

Respuesta neuroinmunológica en niños con meningoencefalitis por *Neisseria meningitidis*

Bárbara Padilla-Docal^{1*}, Rosa Ferro-Blanco², Alberto Juan Dorta-Contreras¹, Raisa Bu Coifui-Fanego¹, Olga Susana De Paula-Almeida¹, René Martínez-Alderete¹

¹ Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL), Facultad de Ciencias Médicas “Dr. Miguel Enríquez”, Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Ramón Pintó 206, Luyanó. Ciudad de La Habana, Cuba.

² Hospital Psiquiátrico Roberto Sorhegui. Cotorro. Ciudad de La Habana, Cuba.

email: barbara.padilla@infomed.sld.cu

La enfermedad meningocócica es una entidad clínica que constituye aún un problema de salud mundial. Esta afecta, sobre todo, a la población infantil ocasionando un cuadro clínico grave, de evolución severa, así como un elevado número de muertes y secuelas. Su agente etiológico, *Neisseria meningitidis*, habita de forma natural en las membranas mucosas de la nasofaringe humana. Con el objetivo de determinar las características de la respuesta neuroinmunológica en niños con meningoencefalitis por *N. meningitidis*, se estudiaron 20 niños diagnosticados con esta afección clínica, entre los años 1988- 2009. A estos se les realizó una punción lumbar en el momento del ingreso y se cuantificó la IgA, IgM e IgG, la albúmina y el C3c en el suero y en el líquido cefalorraquídeo. Se confeccionó un reibergrama de acuerdo con los datos obtenidos en la cuantificación. La disfunción de la barrera hematoencefálica se presentó en seis pacientes y hubo síntesis intratecal de las inmunoglobulinas mayores y C3c en 65% y 95%, respectivamente. Se comprobó la ocurrencia de síntesis intratecal de al menos dos inmunoglobulinas mayores asociadas con el componente C3c del complemento, participando estos en los mecanismos involucrados en la respuesta inmune de esta enfermedad.

Palabras clave: Barrera sangre-LCR, complemento, C3c, líquido cefalorraquídeo, *Neisseria meningitidis*, reibergrama.

Introducción

Después de transcurrir casi 200 años de investigación sobre el comportamiento de la enfermedad meningocócica (EM), esta constituye un problema de salud para muchos países; provoca gran interés entre los profesionales de la salud y en la población general, por afectar sobre todo a la población infantil y por la gravedad de su cuadro clínico, evolución severa, elevado número de muertes y secuelas invalidantes (1).

Uno de sus agentes etiológicos, *Neisseria meningitidis*, habita de forma natural en las membranas mucosas de la nasofaringe humana, sin provocar, en la mayoría de los casos, signos clínicos evidentes de infección (2).

El desarrollo de la epidemia de EM en Cuba constituye el principal problema de salud en la década de los años 1980 (3-5), lo que condujo a la realización de investigaciones encaminadas al desarrollo y la obtención de una vacuna eficaz para la prevención y el control de esta entidad clínica. En esta misma década se obtiene la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGO-C-BC[®], un producto biofarmacéutico producido contra los serogrupos de *N. meningitidis* B y C (6,7).

Para evidenciar lo que sucede en el cerebro a nivel molecular se recurre al estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR) y

a través de este se trata de llegar a un diagnóstico certero, junto con las técnicas imagenológicas que también contribuyen a estos fines (8,9).

Los reibergramas o gráficos de las razones de Reiber son diagramas en los que básicamente se analiza de forma integrada la funcionalidad de la barrera sangre-LCR y la síntesis intratecal de las inmunoglobulinas mayores, y recientemente se utiliza también para la síntesis de IgE, C3c y C4 (10-13) que de forma aislada no lograrían tener un mayor impacto en el diagnóstico de algunas enfermedades asociadas con determinados patrones.

El objetivo de este trabajo fue determinar las características de la respuesta neuroinmunológica en niños con meningoencefalitis por *N. meningitidis*, usando el gráfico de las razones de Reiber.

Material y Métodos

Se colectaron muestras de suero y LCR de 20 niños con edades comprendidas entre los cuatro meses y los 16 años, con un diagnóstico de meningoencefalitis por *N. meningitidis*, durante los años 1988 a 2009 que ingresaron en el Hospital Pediátrico de San Miguel del Padrón, Ciudad de La Habana.

* Licenciada en Biología, Máster en Enfermedades Infecciosas y Profesor e investigador Auxiliar.

Se tomaron las muestras que se indican de forma habitual en los casos que ingresan con signos sugestivos de meningoencefalitis de etiología infecciosa previo a la confirmación del diagnóstico. Esta fue realizada por los métodos tradicionales de cultivo microbiológico y confirmada en los laboratorios de la Dirección Provincial de Higiene y Epidemiología de la Ciudad de La Habana. Las cepas posteriormente fueron identificadas como pertenecientes al serogrupo B por esa instancia.

Para estudiar la respuesta neuroinmunológica las muestras se colectaron en el momento del ingreso, coincidiendo con el inicio del cuadro clínico. Las mismas se conservaron a -80 °C hasta el momento de su procesamiento. Se cuantificaron los niveles de C3c, IgG, IgA, IgM, y albúmina en los sueros mediante inmunodifusión radial en placas NOR Partigen y para el ensayo de LCR se hizo en placas LC Partigen (Dade-Behring, Marburg).

Una vez obtenidos los resultados, se colocaron en un reibergrama diseñado para C3c (12). Los de las inmunoglobulinas mayores también se colocaron en los reibergramas correspondientes (10). A cada paciente, de acuerdo con las inmunoglobulinas que se puede o no sintetizar, se le caracteriza por un patrón de síntesis determinado.

Se compararon las proporciones promedio por tipo de patrón para cada inmunoglobulina utilizando la prueba de Chi Cuadrado para la comparación de proporciones por el paquete estadístico MedCalc versión 6.0.

La investigación se aprobó por el Comité en Investigaciones Bioéticas de la Facultad de Ciencias Médicas “Dr Miguel Enríquez”, de la Universidad de Ciencias Médicas de La Habana. Como todos los pacientes eran niños, sus padres o tutores dieron su consentimiento informado de participación

por escrito para que las muestras se utilizaran con fines investigativos, ya que no sería necesario realizar otra intervención debido a que solo se utilizaría la primera punción lumbar extraída para el diagnóstico de la enfermedad.

Resultados

Los patrones de síntesis intratecal de las inmunoglobulinas mayores y el componente C3c del complemento, con su frecuencia de aparición, se describen en la Tabla 1. Obsérvese que los patrones I y III fueron los más frecuentes en los pacientes estudiados y el componente C3c se identificó en ambos patrones.

La fracción intratecal, o sea, la proporción de inmunoglobulina sintetizada intratecalmente con relación al contenido total de esta en LCR fue promediada para cada paciente y tipo de patrón, como se observa en la Tabla 2.

En la Figura 1 se muestran los reibergramas para las clases principales de inmunoglobulinas (IgA, IgM, IgