a partir del segundo trimestre pasa al feto, disminuye en un 50% el riesgo de transmisión y

no es tóxica. Otro fármaco de elección es la pirimetamina a la que se asocia sulfadiazina para potenciar su efecto. La pirimetamina está contraindicada antes de las 16 semanas de gestación por el riesgo teratogénico; como ambos fármacos tienen efecto anti-fólico, debe asociarse ácido fólico o folinato de calcio. En caso de intolerancia a la sulfadiazina la alternativa es dapsona. Cuando hay alergia a las sulfas, la clindamicina la reemplaza, aunque con menor eficacia. Otra alternativa de las sulfas es claritromicina o azitromicina.^{16,17,30}

Biomarcadores de daño neurológico

Hay parámetros bioquímicos de gran importancia porque su valor diagnóstico y pronóstico ha permitido establecer criterios de evolución y tratamiento de diferentes enfermedades. Tal es el caso de ciertos compuestos biológicos o biomarcadores, cuya presencia o la alteración de sus valores normales, indican cambios metabólicos o manifestaciones clínicas de alguna enfermedad.

La hipoxemia, la hipoxia y la isquemia son situaciones que pueden ejercer efectos nocivos sobre el metabolismo y la estructura celular, siendo especialmente vulnerables las neuronas.³⁵

En el sistema nervioso central (SNC) se han utilizado diversos biomarcadores como indicadores de daño neuronal, podemos señalar a las isoenzimas de la creatinin-cinasa, la lactato deshidrogenasa, la aspartato aminotransferasa, la hidroxibutirato deshidrogenasa, el ácido láctico, el glutamato, el aspartato, algunas citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 y TNF- α), la hipoxantina y la xantina.^{36,61}

La proteína S-100 y la enolasa específica de neuronas (NSE) son indicadores de daño cerebral. Se han reportado incrementos en los niveles plasmáticos de ambas proteínas después de daños cerebrales como consecuencia de golpes o traumatismos, daño cerebral por hipoxia posterior a un paro cardíaco y heridas o lesiones en la cabeza. Recientemente han sido señaladas como posibles marcadores de daño cerebral después de cirugía cardíaca.^{37,61}

S-100

En 1965 Moore aisló una fracción subcelular de cerebro bovino que contenía proteínas específicas del sistema nervioso. Esta fracción fue llamada S100 porque los constituyentes fueron solubles en 100% de sulfato de amonio saturado a pH neutro. Estudios subsecuentes demostraron que esta fracción contenía predominantemente dos polipéptidos, S100A1 y S100B, los cuales tenían pesos moleculares de aproximadamente 10,000 Da y contenían dos altas afinidades a sitios de unión de calcio del tipo manos EF (α -hélice-asa- α -hélice).^{43-45,54} Las proteínas S100 son altamente conservadas en su composición de aminoácidos entre especies de vertebrados. La mayoría de proteínas S-100 existen como dímeros (frecuentemente homodímeros) dentro de células y son generalmente expresados y distribuidos en tipos celulares definidos, indicando un papel biológico conservado.^{45,46}

La proteína S-100B es un homodímero de la subunidad β , tiene un peso molecular de aproximadamente 21 kDa y constituye la mayor parte de la fracción de proteína que fue aislada de extractos de cerebro (S-100A ($\alpha\beta$) 5% en abundancia y S-100B ($\beta\beta$) 95% en abundancia). En el sistema nervioso, la proteína aparece por ser más abundante en células de la glía (citosol); en tejidos no neuronales está distribuido ampliamente e incluye melanocitos, células de Langerhans, condrocitos, células satélite de la glándula adrenal, células de Leydig, células de Schwann, y el tejido adiposo constituye un sitio de concentración para la proteína comparable al tejido nervioso.^{35,38,43-48,50-52} Es eliminada o metabolizada por el riñón con un tiempo medio biológico de ~ 1 h.^{37,41,43-44,46} Ha sido medida en varios fluidos biológicos por ejemplo LCR, sangre, orina, líquido amniótico, sangre de cordón y placenta.^{45-48,50}

Enolasa específica de neuronas (NSE)

Moore y McGregor en 1965 fueron los primeros que mostraron que el tejido nervioso es único y que contiene un número de proteínas solubles altamente ácidas que no se observan en otros tejidos. De estos estudios, dos proteínas altamente ácidas de cerebro fueron purificadas y caracterizadas, las cuales fueron designadas como proteínas 14-3-2 y S-100.⁴⁵ La proteína 14-3-2 es característica

de neuronas (citosol), por lo que fue llamada proteína específica-neuronal y desde entonces se observó que presentaba actividad la enolasa, por lo que ha sido finalmente nombrada enolasa neuron-específica (NSE).^{36,46,54,57}

La NSE es una isoforma de la enzima glicolítica enolasa (2-fosfo-D-glicerato hidrolasa).^{35,54,55,56} Está compuesta por las subunidades $\gamma\gamma$, pero existen otras cuatro isoenzimas: $\alpha\gamma$, $\alpha\alpha$, $\beta\beta$ y $\alpha\beta$.^{56,57,60} La expresión de la α -enolasa es detectada en la mayoría de los tejidos, mientras que la β -enolasa se expresa en tejido muscular y la γ -enolasa es detectada en tejido nervioso⁵⁸. La γ -enolasa se conoce como enolasa específica neuronal y se encuentra en neuronas y tejidos neuroectodérmicos.^{55,56} Tiene un peso molecular de 78 kDa y un tiempo de vida biológico medio de 24 horas. Representa el 1.5% de todas las proteínas solubles cerebrales, es estable en fluidos biológicos y constituye un marcador de lesión o necrosis neuronal. Su presencia en sangre está relacionada a un alto grado de mortalidad de neuronas y células neuroendocrinas. Teóricamente la enolasa debe ser un mejor marcador de daño neuronal que la S-100.^{35,37,58,59}

Sin embargo, la γ -enolasa también está presente en eritrocitos y plaquetas. Por lo tanto, una hemólisis puede incrementar sustancialmente el valor de la enolasa en plasma, y su uso puede estar limitado como un marcador efectivo de daño cerebral.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La infección congénita por *Toxoplasma gondii* puede producir alteraciones en el sistema nervioso central, disminuyendo la expectativa y calidad de vida del paciente pediátrico. Los niños con infección congénita pueden desarrollar problemas visuales y neurológicos de diversos grados, llegando incluso hasta la muerte. Sin embargo, del 80 al 90% de los casos son asintomáticos al nacer; y cuando se presentan secuelas de la infección, meses o años después, el beneficio terapéutico es mínimo. Por ello se han instalado programas de tamiz neonatal en varios países, y a aquellos casos que se confirman por pruebas de laboratorio, se les da tratamiento profiláctico; sin embargo, éste es prolongado y agresivo ya que afecta la médula ósea, entre otros tejidos; además no todos los casos desarrollan problemas clínicos posteriormente.

La estimación temprana del desarrollo de una lesión neurológica, podría ser de gran utilidad para la toma de decisiones terapéuticas en neonatos con infección congénita por *T. gondii*. Se ha reportado que existen marcadores biológicos que pueden servir como indicadores de daño neurológico en otros padecimientos, entre los cuales se encuentran la NSE y S-100, pero no hay antecedentes de los niveles de estas proteínas en neonatos infectados *in utero*, y por lo tanto tampoco de la relación de altos niveles de alguna de ellas con problemas del sistema nervioso central ocasionados por el parásito. Debido a esto, es importante realizar un estudio piloto en el que se determine si existe alguna alteración en los niveles de estos biomarcadores, que permita proponer un estudio para analizar su valor pronóstico en esta infección congénita.

OBJETIVOS

- Comparar los niveles séricos de la NSE y la proteína S-100B entre recién nacidos infectados por *Toxoplasma gondii* y recién nacidos sanos
- Comparar los niveles séricos de la NSE y la proteína S-100B entre recién nacidos infectados por *Toxoplasma gondii* con síntomas neurológicos, aquellos con síndromes no neurológicos y niños asintomáticos.

HIPÓTESIS GENERAL

Las concentraciones elevadas en suero de la NSE y la S-100B son marcadores biológicos de daño neurológico, por lo que serán más altas en recién nacidos con toxoplasmosis congénita neurológicamente sintomáticos, que en bebés infectados sin problemas neurológicos y en sanos.

Hipótesis secundarias

- Los niveles séricos de la NSE y la S-100B serán mayores en los niños recién nacidos con infección congénita por *Toxoplasma gondii* que en los niños no infectados.
- Los niveles séricos de la NSE y la S-100B serán mayores en los niños recién nacidos con infección congénita por *Toxoplasma gondii* con síntomas neurológicos que en aquellos con otros problemas clínicos o sin síntomas.

METODOLOGIA

Tipo de estudio

Comparativo, transversal, observacional, prospectivo y retrolectivo

Variables

Independiente: Grupo, nominal

Dependiente: Niveles de NSE y S-100B, cuantitativa en ng/mL, los niveles se convertirán también en variable dicotómica: normal / anormal. Sólo encontramos un reporte de los valores normales de estas proteínas en suero de recién nacidos (anexo); de cualquier manera se tomarán en cuenta los niveles de los sueros de los controles sanos, debido a que en nuestra población estos valores podrían ser distintos.

Estrategia general

Fase I

Estandarización de un inmunoensayo enzimático de captura de antígenos (ELISA) basado en el uso de un anticuerpo de captura y otro de revelado para detección de las proteínas NSE y S-100B, se determinaron las diluciones de anticuerpos monoclonales y policlonales a emplear, las diluciones de los sueros y del conjugado para ambas proteínas. Los anticuerpos que fueron probados son de marcas comerciales y se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Anticuerpos monoclonales y policlonales que fueron probados

Anti-NSE				Anti-S-100B			
Marca	No. catalogo	Isotipo	Tipo de anticuerpo	Marca	No. catalogo	Isotipo	Tipo de anticuerpo
Biodesign	M86416M	IgG2b	Monoclonal	ABCAM	Ab8330	IgG1	Monoclonal
Biodesign	M86101M	IgG2a	Monoclonal	ABCAM	Ab8332	IgG1	Monoclonal
ABCAM	Ab8324	IgG2b	Monoclonal	ABCAM	Ab7853	IgG	Policlonal
ABCAM	Ab8328	IgG2a	Monoclonal				
ABCAM	Ab834	IgG	Policlonal				

Para poner en evidencia la reacción se utilizó un sustrato productor de color, la intensidad de la coloración es proporcional a la magnitud de la reacción llevada a cabo y la lectura de absorbancia a 490 nm de cada una de las muestras se realizó en un espectrofotómetro (Wallace - Victor 2, Perkin-Elmer).

Fase II

Siguiendo el diagrama del diseño experimental que se muestra en la cuadro 2, se probaron muestras de un banco de sueros de infantes clasificados de acuerdo a la presencia de infección por *T. gondii* y de síntomas compatibles con esta enfermedad, unos que involucran al sistema nervioso central y otros no.

Los grupos que se probaron son los sintomáticos y asintomáticos con daño neuronal por toxoplasmosis, así como también un grupo control que no presentó algún daño.

Se tomaron en cuenta los siguientes criterios para incluir o no las muestras dentro de la tesis; además de seguirse las definiciones operacionales con las que se clasificaron las muestras.

Criterios de inclusión

Cualquier suero de niño o niña tomado de sangre del cordón umbilical al nacimiento; confirmado por pruebas de laboratorio como positivo a la infección por *Toxoplasma gondii*, con manifestaciones clínicas de la enfermedad (toxoplasmosis congénita) o que curse la enfermedad de manera asintomática.

Crterios de no-inclusión

Muestras de suero que presentaron hemólisis, y muestras de las cuales ya no hubo suficiente cantidad para seguir la metodología.

Definiciones operacionales

Casos confirmados de toxoplasmosis congénita: Niños recién nacidos con manifestaciones clínicas de toxoplasmosis y confirmados por pruebas de laboratorio.

Casos confirmados con toxoplasmosis congénita sintomáticos con problemas neuro/ofáltmicos: Niños recién nacidos que presentan síntomas y alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) causados por *Toxoplasma gondii* y confirmados por pruebas de laboratorio.

Casos confirmados con toxoplasmosis congénita sintomáticos con problemas externos al sistema nervioso: Niños recién nacidos que presentan síntomas y alteraciones en órganos y tejidos externos al sistema nervioso y el ojo, causados por *Toxoplasma gondii* y confirmados por pruebas de laboratorio.

Casos confirmados con toxoplasmosis congénita asintomáticos: Niños recién nacidos asintomáticos pero con infección congénita por *Toxoplasma gondii*, demostrada por pruebas de laboratorio.

Casos con otros problemas neurológicos. Niños recién nacidos que presentan síntomas y alteraciones en el sistema nervioso central (SNC) por causas ajenas a *Toxoplasma gondii* y confirmados como negativos por pruebas de laboratorio.

Control: Niños recién nacidos sanos y asintomáticos sin infección por *Toxoplasma gondii*, demostrado por pruebas de laboratorio.

*Cuadro 2. Pruebas de laboratorio confirmatorias de infección congénita por *Toxoplasma gondii*.*

Anticuerpos (acs) IgM en el suero del recién nacido (RN)	Acs IgA en el suero del RN	Acs IgG en el suero del RN por ELISA	Prueba confirmatoria Western blot comparativo madre hijo	Diagnóstico
+	+	+	Neo-anticuerpos en el neonato (NeA)	Infección Congénita
+	-	-	-	Infección congénita
-	+	-	-	Infección congénita
-	-	+	+ NeA	Infección congénita
-	-	+	+ (patrón igual madre / hijo)	No infectado, protegido por acs maternos (inmunes)
-	-	-	-	No infectado
-	-	+	-	Falso positivo, no infectado

Las muestras de suero se mantuvieron en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

En cada una de las muestras se evaluó la concentración sérica de la NSE y la proteína S-100B empleando anticuerpos monoclonales.

En cada placa se utilizó una curva patrón que permitió que al probar las muestras de suero de los recién nacidos por duplicado, los resultados obtenidos se interpolarán con la concentración previamente establecida en la estandarización cuantificar y conocer la concentración de la proteína en ng/mL.

MATERIAL Y MÉTODOS

La fase de estandarización para la cuantificación de las proteínas S-100 y NSE se realizó por medio de un ELISA de captura de antígenos, éste ensayo se basa en la fijación a una placa de ELISA de un primer anticuerpo monoclonal (AcMo) específico para cada enzima, que tiene la función de capturar al antígeno (S-100B o NSE), después se añade la muestra problema (en este caso suero o plasma), y en otros pozos de la misma placa se realiza una curva estándar de la enzima correspondiente a diferentes concentraciones, que se usa para intrapolar los valores obtenidos al final del ensayo y así poder determinar la concentración de la proteína en cada muestra (figura 2).

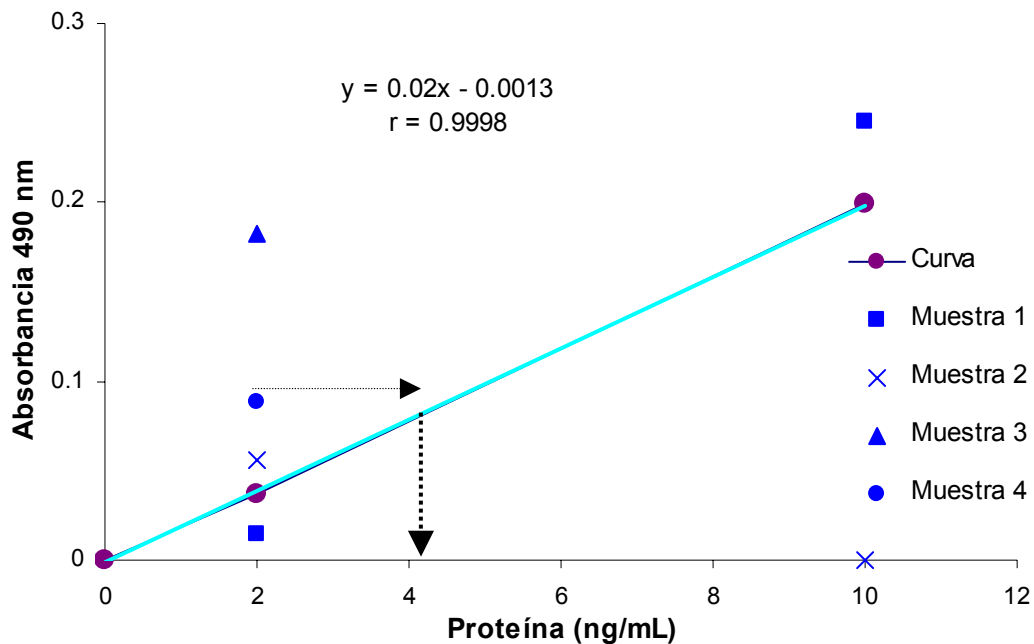


Figura 2. Ejemplo de la intrapolación de los resultados de una muestra problema. Las flechas punteadas indican cual es el valor de la proteína (ng/mL) en la muestra.

Para demostrar la presencia del antígeno capturado, se coloca un segundo anticuerpo policlonal (AcPo) contra la misma proteína, y la reacción se revela con un conjugado que es un anticuerpo específico contra el AcPo, acoplado a peroxidasa (figura 3).

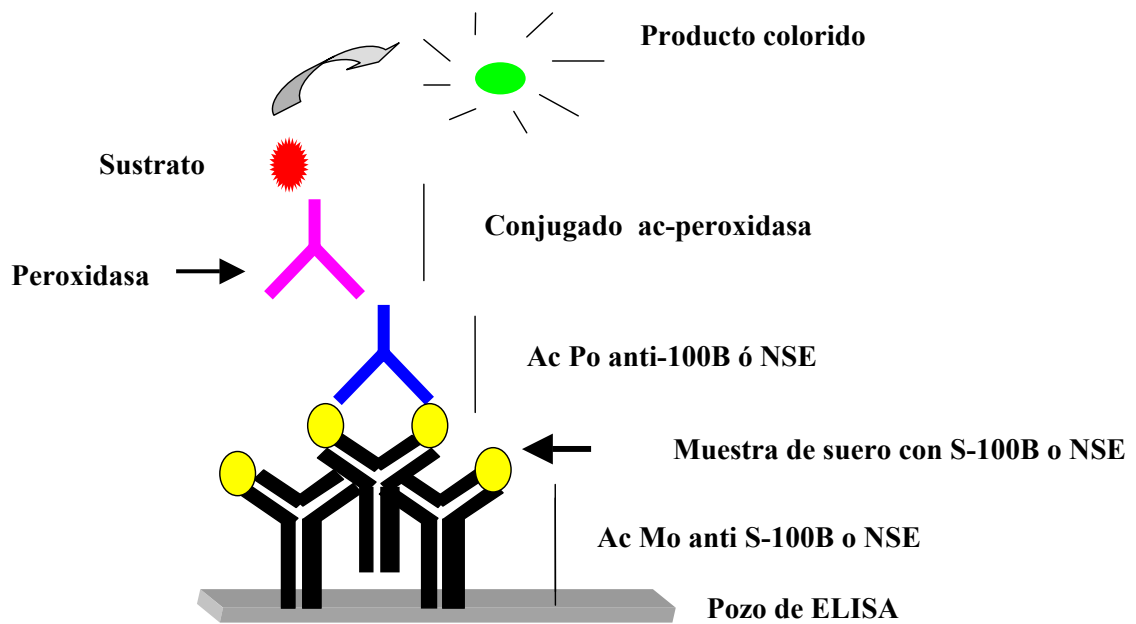


Figura 3. Esquema representando el ELISA de captura de las proteínas S-100B y NSE

Se usaron muestras de un banco de sueros de cordón umbilical o sangre periférica de infantes entre 0 y 365 días de edad, que se procesaron para determinar la presencia de infección congénita por *Toxoplasma gondii* (cuadro 2). En cada una de las muestras se determinó la concentración de la S-100B y NSE empleando las condiciones óptimas. Las muestras se probaron por duplicado y los resultados obtenidos se interpolaron para establecer la concentración de la proteína en ng/mL.

Cuadro 2. Muestras probadas del banco de sueros.

Tipo de muestras		No. de muestras	Manifestaciones clínicas
Infectados	Sintomáticos	5	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Daño hepático y visceral ❖ Prematuro ❖ Retraso desarrollo intrauterino, prematuro de 29 semanas ❖ Afectación ocular (coriorretinitis) ❖ Bajo peso
	Asintomáticos	8	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sin manifestaciones
No infectados	Sintomáticos	4	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Problema de desarrollo del sistema nervioso central generalizado ❖ Prematuro ❖ Hidrocefalia ❖ Bajo peso
	Asintomáticos	20	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Sin manifestaciones

ELISA de captura de antígenos

Se utilizaron microplacas de poliestireno de fondo plano translucidas para ELISA (MaxiSorp, NUNC). Se colocaron 100 µl/pozo del anticuerpo monoclonal a la dilución seleccionada (1:400 para S-100B y 1:800 para NSE) en solución amortiguadora de boratos pH 8.0, y se incubó toda la noche a 4°C. Se realizaron los siguientes lavados: 5 veces con 200 µl/pozo de PBS con Tween 20 al 0.3% v/v (PBS-T20 0.3%) y 1 vez con PBS pH 7.2, durante 5 minutos. A continuación, se incubó con albúmina sérica bovina (BSA) al 1.0% en PBS-T20 0.05% v/v durante 30 min. a 37°C. Después de lavar, los sueros problema se prepararon a la dilución óptima (en el caso de NSE se utilizó 1:3 y para S-100 se utilizó concentrado) en PBS-T20 0.3% y se colocaron por duplicado, se

incubó la placa durante 2 horas a 37°C. Después se lavó y se añadieron 100 µl/pozo de anticuerpo policlonal a la dilución óptima (NSE 1:200 y S-100 1:400) en PBS-T20 0.05% y se incubó 2 horas a 37°C. Posteriormente se lavó y se añadieron 100 µl/pozo del conjugado anti-IgG de conejo fijado a peroxidasa a la dilución establecida (1:16000). Se incubó 2 horas a 37°C y se hicieron los lavados correspondientes. Se añadieron 100 µl/pozo de la solución de cromógeno/sustrato, se incubó durante un máximo de 30 min. a temperatura ambiente en oscuridad y se detuvo la reacción con 50 µl/pozo de H₂SO₄ 1.0 N. Se registró la absorbancia a 490 nm en un espectrofotómetro para placas de ELISA.

RESULTADOS

Estandarización

Todos los anticuerpos utilizados son de marcas comerciales y (MoAc, PoAc y conjugado) primero fueron probados en ensayos en los que se acopla la proteína correspondiente directamente a la placa.

Se muestra a manera de ejemplo un par de ensayos para cada proteína (figura 4), con este tipo de curvas se determinó que el mejor MoAc para la S-100B fué el Ab8330 y para la NSE el M86416M. Para poner en evidencia las reacciones se utilizó un sustrato productor de color (Sigma, o-fenilendiamina Tabletas 10 mg, No. de catalogo: P-8287), ver anexo.

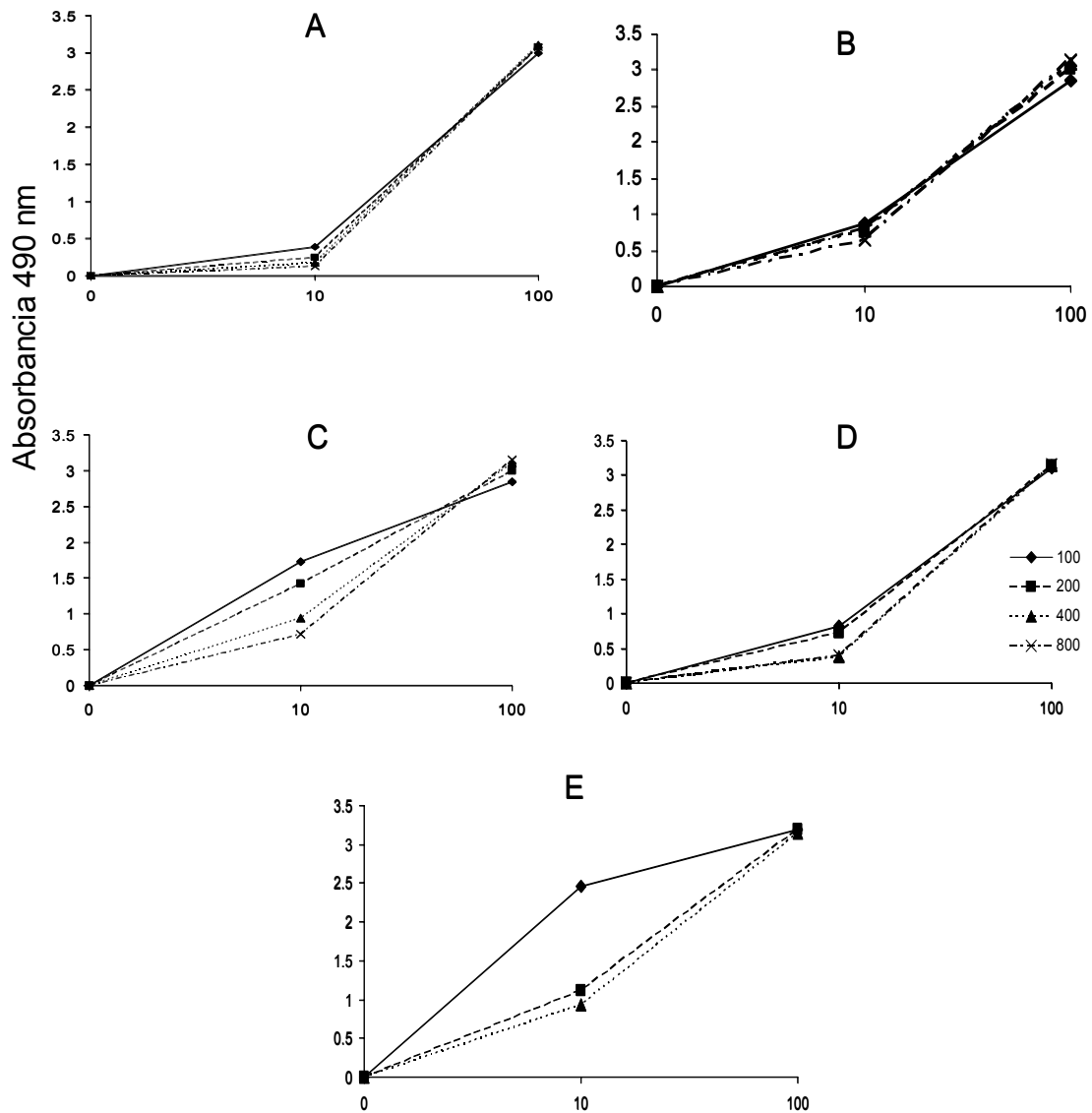


Figura 4. ELISA's directos usando anticuerpos monoclonales (A y B) y policlonales (C, D y E) contra la proteína S-100B (A y C) o la NSE (B, D y E). Los números al lado de la gráfica indican la recíproca de la dilución de anticuerpo usada. Estos ensayos fueron revelados con sustrato colorido.

También se probó la concentración de conjugado anti-IgG de conejo-peroxidasa adecuada en el sistema para lo cual se realizó un ensayo utilizando diferentes diluciones, teniendo como control positivo suero de conejo preinmune.

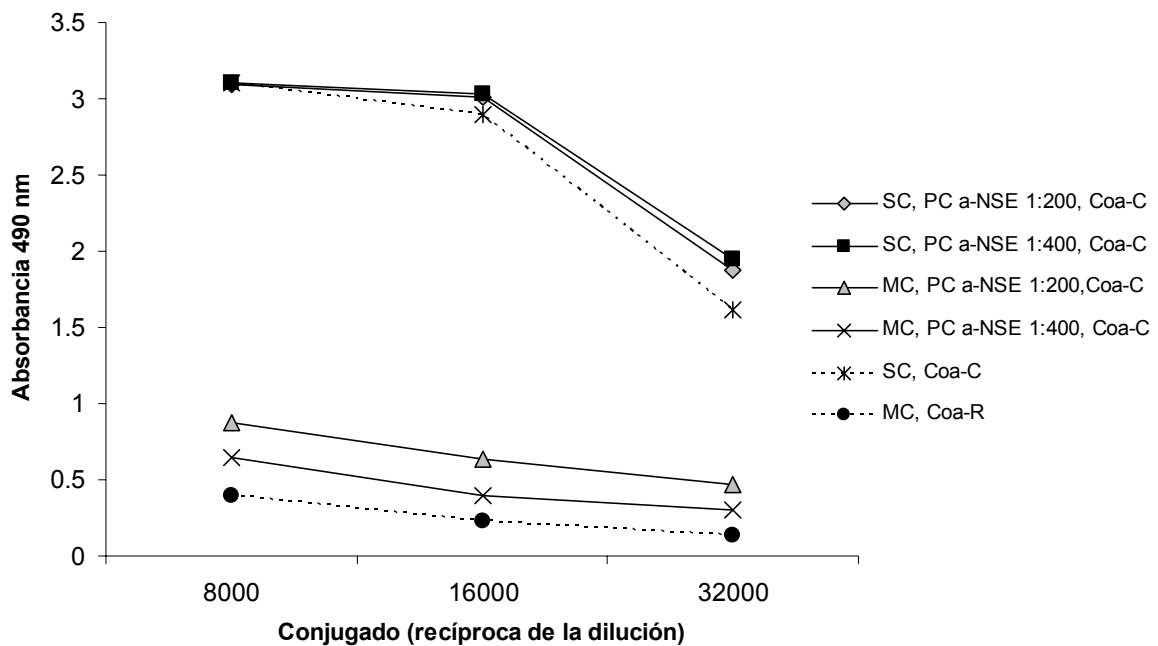


Figura 5: ELISA directo forrando con amortiguador de boratos y el monoclonal (Ab8330 para S-100B y M86416M para NSE) o suero de conejo preimmune, variando las diluciones de anticuerpo policlonal (Ab7853 para S-100B y Ab834 para NSE) y diferentes diluciones de conjugado ac-peroxidasa. SC: suero de conejo; PC a-NSE: policlonal anti-NSE; MC: monoclonal anti-NSE; Coa-C: conjugado anti-conejo-peroxidasa; Coa-R: conjugado anti-IgG-ratón-peroxidasa.

Con los ensayos realizados se observa cuales son las mejores diluciones a emplearse de los anticuerpos; por ejemplo, en la figura 4 vemos que los anticuerpos monoclonales y policlonales para S-100B funcionan bien a diluciones de 1:200 y 1:100 respectivamente; mientras que para la NSE, tanto los monoclonales como los policlonales funcionaron bien 1:200. La mejor dilución del conjugado fue 1:16,000 (figura 5).

Se siguieron variando las diluciones de los anticuerpos para afinar un poco más la técnica, observando que las mejores diluciones de anticuerpo monoclonal y policlonal para NSE y S-100B fueron 1:800 y 1:400, respectivamente.

Una vez encontradas las diluciones adecuadas para cada anticuerpo y conjugado, se procedió a combinar diferentes concentraciones del MoAc y PoAc en el ensayo de captura solamente para la curva patrón de las proteínas NSE o S-100B, forrando la placa con el anticuerpo monoclonal en solución

amortiguadora de carbonatos. Un ejemplo de estos ensayos se muestra en la figura 6.

Para otros tipos de ELISA's se utiliza para el forrado solución de boratos en vez de carbonatos, así que se probó y se observó un aumento de la sensibilidad de la reacción utilizando solución amortiguadora de boratos, por lo que en adelante se decidió forrar las placas con esta última solución.

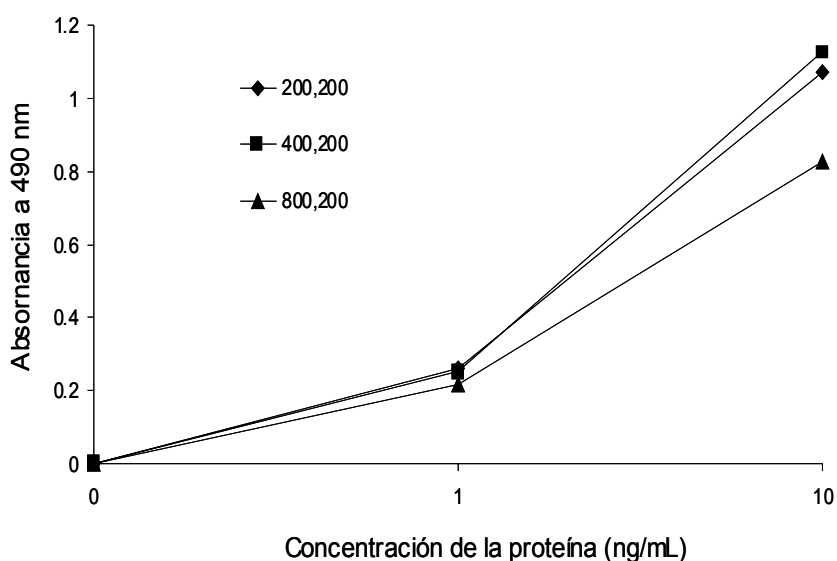


Figura 6. Ejemplo de un ensayo de captura usando distintas diluciones del MoAc de captura (Ab8330) y una dilución del PoAc (Ab7853), para la proteína NSE. Los datos insertados en la figura indican las combinaciones de dilución del MoAc, y del PoAc, probadas (datos en recíproca de dilución)

Se observó que la combinación de MoAc y PoAc a 1:400 y 1:200 respectivamente fue la más sensible para este ensayo, dado que se puede detectar la proteína desde una concentración de 1 ng/mL, para la NSE. Para la S100B la combinación de MoAc 1:600 y PoAc 1:400 fue muy sensible, ya que detecta concentraciones de proteína desde 0.125 ng/mL.

Debido a que la muestra en la que se evalúa la presencia de las proteínas es suero, se determinó el efecto de la concentración de albúmina equivalente a la encontrada en muestras séricas sin diluir o diluidas 1:3 ó 1:9, sobre el ensayo de captura, para lo cual se fabricó un suero artificial al cual se le añadió cierta cantidad de proteína para simular las condiciones reales en que se encuentran

en el cuerpo. Una vez realizado esto, se observó que al agregar la proteína al suero artificial la sensibilidad es mejor que cuando se añaden por separado el suero y la proteína.

También se determinó el efecto que tiene la preincubación de la proteína 1h a 37°C en el suero artificial, en agitación constante, simulando las condiciones en que se encuentran en el ser humano, mostrando que se inhibe la reacción a concentraciones de 10ng/mL cuando las proteínas son agregadas al suero artificial sin ser preincubadas en agitación constante, como se observa en la figura 7. Por lo que se decidió continuar preincubando las muestras.

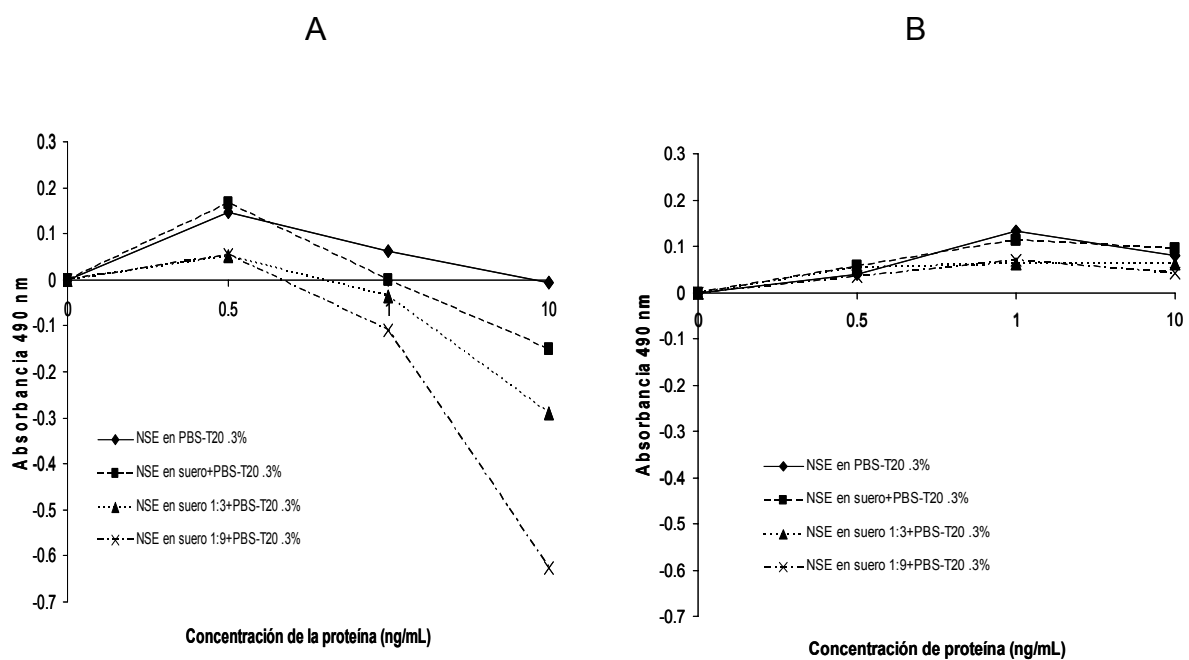


Figura 7. Ejemplo de comparación entre gráficas para la proteína NSE mostrando las diferencias cuando se preincuba la proteína con el suero artificial y cuando se agregan por separado y sin preincubar. A: proteína NSE añadida al suero artificial. B: proteína NSE añadida al suero artificial y preincubada 1 h a 37°C en agitación constante

También se ensayó el uso de diferentes concentraciones de detergente Tween 20, para mejorar los lavados, y deshacer enlaces débiles de las proteínas con la albúmina del suero artificial (figura 8).

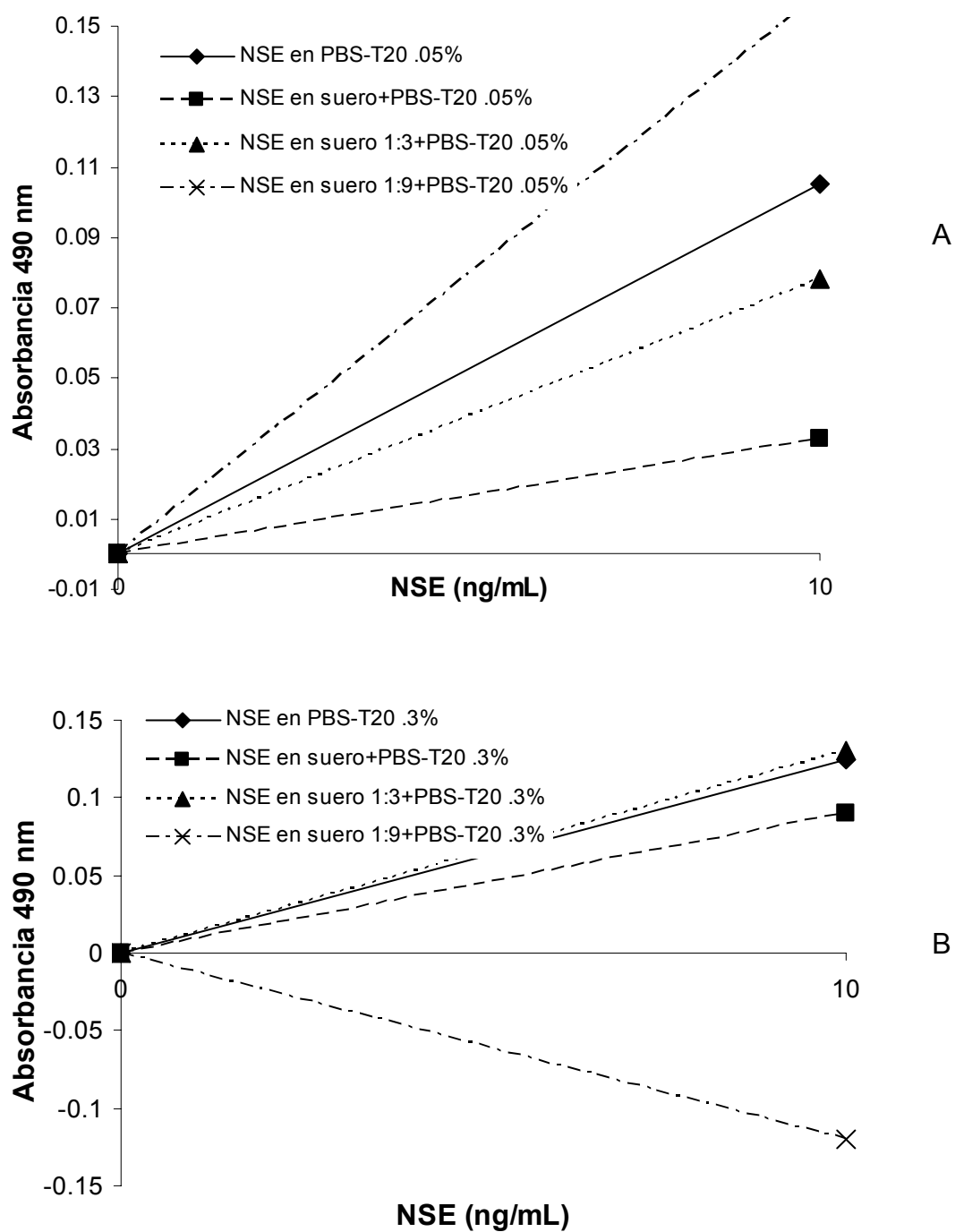
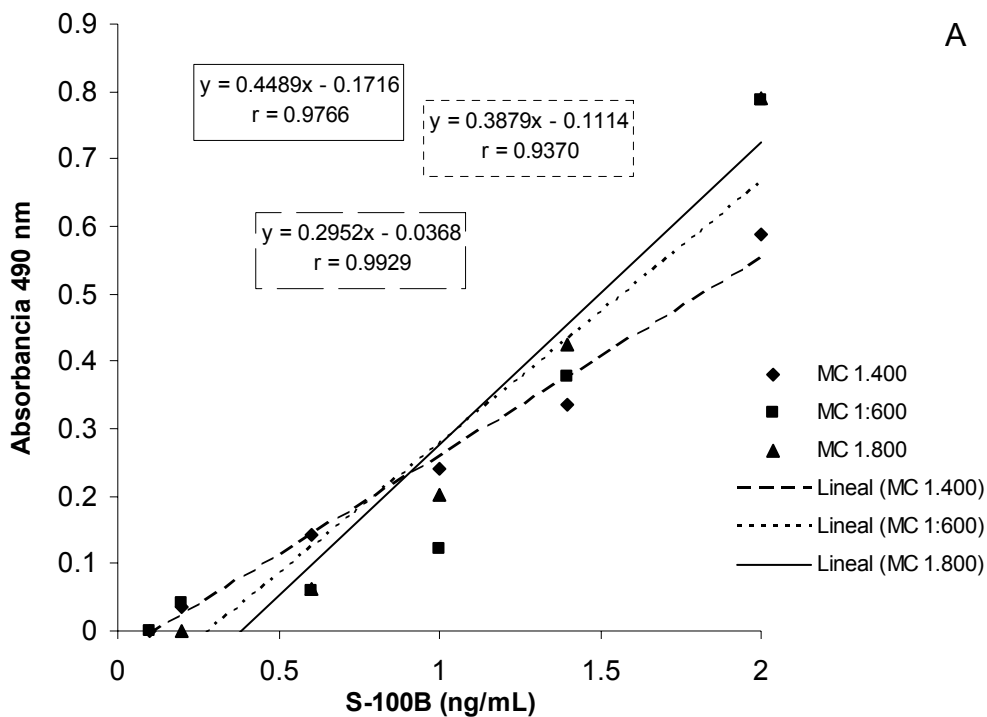


Figura 8: Ejemplo de ELISA's de captura de NSE utilizando el anticuerpo monoclonal M86416-M a una dilución 1:100 y el policlonal AB834 a una dilución 1:400. La NSE fue agregada en diferentes diluciones de suero artificial y PBS-T20. Para el ensayo A se utilizó PBS-T20 0.3% y para el B, PBS-T20 0.05%.

Se observó que al agregar PBS-T20 0.3% en el suero diluido 1:3 o concentrado, aumenta la sensibilidad, aunque a diluciones mayores (1:9) tiene un efecto inhibitorio; también vemos que al agregar PBS-T20 0.05% al suero diluido 1:9 la sensibilidad es mayor, por lo que se decidió continuar con los demás ensayos utilizando PBS-T20 0.05%, esto mismo se observó para la proteína S-100B.

Al utilizar sustrato colorido para el revelado había una buena sensibilidad de la reacción en los ensayos, pero como se quería hacer un ensayo muy sensible se decidió probar con otro sustrato para ver si aumentaba, por lo que se comparó con uno fluorogénico (Pierce, QuantaBlu™ Fluorogenic Peroxidase Substrate Kit, No. catalogo: 15169) ver anexo (excitación 320 nm y emisión 405 nm). Simultáneamente, y con base en todos los resultados obtenidos anteriormente, se determinó la mejor dilución de los anticuerpos a utilizar por medio de la regresión lineal obtenida para cada curva (figura 9).



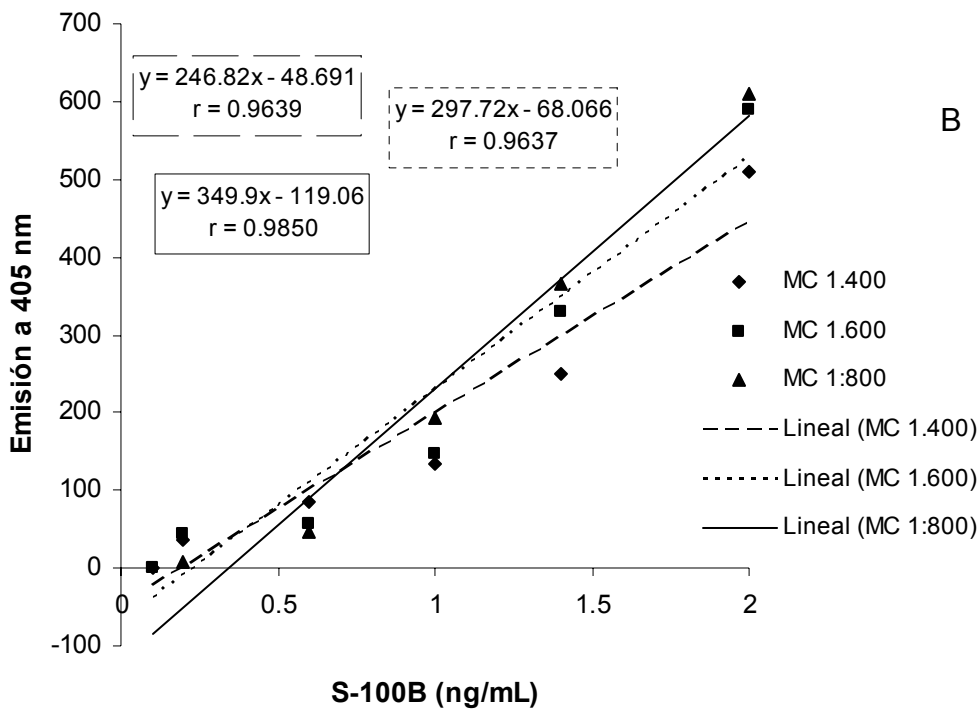


Figura 9. Ejemplo de ELISA de captura para detección de S-100B forrado con solución de boratos utilizando el anticuerpo monoclonal a las diluciones 1:400, 1:600 y 1:800, y el policlonal a 1:400, probando para A y B suero artificial concentrado + PBS-T20 0.3%; el revelado en A fue con sustrato colorido y para B con sustrato fluorogénico.

A manera de ejemplo se muestra que para la proteína S-100B, el sustrato colorido utilizando el anticuerpo monoclonal a una dilución 1:400 tiene una correlación muy alta. Para el sustrato fluorogénico la correlación fue similar, por lo que no hay diferencia entre usar la dilución 1:400 y 1:600. Para la NSE, usando sustrato colorido la dilución del monoclonal fue de 1:800. Como el sustrato colorido tiene una correlación y sensibilidad muy parecida al fluorogénico, pues no se observó en este un aumento de la sensibilidad, se decidió utilizar sustrato colorido para el revelado de los ensayos con las muestras.

Los niveles normales de la proteína S-100B en neonatos de 1.1 días en adelante son de 1.9 ng/mL,^{38, 65 66} al utilizar las muestras concentradas se logró encontrar una sensibilidad analítica mínima de 0.125 ng/mL, con las condiciones que se muestran en el cuadro 4. En relación a la NSE, los niveles

mínimos normales reportados en la literatura para NSE son de 6.0 a 8.0 ng/mL (no hay datos para personas menores de 4 meses) y se logró encontrar cambios en el rango de 2.0 a 20 ng/mL al estandarizar dicha técnica. Entonces, se encontraron las condiciones óptimas para cuantificar ambas proteínas en sueros humanos (cuadro 4).

Cuadro 4. Diluciones adecuadas de anticuerpos en la estandarización del ELISA de captura

S-100B		NSE	
Anticuerpo	Dilución	Anticuerpo	Dilución
Monoclonal	1:600	Monoclonal	1:800
Policlonal	1:400	Policlonal	1:200
Conjugado	1:16000	Conjugado	1:16000
Suero	concentrado	Suero	1:3

Muestras probadas para determinar S-100B

Una vez estandarizado el ELISA de captura se probaron las muestras del banco de sueros de infantes clasificados de acuerdo a la presencia de infección por *T. gondii* y de síntomas compatibles con esta enfermedad, unos que involucran al sistema nervioso central y otros no (cuadro 5).

Cuadro 5. Descripción del tipo y número de muestras probadas para determinar S-100B por medio de ELISA de captura

Tipo de muestras		Manifestaciones clínicas	
Infectados	Agudos	Sintomático (n=3)	1 Afectación ocular (coriorretinitis) 1 Bajo peso 1 Daño hepático y visceral
		Asintomático (n=3)	Ninguno
	Crónicos	Sintomático (n=2)	1 Prematuro 1 Retraso desarrollo intrauterino, prematuro de 29 semanas
		Asintomático (n=4)	Ninguno
No Infectados	Negativos	Sintomático (n=2)	1 Problema de desarrollo del sistema nervioso central generalizado 1 Prematuro
		Asintomático (n=7)	Ninguno
	Inmunes	Sintomático (n=2)	1 Hidrocefalia 1 Bajo peso
		Asintomático (n=10)	Ninguno

Debido a que la mayoría de las muestras provenían de cordón umbilical, no se pudo estudiar la relación entre la edad de los infantes y la concentración de proteína S-100B en la muestra de niños controles (no infectados y aparentemente sanos), lo que sí se pudo analizar fue la distribución de valores de concentración de esta proteína en el suero de cordón umbilical (cuadro 6,

figura 10), la cual no difirió significativamente de aquella encontrada cuando se agregaron los valores de los controles negativos sanos de otras edades (cuadro 7, figura 11).

Cuadro 6. Valores obtenidos experimentalmente al probar los diferentes tipos de muestras para determinar S-100B en el suero de cordón umbilical de infantes de 0 días de edad

Tipo de muestras			Valores obtenidos (ng/mL)	Valores normales en suero de cordón umbilical (ng/mL)		
Infectados	Agudos	Sintomático (n=1)	0.0	No existen reportados en literatura		
		Asintomático (n=1)	0.9			
	Crónicos	Sintomático (n=2)	0.0 0.0			
		Asintomático (n=4)	0.0 0.0 0.3 0.5			
			Negativos		Sintomático (n=1)	0.0
					Asintomático (n=5)	0.0 0.2 0.0 0.2 0.3
No infectados	Sintomático (n=1)	0.0				
		Inmunes				0.5 1.5 0.1 0.3 0.0 0.0

En los grupos no infectados negativos e inmunes sintomáticos se obtuvieron valores de concentración iguales al grupo de infectados crónicos sintomáticos por lo que solo se graficó éste último grupo.

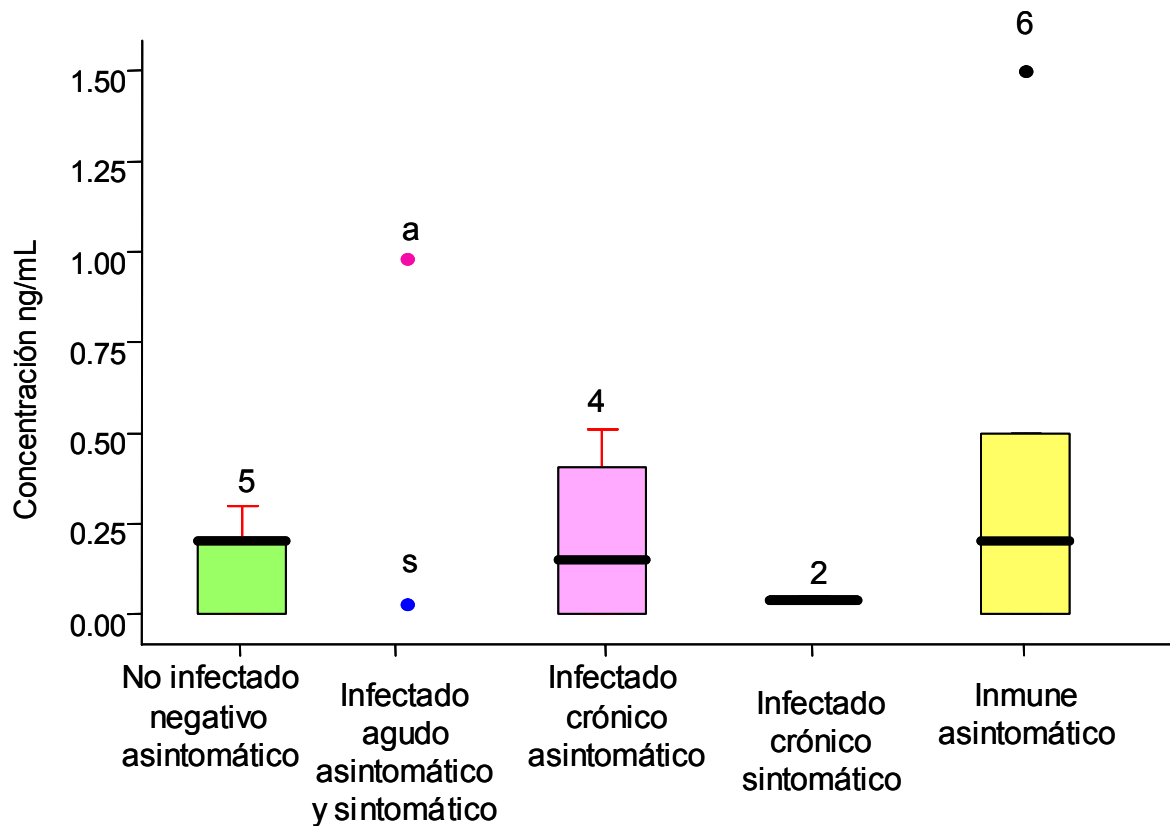


Figura 10. Concentraciones de S-100B en suero de cordón umbilical de los diversos grupos de estudio. Las barras por abajo y arriba de las cajas representan el percentil 10 y 90 respectivamente, el valor de la mediana es la línea horizontal en la barra. Las cajas representan el percentil 25 y 75, los puntos indican valores individuales. Los números arriba de cada caja representan el total de casos probados para cada grupo; la (a) y la (s) representan a un caso respectivamente de infectados agudos asintomático y sintomático.

El valor de la mediana de los grupos inmune asintomático, del grupo control (negativo no infectado) y de los infectados crónicos asintomáticos es similar; en los grupos de infectados agudos asintomáticos y sintomáticos se observan valores por arriba y por abajo con respecto a los valores normales en población de 4 meses a 80 años de edad (0.5 ng/mL), respectivamente.

Posteriormente se midió el nivel de esta proteína en los infantes de todas las edades (cuadro 7, figura 11), y se observó una concentración significativamente más alta de la proteína S-100B en las muestras del grupo infectado agudo asintomático en comparación con el grupo control (negativo no infectado), e incluso cuando se comparó con los crónicos asintomáticos, como

también entre los inmunes sintomáticos y asintomáticos. En estos últimos se observó un caso con valores por arriba del normal.

Cuadro 7. Valores obtenidos experimentalmente al probar los diferentes tipos de casos para determinar S-100B en todos los sueros de infantes de todas las edades

Tipo de muestras			Valores obtenidos (ng/mL)	Valores normales en suero (ng/mL)	
Infectados	Agudos	Sintomático (n=3)	0.0 0.2 0.0	< 0.5	
		Asintomático (n=3)	0.9 0.3 1.8		
	Crónicos	Sintomático (n=2)	0.0 0.0		
		Asintomático (n=4)	0.0 0.0 0.3 0.5		
	No infectados	Negativos	Sintomático (n=2)		0.0 0.0
			Asintomático (n=7)		0.0 0.2 0.0 0.2 0.3 0.0 0.0
Inmunes		Sintomático (n=2)	0.0 0.2		
		Asintomático (n=10)	0.5 1.5 0.1 0.3 0.0 0.0 0.5 0.3 0.4 0.5		

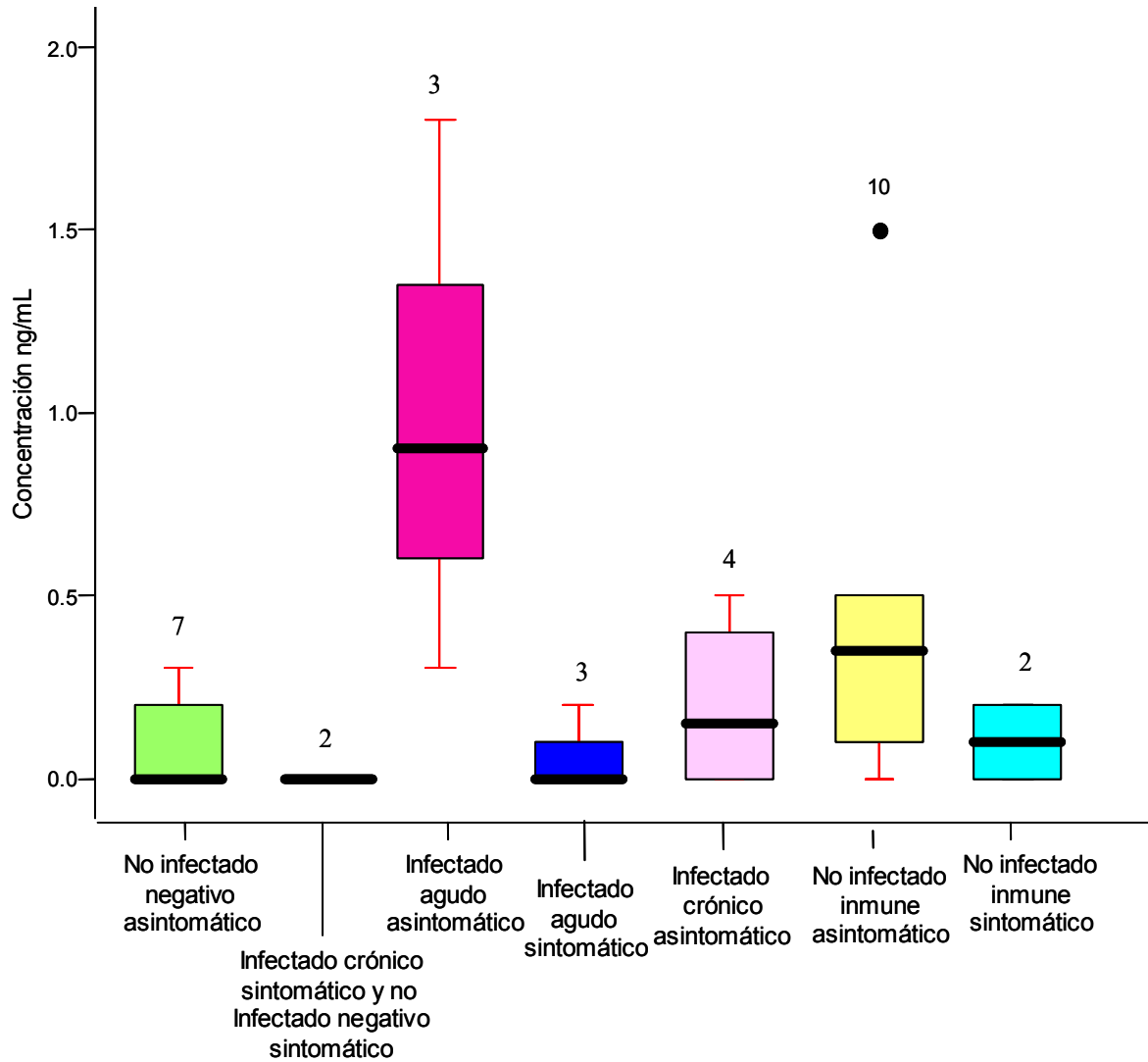


Figura 11. Concentraciones de S-100B en todos los sueros de infantes de todas las edades con respecto al tipo de caso. Las barras rojas por abajo y arriba de las cajas representan el percentil 10 y 90 respectivamente, el valor de la mediana es la línea horizontal en la barra. Las cajas representan el percentil 25 y 75, el punto negro indica un valor extremo de un suero que rebasó los valores. El número arriba de las cajas indica el número de muestras probadas por cada caso.

Determinación de NSE en sueros de los neonatos

Cuadro 8. Descripción del tipo y número de muestras probadas para determinar NSE por medio de ELISA de captura.

Tipo de muestras			Manifestaciones clínicas
Infectados	Agudos	Sintomático (n=5)	1 Afectación ocular (coriorretinitis) 1 Bajo peso 1 Daño hepático y visceral 1 Prematuro de 24 semanas
		Asintomático (n=4)	Ninguno
	Crónicos	Sintomático (n=3)	1 Macrocefalia 1 Prematuro 35 semanas 1 Retraso desarrollo intrauterino, prematuro de 29 semanas
		Asintomático (n=4)	Ninguno
No Infectados	Negativos	Sintomático (n=1)	1 Prematuro 28 semanas
		Asintomático (n=10)	Ninguno
	Inmunes	Sintomático (n=2)	1 Pulmonar 1 Bajo peso
		Asintomático (n=13)	Ninguno

Se probaron las muestras de cordón umbilical de recién nacidos de los diferentes grupos y se encontró nuevamente que la concentración de la proteína está significativamente más alta en los infectados agudos asintomáticos (cuadro 9, figura 12).

Cuadro 9. Valores obtenidos experimentalmente al probar los diferentes tipos de muestras para determinar NSE en el suero de cordón umbilical de infantes de 0 días de edad

Tipo de muestras			Valores obtenidos (ng/mL)	Valores normales en suero de cordón umbilical (ng/mL)		
Infectados	Agudos	Sintomático (n=2)	0.0 0.0	No existen reportados en literatura		
		Asintomático (n=3)	10.6 9.7 11.6			
	Crónicos	Sintomático (n=3)	0.0 0.0 0.0			
		Asintomático (n=4)	3.2 0.0 0.0 0.0			
			No infectados		Sintomático (n=1)	0.4
					Negativos	Asintomático (n=9)
Inmunes	Sintomático (n=1)	15.6				
	Asintomático (n=9)	0.8 22.6 0.0 11.9 0.0 0.0 10.9 3.2 0.0				

En los grupos no infectados negativos e inmunes sintomáticos solo se tuvo una muestra a probar en cada uno, por lo que se omitieron estos valores en la gráfica.

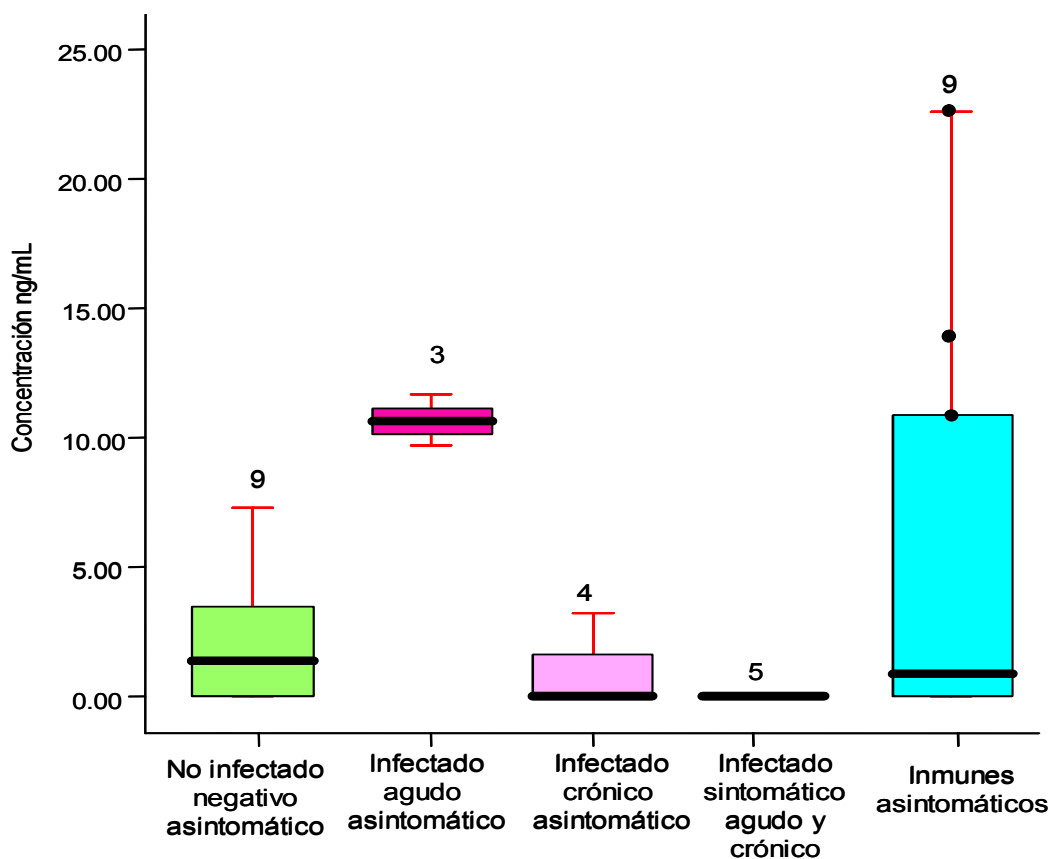


Figura 12. Concentraciones de NSE en los sueros de cordón umbilical de los recién nacidos de los diferentes grupos. Las barras rojas por abajo y arriba de las cajas representan el percentil 10 y 90 respectivamente, el valor de la mediana es la línea horizontal en la barra. Las cajas representan el percentil 25 y 75, los puntos negros son valores que estuvieron por arriba de los valores normales. El número arriba de las cajas indica el número de muestras probadas por cada grupo.

El grupo agudo asintomático tuvo valores significativamente más altos con respecto al grupo no infectado negativo (control), y el grupo crónico asintomático. Los bebés denominados inmunes asintomáticos también presentaron valores superiores a los controles (cuadro 9).

También se probaron las muestras para los sueros de bebés de todas las edades (figura 13), y los resultados se muestran en el cuadro 10. Nuevamente se observó que el grupo de agudos asintomáticos presentó niveles más altos de la proteína que el de los no infectados negativos (control); la mediana para los grupos agudo sintomático, crónico asintomático, crónico sintomático e inmunes fue similar.

Cuadro 10. Valores obtenidos experimentalmente al probar los diferentes tipos de casos para determinar NSE en todos los sueros de infantes de todas las edades

Tipo de muestras			Valores obtenidos (ng/mL)	Valores normales en suero (ng/mL)
Infectados	Agudos	Sintomático (n=5)	0.0	< 10
			0.0	
			7.0	
			0.2	
	6.9			
	Asintomático (n=4)	10.6		
		9.7		
		11.6		
20.8				
Crónicos	Sintomático (n=3)	0.0		
		0.0		
		0.0		
	Asintomático (n=4)	3.2		
0.0				
0.0				
0.0				
No infectados	Negativos	Sintomático (n=1)	0.4	
			3.5	
		Asintomático (n=10)	0.0	
			0.0	
			3.8	
			7.3	
			1.4	
			0.0	
			0.8	
			1.5	
	0.6			
	Inmunes	Sintomático (n=2)	15.6	
			3.3	
Asintomático (n=13)		0.8		
	22.6			
	0.0			
	11.9			
	0.0			
	0.0			
	10.9			
	3.2			
	0.0			
	0.0			
0.0				
1.6				

En el grupo no infectado negativo sintomático solo se tuvo un caso por lo que no se muestra en la gráfica.

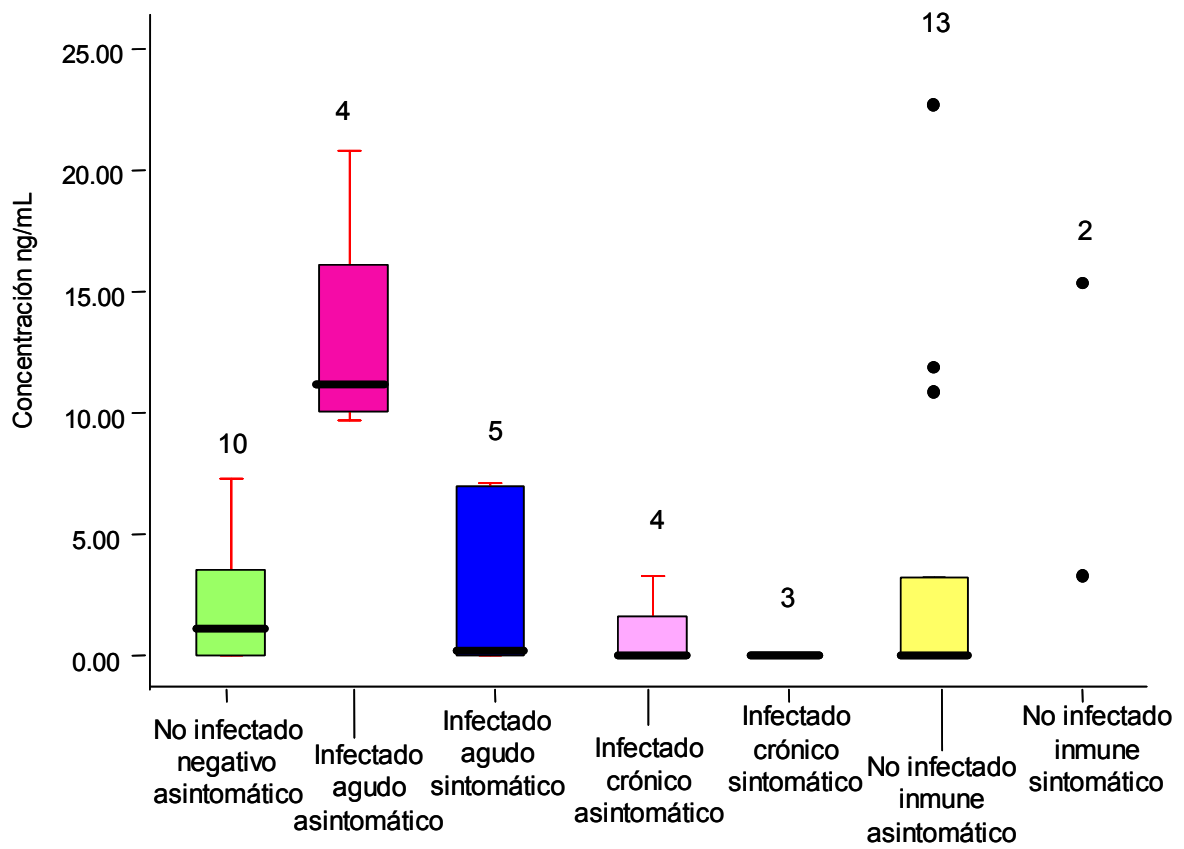


Figura 13. Concentración de NSE en los sueros de infantes de los distintos grupos. Las barras rojas por abajo y arriba de las cajas representan el percentil 10 y 90 respectivamente; el valor de la mediana es la línea horizontal en la barra; las cajas representan el percentil 25 y 75. El número arriba de las cajas indica el número de muestras probadas por cada grupo. Los puntos negros indican muestras que están por arriba del valor normal.

Correlación entre proteínas

Con el fin de determinar la correlación existente entre los niveles de ambas proteínas se hizo un análisis de regresión lineal (figura 14), y se observó una correlación, $r = 0.946$, con una $P < 0.001$.

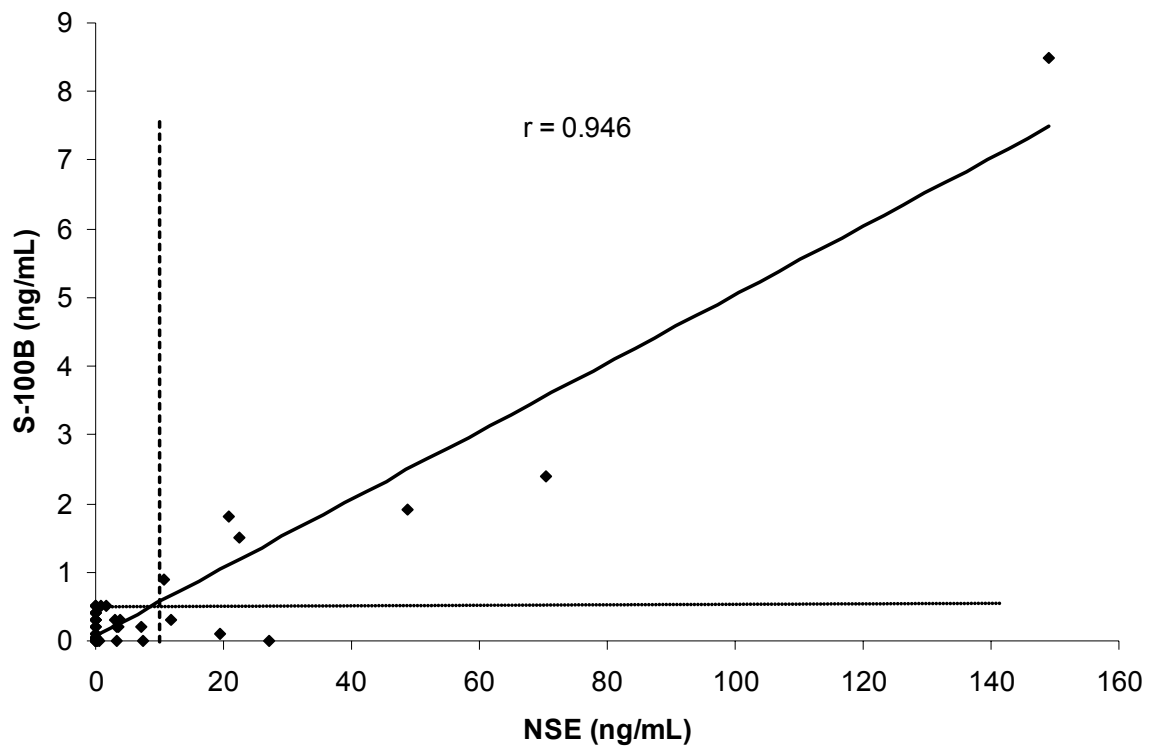


Figura 14. Correlación entre los niveles de la NSE y la proteína S-100B. Las líneas punteadas en rojo indican el punto de corte de cada proteína, los puntos azules son las muestras probadas para ambas proteínas. El valor de r corresponde al coeficiente de correlación de Spearman.

Caso clínico

Hubo un caso en particular en el cual se tuvieron muestras seriadas, por lo que se hizo una gráfica de la modificación temporal de la proteína S-100B y la NSE. Como se observa en la figura 15, hubo una cinética inversa de ambas proteínas; sin embargo, ambas se mantuvieron por abajo del nivel normal máximo.

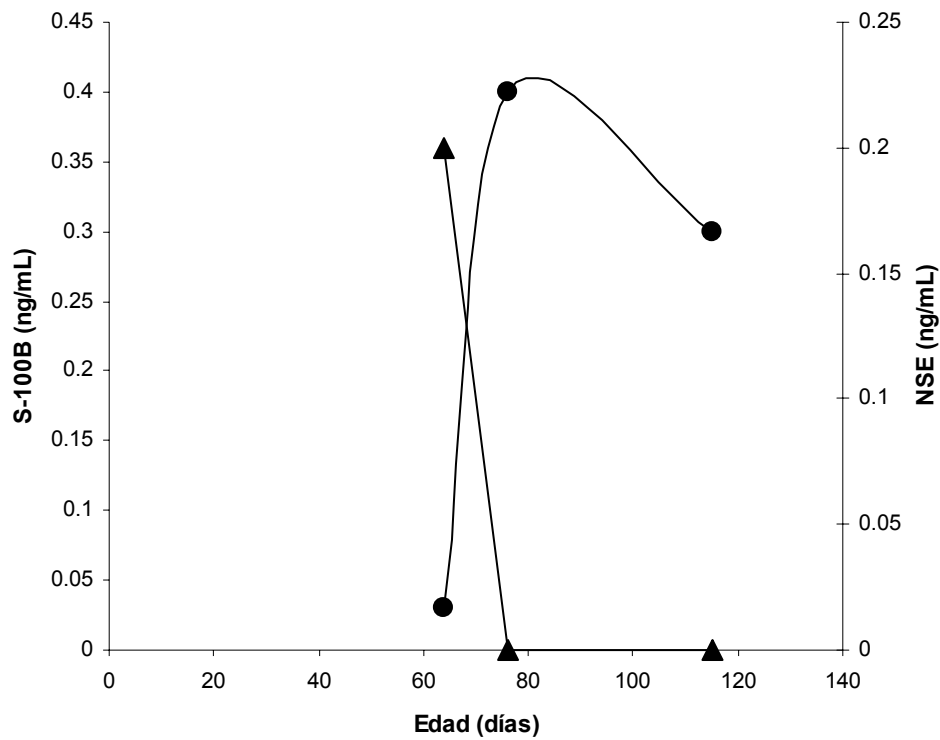


Figura 15. Niveles de NSE y S100B en un caso donde hubo toma de muestras en diferentes días. La línea rosa corresponde al eje de la derecha (NSE), la línea azul al de la izquierda (S-100B).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La infección congénita por *T. gondii* puede desarrollar problemas visuales y neurológicos de diversos grados; en muchas ocasiones el recién nacido es aparentemente sano, pero puede desarrollar secuelas graves algún tiempo después. A pesar de la identificación temprana, muchos recién nacidos tratados desarrollan problemas clínicos posteriormente. Una posible explicación se relaciona con la posibilidad de que el diagnóstico se haga cuando el caso ya tiene daño a nivel celular o tisular, pero que no se haya manifestado clínicamente o incluso en estudios de gabinete. La NSE y la S-100B son proteínas que se han usado como marcadores de daño neurológico, para predecir desarrollo de secuelas en problemas no infecciosos. Por ello, se estandarizó un inmunoensayo para cuantificarlas en el suero de infantes con toxoplasmosis congénita.

En este estudio se utilizó el ELISA de captura por ser altamente sensible y específico, pues se basa en el uso de anticuerpos monoclonales reactivos únicamente con el isotipo de cada enzima presente en el sistema nervioso, y por lo mismo ha sido utilizado en algunos de los estudios que se citan, que reportan valores de detección mínima de 0.02 a 0.2 ng/mL para la S100B y de 0.1 a 0.5 ng/mL. En los ensayos estandarizados para esta tesis se obtuvo una sensibilidad de 0.125 ng/mL para S-100B y de 2.0 ng/mL para NSE, que están por debajo de los niveles normales reportados en la literatura (0.5 y 10.0 ng/mL para S100B y NSE, respectivamente). Por ello, consideramos que el ensayo fue adecuado. Cabe resaltar que este tipo de técnica fue igual o más sensible que el radioinmunoensayo, por lo que resulta altamente conveniente, debido a que además se evita el uso de material radiactivo. Una ventaja adicional del ELISA estandarizado en esta tesis es que fue de bajo costo (\$71= y \$18= pesos por muestra para S100B y NSE, respectivamente) comparado con aquellos estuches comerciales que, además de caros (>\$300= pesos/muestra), no son fácilmente accesibles, por ser de importación.

Como no existían antecedentes en la literatura de los niveles de estas proteínas en neonatos infectados *in utero* por *Toxoplasma gondii*, o algún otro agente, y tampoco de la relación de altos niveles de alguna de ellas con problemas del sistema nervioso central ocasionados por el parásito, se hizo

una revisión en la literatura acerca de las proteínas usadas como biomarcadores de daño neurológico en otros padecimientos (anexo); y se observó que los valores normales informados para suero de individuos sanos de 4 meses a 80 años de edad para la NSE son de 3.5 ng/mL a 10 ng/mL (Tanabe T *et al*⁶⁴ y Raabe A *et al*⁶⁶), y en población de 1 día a 85 años de edad de 0.5 ng/mL para la S-100B, respectivamente (Erb MA *et al*³⁸ y Raabe *et al*⁶⁶). Por otra parte, los niveles en los controles normales de ambas proteínas reportadas por Nagdyman *et al*⁶⁷ señalan que son muy altos a las 2h de nacimiento (30.3 ng/mL y 1.6 ng/mL, respectivamente); aunque disminuyen a las 24h a valores de 24.3 ng/mL y 1.0 ng/mL pero que no llegan a los niveles informados para infantes de 1 día. Estos datos apoyaron el uso de los ensayos estandarizados, pues la sensibilidad fue suficiente para cuantificar las proteínas en las muestras analizadas.

Un aspecto novedoso de los resultados obtenidos en la presente tesis, fue la determinación de los niveles de estas proteínas en el cordón umbilical; era muy importante determinar cuales eran los niveles normales encontrados para así compararlos con nuestro casos; pero resultó interesante encontrar que ambas tienen niveles inferiores a los encontrados por Nagdyman *et al*, en niños controles a las 2h e incluso a las 24 horas de nacimiento⁶⁷, y similares a los encontrados para personas mayores a 4 meses de edad y a recién nacidos de 1 día en el caso de la S-100B (ver figuras 11 y 13).³⁸ Una explicación de este fenómeno puede ser que los niveles de NSE y S-100B se eleven durante las primeras 2 horas por efecto del propio proceso del nacimiento; de hecho, en los estudios de cambios debidos a cirugía cardiaca extracorpórea, los niveles de estas enzimas tienen un pico a las 2 horas, y posteriormente declinan a niveles normales.^{36,38,40,70,71} No existen datos de los valores normales en recién nacidos antes de las 2 horas de edad, ni en sangre de cordón umbilical, por lo que esta es una pregunta que queda abierta a investigación. Otra explicación es que los valores de ambas proteínas hayan sido intrapolados incorrectamente en el trabajo de Nagdyman *et al*, dando una concentración 10 veces mayor a lo normal. En este sentido cabe resaltar que los resultados de esta tesis concuerdan más con lo encontrado en el trabajo de Erb *et al*,³⁸ quienes, por lo menos en el caso de la S-100B, compararon los valores de esta proteína en muestras provenientes de neonatos saludables y aquellas que

provenían de niños sometidos a operación cardiaca en estudios para resaltar su utilidad como posible marcador de cierto grado de pérdida neurológica después de operaciones cardiacas en neonatos.

Los resultados directamente relacionados con la hipótesis de la tesis fueron inesperados: las muestras de casos infectados agudos asintomáticos presentaron valores elevados de ambas proteínas, en comparación con todos los grupos, pero, en particular cabe resaltar que incluso fueron más altos que los infectados agudos sintomáticos; esto puede deberse a que en los infectados agudos asintomáticos el parásito se encuentra en la fase de parasitemia y todavía no hay manifestaciones clínicas, lo que nos indica que las proteínas posiblemente están detectando lesiones neurológicas a nivel celular/tisular, mientras que en los agudos sintomáticos las lesiones neurológicas ya son manifiestas, y probablemente ya están en marcha mecanismos de reparación tisular y de la barrera hemato-encefálica.

Es importante hacer notar el hecho de que existe una muy buena correlación entre las dos proteínas, lo que quiere decir que al momento de existir algún daño neurológico ambas son liberadas al torrente sanguíneo y se les encuentra en altas concentraciones.

Aunque no se realizó cinética de los niveles de estas proteínas, este trabajo sienta los precedentes para realizar un estudio prospectivo con más muestras, e implementar el ELISA de captura como una prueba predictiva de daño neurológico en niños infectados por *Toxoplasma gondii*. En caso de confirmarse estos resultados, pueden apoyar la toma de decisiones terapéuticas adecuadas para aquellos niños que presenten un riesgo de desarrollar secuelas neurológicas relacionadas con la toxoplasmosis.

CONCLUSIONES

Los ELISAs estandarizados para la captura de S100B y NSE presentaron una sensibilidad adecuada para distinguir entre niveles normales y altos en suero de infantes.

Las proteínas NSE y S-100B son marcadores biológicos de daño neurológico y podrían servir para diferenciar niveles altos en muestras de infantes con toxoplasmosis congénita aguda asintomática y diferenciarla de la aguda sintomática y la crónica.

Los niveles anormales altos de S100B y NSE podrían ser marcadores predictivos de daño neurológico en infantes infectados por *Toxoplasma gondii*, pero deben hacerse más estudios para determinar su utilidad clínica, dado el tamaño pequeño de la muestra de pacientes.

Los resultados obtenidos sugieren que los niveles normales de ambas enzimas son semejantes en suero de sangre de cordón que aquellos reportados para mayores 4 meses, aunque esto debe ser corroborado con más casos.

ANEXO

Cuadro I. Niveles de NSE en individuos sanos o negativos a daño neurológico, tomados de diferentes estudios en la literatura

Tipo de muestra (edad)	Procedencia de la muestra (controles)	Niveles de NSE (ng/mL)	Rango (ng/ml)	Procedencia de la muestra (casos)	Niveles de NSE (ng/mL)	Rango (ng/ml)	Ref
LCR (Adultos)	Pacientes con enfermedades no neurológicas	Media 4.5 +/- 1.2	1.3 – 7.2	Pacientes con enfermedades neurológicas: Encefalitis Meningitis Infarto cerebral Demencia multi-infarto Enfermedad de Parkinson Disquinesia oral Esclerosis lateral amiotrófica Degeneración espinocerebelar Espondilosis cervical Esclerosis múltiple en fase aguda Esclerosis múltiple en fase estacionaria Poli(radiculo) neuritis aguda Poli(radiculo) neuritis crónica Tumor cerebral	Media+/-DS 11.3 +/- 12.9 4.2 +/- 1.6 9.9 +/- 6.2 4.1 +/- 1.7 7.0 +/- 3.6 6.3 6.0 +/- 2.1 7.2 +/- 2.5 8.7 +/- 3.4 4.2 6.2 +/- 2.3 2.5 +/- 0.9 16.8	3.4 - 40.0 1.7 - 8.0 3.3 - 25.0 1.6 - 6.8 0.8 - 16.0 4.3 - 8.2 2.5 - 10.0 3.2 - 10.8 4.1 - 14.4 3.3 3.8 - 4.5 4.0 - 10.0 1.2 - 4.2 6.6 - 27.0	35
Suero (media 40 años)	Donadores de sangre sin historial de daño traumático cerebral en semanas anteriores a la toma de muestra	Media+/-DS 9.6+/-2.47	Percentil (10-90) 6.3-13.3	Pacientes que cumplieran los criterios de daño traumático cerebral leve (MTBI): 1) Un brusco soplo al corazón resultando en amnesia postraumática (PTA) de menos de 1h. 2) Pérdida inicial de conciencia (LOC) de	Media+/-DS 10.2+/-3.09	Percentil (10-90) 6.9-14.3	37

				menos de 15 min. 3) La puntuación de coma Glasgow (GCS) debe ser >13 al presentarse en el depto. de urgencias 4) Ausencia de signos neurológicos focales													
Suero (18-75 años)	Comparación entre pacientes con daño neurológico y sin él, después de un paro cardíaco Estudio prospectivo	Valores normales 12.5		Pacientes resucitados de paro cardíaco después de restauración espontánea de circulación (ROSC)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo</th> <th>Niveles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>12 h</td> <td>14.5</td> </tr> <tr> <td>24 h</td> <td>17.9</td> </tr> <tr> <td>48 h</td> <td>15.9</td> </tr> <tr> <td>72 h</td> <td>14.6</td> </tr> </tbody> </table>	Tiempo	Niveles	12 h	14.5	24 h	17.9	48 h	15.9	72 h	14.6		54
Tiempo	Niveles																
12 h	14.5																
24 h	17.9																
48 h	15.9																
72 h	14.6																
Suero (adultos >40 años)	No indica cual es la procedencia	8.11 +/- 3.17	< 14.45	Pacientes con rango de desordenes neurológicos: Esclerosis múltiple (MS) Encefalitis Neuropatías periféricas Hipertensión intracraneal benigna Trombosis arterial de la espina anterior Enfermedades multi-infarto Enfermedad motora neuronal Hemorragia subaracnoidea	5.1 5.5 10.0 12.5 5.0		58										
Suero (mediana 39.5 años)	Pacientes que no tenían ningún déficit neuronal o enfermedad neuroendocrina	Mediana 8.45	5.5-14.0	Pacientes con daños cerebrales menores Pacientes con daños cerebrales severos	Mediana 6.95 Mediana 12.8	2.6-13.2 3.2-100	62										

LCR (mediana 33 años)	Pacientes que estaban bajo estudios de mielografía porque tenía dolores en la espalda	Mediana 0.90.4-2.8	0.4-2.8	Pacientes con daños cerebrales severos	Mediana 7.8	1.6-220	
LCR (niños mayores de 4 meses)	Pacientes con enfermedades neurológicas no identificadas, niños saludables que presentaban la indicación de punción lumbar pero que no tuvieron evidencia de enfermedad sistémica o neurológica crónica. Estudio retrospectivo	Media+/-DS 6.9 +/- 2.3	3 - 12.0	Pacientes diagnosticados con ataques Pacientes con tumor cerebral	Media+/-DS 9.5+/-18.9 Media+/-DS 31.3+/-11.8	1-136 15-41	63
Suero (niños de 4 meses - 7 años)	Comparación entre pacientes con ataques febriles generalizados y parciales	Media 5.93+/-1.71	3.5 – 9.6	Pacientes con ataques febriles: Generalizados Parciales	Media+/-DS 6.12+/-1.80 5.51+/-1.48	3.50-9.60 3.60-9.50	64
LCR (niños de 4 meses - 7 años)		Media 4.69+/-1.71	2.0 - 10	Pacientes con ataques febriles: Generalizados Parciales	Media+/-DS 4.38+/-1.55 5.33+/-1.93	2.00-7.40 3.10-10.0	

LCR (mediana 40 semanas)	Infantes a término que tenían indicación médica de meningitis, pero que al realizar cultivo bacteriano y cuenta celular resultó negativo a infección	5.8	3.0 – 8.2	<p>Infantes asfixiados que cumplieran con los criterios:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Edad gestacional >35 semanas 2) Edad postnatal < 96 h 3) Angustia intraparto indicada por el cardiotocógrafo, rápido paso de meconio grueso, o pH del cuero cabelludo abajo de 7.2 inmediatamente antes de nacer 4) Necesitar resucitación neonatal con presión de ventilación positiva >3min, puntuación Apgar a los 5 min. <6, o primera arteria umbilical postnatal pH<7.1 y/o BE<-10 	Mediana 10.9	4.6 - 460	65																																								
Suero (16-85 años, mediana 38 años)	Comparación entre pacientes con daño cerebral severo. Estudio prospectivo	>10 patológico		Pacientes con heridas cerebrales severas	26.7	Intercuartil 12 - 56.7	66																																								
Suero (recién nacidos de 40 semanas de gestación)	Infantes a término que cumplían con los siguientes criterios: ninguna enfermedad materna; sangre arterial del cordón con pH ≥ 7.2 ; después de 5 min. puntuación Apgar	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2 h</td> <td>30.3</td> </tr> <tr> <td>6 h</td> <td>37.1</td> </tr> <tr> <td>12 h</td> <td>28.7</td> </tr> <tr> <td>24 h</td> <td>24.3</td> </tr> </tbody> </table>	Mediana		2 h	30.3	6 h	37.1	12 h	28.7	24 h	24.3	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Cuartiles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>24.8 – 47.6</td> </tr> <tr> <td></td> <td>19.0 – 48.8</td> </tr> <tr> <td></td> <td>19.8 – 39.4</td> </tr> <tr> <td></td> <td>17.2 – 39.5</td> </tr> </tbody> </table>	Cuartiles			24.8 – 47.6		19.0 – 48.8		19.8 – 39.4		17.2 – 39.5	<p>Grupo de asfixia: Infantes recién nacidos a término (edad gestacional 37-42 semanas) que cumplieron los siguientes criterios fueron incluidos en el estudio:</p> <p>pH de sangre arterial de cordón <7.0, o pH de sangre arterial de cordón entre 7.01</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2 h</td> <td>32.5</td> </tr> <tr> <td>6 h</td> <td>36.7</td> </tr> <tr> <td>12 h</td> <td>38.5</td> </tr> <tr> <td>24 h</td> <td>36.3</td> </tr> </tbody> </table>	Mediana		2 h	32.5	6 h	36.7	12 h	38.5	24 h	36.3	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Cuartiles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>19.9 - 53.8</td> </tr> <tr> <td></td> <td>30.1 - 54.9</td> </tr> <tr> <td></td> <td>24.3 - 48.8</td> </tr> <tr> <td></td> <td>17.6 - 51.8</td> </tr> </tbody> </table>	Cuartiles			19.9 - 53.8		30.1 - 54.9		24.3 - 48.8		17.6 - 51.8	67
Mediana																																															
2 h	30.3																																														
6 h	37.1																																														
12 h	28.7																																														
24 h	24.3																																														
Cuartiles																																															
	24.8 – 47.6																																														
	19.0 – 48.8																																														
	19.8 – 39.4																																														
	17.2 – 39.5																																														
Mediana																																															
2 h	32.5																																														
6 h	36.7																																														
12 h	38.5																																														
24 h	36.3																																														
Cuartiles																																															
	19.9 - 53.8																																														
	30.1 - 54.9																																														
	24.3 - 48.8																																														
	17.6 - 51.8																																														

	>7; y transcurso de los primeros 3 días sin incidentes			y 7.1 y también una puntuación Apgar después de 5 min de <7. El grupo de asfixia fue subdividido en 2 grupos: 1) resultado normal 2) retardación o muerte	Grupo 2		Grupo 2		
					Mediana		Cuartiles		
					2 h	55.1	32.5 - 89.0		
					6 h	48.7	33.7 - 95.8		
					12 h	47.8	30.1 - 64.9		
					24 h	39.1	34.0 - 55.4		
Suero (niños entre 7 meses y 5 años)	Niños con rango de edad similar al de los pacientes, que estaban ingresados en el mismo momento y que no padecían enfermedad neurológica, hemato-oncológica o hubiesen sido sometidos a cirugía	Mediana 7.7	4.1-12.7	Pacientes con encefalopatías agudas no traumáticas con alteración grave del nivel de conciencia: Encefalitis viral Casi ahogamiento Shock Paro cardíaco	Con secuelas neurológicas Mediana 68.9		35.0-95.6		68
					Sin secuelas neurológicas Mediana 15.8		9.7-18.7		

Cuadro II. Niveles de S-100B en individuos sanos o negativos a daño neurológico, tomados de diferentes estudios en la literatura

Tipo de muestra	Procedencia de la muestra (controles)	Niveles de S-100 (ng/ml)	Rango (ng/ml)	Procedencia de la muestra (casos)	Niveles de S-100 (ng/mL)	Rango (ng/ml)	Ref.
LCR (Adultos)	Pacientes con enfermedades no neurológicas	Media 0.33+/-0.09	0.16 – 0.52	Pacientes con enfermedades neurológicas: Encefalitis Meningitis Hemorragia subaracnoidea Infarto cerebral Demencia multi-infarto Enfermedad de Parkinson Disquinesia oral Esclerosis lateral amiotrófica Eegeneración espinocerebelar Espondilosis cervical Esclerosis múltiple en fase aguda Esclerosis múltiple en fase estacionaria Poli(radiculo)neuritis aguda poli(radiculo)neuritis crónica Tumor cerebral	Media+/-DS 1.9 +/- 1.8 0.60 +/- 0.48 5.7 +/- 10.0 1.4 +/- 1.4 0.37 +/- 0.20 0.58 +/- 0.23 0.61 0.38 +/- 0.14 0.37 +/- 0.13 0.51 +/- 0.20 0.44 0.83 +/- 0.62 1.5 +/- 2.3 26.3	 0.34 - 5.1 0.06 - 2.4 0.60 - 29.0 0.12 - 4.1 0.07 - 0.68 0.21 - 0.96 0.40 - 0.82 0.23 - 0.60 0.17 - 0.54 0.24 - 0.84 1.10 0.36 - 0.52 0.20 - 1.80 0.34 - 6.6 0.60 - 52.0	35
Suero (media 40 años)	Donadores de sangre sin historial de daño traumático cerebral en semanas anteriores a la toma de muestra	Media+/-DS 0.05+/-0.07	Percentil (10-90) 0.00 - 0.13	Pacientes que cumplieran los criterios de daño traumático cerebral leve (MTBI): 1) Un brusco soplo al corazón resultando en amnesia postraumática (PTA) de menos de 1h. 2) Perdida inicial de conciencia (LOC) de	Media+/-DS 0.31+/-0.24	Percentil (10-90) 0.00-0.68	37

				menos de 15 min. 3) La puntuación de coma Glasgow (GCS) debe ser >13 al presentarse en el depto. de urgencias 4) Ausencia de signos neurológicos focales			
Suero (neonatos de 1.1 +/- 0.3 días)	Suero extraído al momento de nacer de recién nacidos saludables a término	1.97 Valor normal <0.5		Neonatos en curso peri operatorio sufriendo rápida corrección de malformaciones congénitas, dividiéndose en 4 grupos: 1) Neonatos cianóticos con transposición de las arterias grandes (TGA) 2) Neonatos acianóticos operados durante paro cardiaco profundo hipotérmico (DHCA) 3) Neonatos acianóticos operados con circulación extracorporeal pero sin DHCA (ECC) 4) Neonatos con reducción de la aorta (CoA)	~0.92 ~0.53 ~0.73 ~1.17		38
LCR (mediana 40 semanas)	Infantes a termino que tenían indicación medica de meningitis, pero que al realizar cultivo bacteriano y cuenta celular resultó negativo a infección	0.5	0.4 – 0.8	Infantes asfixiados que cumplieran con los criterios: 1) Edad gestacional >35 semanas 2) Edad postnatal < 96 h 3) Angustia intraparto indicada por el cardiotocografo, rápido paso de meconio grueso, o pH del cuero cabelludo abajo de 7.2	Mediana 2.0	0.25 - 66.3	65

				inmediatamente antes de nacer 4) Necesitar resucitación neonatal con presión de ventilación positiva >3min, puntuación Apgar <6 a los 5 min., o primera arteria umbilical postnatal pH<7.1 y/o BE<-10																																											
Suero (16-85 años, mediana 38 años)	Comparación con pacientes con daño cerebral severo Estudio prospectivo	0.2 y 0.5 normales, ≥ 0.5 patológicos		Pacientes con heridas cerebrales severas	Mediana 2.28	Intercuartil 0.44 - 6.8	66																																								
Suero (recién nacidos de 40 semanas de gestación)	Infantes a termino que cumplían con los siguientes criterios: ninguna enfermedad materna; sangre arterial del cordón con pH ≥7.2; después de 5 min, puntuación Apgar >7; y transcurso de los primeros 3 días sin incidentes	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2 h</td> <td>1.6</td> </tr> <tr> <td>6 h</td> <td>1.6</td> </tr> <tr> <td>12 h</td> <td>1.2</td> </tr> <tr> <td>24 h</td> <td>1.0</td> </tr> </tbody> </table>	Mediana		2 h	1.6	6 h	1.6	12 h	1.2	24 h	1.0	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Cuartiles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.4 – 2.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.2 - 2.3</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.1 - 1.5</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.0 - 1.4</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Cuartiles		1.4 – 2.5		1.2 - 2.3		1.1 - 1.5		1.0 - 1.4		<p>Grupo de asfixia: Infantes recién nacidos a termino (edad gestacional 37-42 semanas) que cumplieron los siguientes criterios fueron incluidos en el estudio:</p> <p>pH de sangre arterial de cordón <7.0, o pH de sangre arterial de cordón entre 7.01 y 7.1 y también una puntuación Apgar después de 5 min de <7. El grupo de asfixia fue subdividido en 2 grupos:</p> <p>1) resultado normal 2) retardación o muerte</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Mediana</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2 h</td> <td>3.3</td> </tr> <tr> <td>6 h</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>12 h</td> <td>1.8</td> </tr> <tr> <td>24 h</td> <td>1.5</td> </tr> </tbody> </table>	Mediana		2 h	3.3	6 h	2.5	12 h	1.8	24 h	1.5	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Cuartiles</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2.2 - 8.4</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.5- 4.6</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1.5 - 2.9</td> <td></td> </tr> <tr> <td>0.9 -2.6</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Cuartiles		2.2 - 8.4		1.5- 4.6		1.5 - 2.9		0.9 -2.6		67
Mediana																																															
2 h	1.6																																														
6 h	1.6																																														
12 h	1.2																																														
24 h	1.0																																														
Cuartiles																																															
1.4 – 2.5																																															
1.2 - 2.3																																															
1.1 - 1.5																																															
1.0 - 1.4																																															
Mediana																																															
2 h	3.3																																														
6 h	2.5																																														
12 h	1.8																																														
24 h	1.5																																														
Cuartiles																																															
2.2 - 8.4																																															
1.5- 4.6																																															
1.5 - 2.9																																															
0.9 -2.6																																															

APÉNDICE

1. *Solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.6*

- Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) mas 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada
- Ajustar el pH a 9.6
- Aforar a 1000 mL
- Mantener a 4°C

2. *Solución amortiguadora de Boratos, pH 8*

- Pesar 6.18 g de ácido bórico, 9.54 g de tetraborato de sodio y 4.38 g de cloruro de sodio
- Disolver en 800 mL de agua bidestilada
- Ajustar el pH a 8
- Aforar a 1000 mL

3. *Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.01 M, pH 7.2 [PBS])*

- Medir 800 mL de agua bidestilada
- Agregar 100 ml de ***PB 10X** (sol. 4) y 8.75 g de NaCl
- Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada
- Guardar a 4°C

4. ***PB 10X**

- Pesar 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sodio monobásico monohidratado) y 11.5 g de Na_2HPO_4 (fosfato de sodio dibásico anhidro).
- Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales)
- Aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

5. *Amortiguador de preparación de soluciones (PBS-Tween 20, 0.05%)*

- A un litro de PBS pH 7.2 (Sol. 2)
- Añadir 500 μ L de Tween 20
- Guardar a 4°C

6. *Amortiguador de lavado (PBS-Tween 20, 0.3%)*

- A un litro de PBS pH 7.2 (Sol. 3)
- Añadir 3000 μ L de Tween 20
- Guardar a 4°C

7. *Solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 1% en PBS-Tween 20)*

- Diluir 1 mL de BSA al 25% en 24 mL de PBS-Tween (Sol. 4)
- Mantener a -20°C

8. *Solución de cromógeno /sustrato (ELISA) para peroxidasa*

- Pesar 4 μ g de orto-fenilendiamina
- Añadir 5 ml de ácido cítrico 0.1 M y 5 ml de citrato de sodio 0.1 M
- Adicionar 4 μ L de H₂O₂ al 30%

NOTA: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.

9. *Solución de ácido sulfúrico 1 N*

- Tomar 850 mL de agua bidestilada
- Añadir cuidadosamente 49.04 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄)
- Aforar a 1000 mL

10. *Solución sustrato fluorogénico (Quanta Blu)*

- Mezclar 9 partes de solución sustrato con 1 parte de solución estable de peróxido

NOTA: La solución es estable por 24 horas a temperatura ambiente y no requiere protegerse de la luz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Montoya JG, Liesenfeld O. Toxoplasmosis. Lancet 2004;363:1965-76
2. <http://www.monografias.com/trabajos16/toxoplasmosis-congenita/toxoplasmosis-congenita.shtml>
3. Galván-Ramírez ML, Mondragón-Flores R. Toxoplasmosis humana. Ediciones Cuellar, México 2001, 196 pp.
4. Robert-Gangneux F. Contribution of new techniques for the diagnosis of congenital toxoplasmosis. Clin Lab. 2001;47:135-141
5. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of protein from acrilamide gels of nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Nat Acad Sci. 1979;76:4350-4354
6. Wallon M, Cozon G, Ecocherd R, Lewin P, Peyron F. Serological rebound in congenital toxoplasmosis: long-term follow-up of 133 children. Eur J Pediatr. 2001;160: 534-540
7. Biagi F. Prevention of neonatal toxoplasmosis. Nuevas perspectivas. Prensa Med Mex. 1971;36:112-114
8. Frenkel JK. Biology of *Toxoplasma gondii*. En Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Francia 2000, pp. 9-25
9. Dubey JP, Lindsay DS, Speer CA. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. Clin Microbiol Rev. 1998 April;11:267-299
10. Kenneth M, Boyer MD. Congenital toxoplasmosis: current status of diagnosis, treatment, and prevention. Semin Pediatr Infect Dis. 2000;11:165-171
11. Correa D, Cañedo I, Hernández JL, Coballase E. *Toxoplasma gondii*: un parásito oportunista En: Zoonosis Emergentes y Reemergentes. Bacterias, Parásitos, Virus, Hongos y Priones. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. 2001 (libro electrónico)
12. Sierra M, Bosch J, Juncosa T, Matas L, Muñoz C. y grupo de microbiólogos para el estudio de las infecciones de transmisión vertical en el área de Barcelona* (*) Andreu A, Barranco M, Dopico E, Guardiola C, Lite J, Sanfeliu I y Viñas LI. Diagnóstico serológico de las infecciones por *Toxoplasma gondii* http://www.seimc.org/control/revi_Sero/toxo.htm

13. Martín-Hernández I. Toxoplasmosis congénita: una mirada al problema. Rev Biomed. 2004;15:181-190.
14. Gilbert R. 2001. Epidemiology of infection in pregnant women. En: Ambroise-Thomas y Petersen E (eds) Congenital Toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer, Francia. pp. 237-249
15. Wong SY, Remington JS. Toxoplasmosis in pregnancy. CID 1994;18:853-862
16. Gratzl R, Sodeck G, Platzer P, Jäger W, Graf J, Pollak A, Thalhammer T. Treatment of toxoplasmosis in pregnancy: concentrations of spiramycin and neospiramycin in maternal serum and amniotic fluid. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2002;21:12-16
17. <http://www.infecto.edu.uy/revisiontemas/tema3/toxotema.htm>
18. Velasco-Castrejón O, Salvatierra-Izaba B, Valdespino JL, Sedano-Lara AM, Galindo-Virgen S, Magos C, Llausás A, Tapia-Conyer R, Gutiérrez G, Sepúlveda J. Seroepidemiología de la toxoplasmosis en México. Salud Pública Mex. 1992;34:222-229
19. Jenum PA, Stray-Pedersen B, Gundersen AG. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. J Clin Microbiol. 1997;35:1972-1977
20. Auer H, Vander-Mose A, Picher O, Walochnik J, Aspöck H. Clinical and diagnostic relevance of the *Toxoplasma* IgG avidity test in the serological surveillance of pregnant women in Australia. Parasitol Res. 2000;86:965-970
21. Alvarado-Esquivel C, Sethi S, Janitschke K, Hahn H, Liesenfeld O. Comparison of two commercially available avidity tests for toxoplasma-specific IgG antibodies. Arch Med Res. 2002;33:520-523
22. Hegab SM, Al-Mutawa SA. Immunopathogenesis of toxoplasmosis. Clin Exp Med 2003;3:84-105
23. Denkers EY, Gazzinelli RT. Regulation and function of T-cell-mediated immunity during *Toxoplasma gondii* infection. Clin Microbiol Rev. 1998;4:569-588
24. Subauste CS, Remington JS. Immunity to *Toxoplasma gondii*. Curr Opin Immunol. 1993;5:532-537

25. Galván-Ramírez ML, Covarrubias X, Rodríguez R, Troyo R, Alfaro N, Correa D. Prevalence of anti-Toxoplasma gondii antibodies in blood donors of Jalisco, Mexico. *Transfusion* 2005;45:281-282
26. Bustos Bahena ML. Seroprevalencia de infección por Toxoplasma gondii y factores de riesgo asociados en mujeres embarazadas de la ciudad de Jojutla, Morelos. Tesis de Maestría Universidad de Morelos. 2004
27. Vela-Amieva M, Cañedo-Solares I, Gutiérrez-Castrellón P, Pérez-Andrade M, González-Contreras C, Ortiz-Cortés J, Ortega-Velázquez V, Galván-Ramírez ML, Ruiz-García M, Saltigeral-Simentel P, Ordaz-Favila JC, Sánchez C, Correa D. Neonatal screening pilot study of Toxoplasma gondii congenital infection in México. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:142-144
28. Gorgievsky - Hrisoho M, Germann D, Matter L. Diagnostic implications of kinetics of immunoglobulin M and A antibody responses to *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1506-1511
29. Denkers EY. From cells to signalling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;39:193-203
30. Ambroise-Thomas P, Petersen E. Congenital toxoplasmosis. Scientific background, clinical management and control. Springer-Verlag, Francia 2000, 325 pp.
31. Galván Ramírez ML, Soto Mancilla JL, Velasco Castrejón O, Pérez Medina R. Incidence of anti-*Toxoplasma* antibodies in women with high-risk pregnancy and habitual abortions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995;28:333-337
32. Rose NR & Friedman H. El laboratorio en inmunología clínica. Medica Panamericana. 2ª Edición. Argentina 1984, 1215 pp.
33. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002;185:S73-82
34. Correa D, Mandujano A, Medina Y, Medina E, Mata O, Carpio JC, Zavala A, Ruiz A, Gavilondo J, Ayala M, Vazquez J, Bell H, Dueñas M, Tamplin M. 2000. Manual de técnicas modernas en inmunología. Teoría y práctica. México. INDRE 95 pp.
35. Mokuno K, Kato K, Kawai K, Matsuoka Y, Yanagi T, Sobue I. Neuron-specific enolase and S-100 protein levels in cerebrospinal fluid of patients with various neurological diseases. *J Neurol Sci.* 1983;60:443-451

36. Basile AM, Fusi C, Conti AA, Paniccia R, Trefoloni G, Pracucci G, Carlo AD, Noferi D, Carbonetto F, Pretelli P, Calamai G, Vaccari M, Abate R, Inzitari D. S-100 protein and neuron-specific enolase as markers of subclinical cerebral damage after cardiac surgery: preliminary observation of a 6-month follow-up study. *Eur Neurol.* 2001;45:151-159
37. de Kruijk JR, Leffers P, Menheere PPCA, Meerhoff S, Twijnstra A. S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients. *Acta Neurol Scand.* 2001;103:175-179
38. Erb MA, Heinemann MK, Wendel HP, Häberle L, Sieverding L, Speer CP, Ziemer G. S-100 after correction of congenital heart defects in neonates: is it a reliable marker for cerebral damage? *Ann Thorac Surg* 2000;69:1515-1519
39. Townend WJ, Guy MJ, Pani MA, Martin B, Yates DW. Head injury outcome prediction in the emergency department: a role for protein S-100B? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002;73:542-546
40. Jönsson H, Johnsson P, Bäckström M, Alling C, Dautovic-Bergh C, Blomquist S. Controversial significance of early S100B levels after cardiac surgery. *BMC Neurology* 2004;4:24
41. Martens P, Raabe A, Johnsson P. Serum S-100 and neuron-specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 1998;29:2363-2366
42. Berger RP, Pierce MC, Wisniewski SR, Adelson PD, Clark RSB, Ruppel RA, Kochanek PM. Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics* 2002;109:1-6
43. Zimmer DA, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull.* 1995;37:417-429
44. Fanò G, Biocca S, Fulle S, Marigiò MA, Belia S, Calissano P. The S-100: a protein family in search of a function. *Prog Neurobiol.* 1995;46:71-82
45. Michetti F, Gazzolo D. S-100 protein in biological fluids: a tool for perinatal medicine. *Clin Chem.* 2002;48:2097-2104
46. Michetti F, Gazzolo D. S100B testing in pregnancy. *Clin Chim Acta.* 2003;335:1-7
47. Gazzolo D, Michetti F, Bruschetti M, Marchese N, Lituania M, Mangraviti S, Pedrazzi E, Bruschetti P. Pediatric concentrations of S100B protein in blood: age-and sex-related changes. *Clin Chem.* 2003;49:967-970

48. Gazzolo D, Vinesi P, Marinoni E, Di Iorio R, Marras M, Lituania M, Bruschetti P, Michetti F. S100B protein concentrations in cord blood: correlations with gestational age in term and preterm deliveries. *Clin Chem.* 2000;46:998-1000
49. Heizmann CW. S100B protein in clinical diagnostics: assay specificity. *Clin Chem.* 2004;50:249-251
50. Gazzolo D, Bruschetti M, Corvino V, Oliva R, Sarli R, Lituania M, Bruschetti P, Michetti F. S100B protein concentrations in amniotic fluid correlate with gestational age and with cerebral ultrasound scanning results in healthy fetuses. *Clin Chem.* 2001;47:954-956
51. Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Lituania M, Bruschetti PL, Michetti F. Circulating S100B protein is increased in intrauterine grow-retarded fetuses. *Pediatr Res.* 2002;51:215-219
52. Lima JE, Walz R, Tort A, Souza D, Portela L, Bianchin MM, Takayanagu OM, Leite JP. Serum and cerebrospinal fluid S100B concentrations in patients with neurocysticercosis. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:129-135
53. Flores-Vieryra R, Raya-Pérez JC, Torres-Márquez ME. Proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} : características y activación. *REB* 2005;24:74-80
54. Schoerhuber W, Kittler H, Sterz F, Behringer W, Holzer M, Frossard M, Spitzauer S, Laggner AN. Time course of serum neuron-specific enolase. A predictor of neurological outcome in patients resuscitated from cardiac arrest. *Stroke* 1999;30:1598-1603
55. Marangos PJ, Schmechel DE. Neuron specific enolase, a clinically useful marker for neurons and neuroendocrine cells. *Annu Rev Neurosci.* 1987;10:269-295
56. Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta.* 1989;183:13-32
57. van Engelen BGM, Lamers KJB, Gabreels FJM, Wevers RA, van Geel WJA, Borm GF. Age-related changes of neuron-specific enolase, s-100 protein, and myelin basic protein concentrations in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1992;38:813-816
58. Cunningham RT, Morrow JI, Johnston CF, Buchanan KD. 1994. Serum neurone-specific enolase concentrations in patients with neurological disorders. *Clin Chim Acta.* 1994;230:117-124

59. Wijnberger LDE, Nikkels PGJ, van Dongen AJCM, Noorlander CW, Mulder EJH, Schrama LH,† Visser GHA. Expression in the placenta of neuronal markers for perinatal brain damage. *Pediatr Res*. 2002;51:492-496
60. Fletcher L, Rider CC, Taylor CB. Enolase isoenzymes. III. Chromatographic and immunological characteristics of rat brain enolase. *Biochim Biophys Acta* 1976;452:245-252
61. Castro-Gago M, Rodríguez-Nuñez A, Novo-Rodríguez MI, Eirís-Puñal J. Parámetros bioquímicos predictivos de daño neuronal en la edad pediátrica. *Rev Neurol* 2001; 32:1141-1150
62. Ross SA, Cunningham RT, Johnston CF, Rowlands BJ. Neuron-specific enolase as an aid to outcome prediction in head injury. *Br J Neurosurg*. 1996;10:471-476
63. Wong M, Ess K, Landt M. Cerebrospinal fluid neuron-specific enolase following seizures in children: role of etiology. *J Child Neurol* 2002;17:261-264
64. Tanabe T, Shuhei S, Hara K, Shimakawa S, Wakamiya E, Tamai H. Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase levels after febrile seizures. *Epilepsia* 2001;42:504-507
65. Blennow M, Sâvman K, Ilves K, Thoresen M, Rosengren L. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. *Acta Pediatr* 2001;90:1171-1175
66. Raabe A, Grolms C, Seifert V. Serum markers of brain damage and outcome prediction in patients after severe head injury. *Br J Neurosurg*. 1999;13:56-59
67. Nagdyman N, Grimmer I, Scholz T, Müller C, Obladen M. Predictive value of brain-specific proteins in serum for neurodevelopmental outcome after birth asphyxia. *Pediatr Res* 2003;54:270-275
68. Verdú PA, Garde MT, Martínez CM, Rinaudo ZR, Martín JAA. Determinación en sangre de la enzima enolasa específica neuronal en niños con encefalopatías agudas: Valor pronóstico de secuelas neurológicas. *An Esp Pediatr*. 1998;48:17-20
69. Schmechel D, Marangos PJ, Zis AP, Brightman M, Goodwin FK. Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells. *Science* 1978,199:313-315
70. Abdul-Khaliq H, Blasig IE, Baur MO, Hohlfeld M, Alexi-Meskishvili V, Lange PE. Release of the cerebral protein S-100 into blood after reperfusion during

cardiac operations in infants: is there a relation to oxygen radical-induced lipid peroxidation?. J Thorac Cardiovasc Surg 1999;117:1027-1028

71. Jönsson H, Johnsson P, Bäckström M, Alling C, Westaby S, Blomquist S. Significance of serum S100 release after coronary artery bypass grafting. Ann Thorac Surg 1998;65:1639-1644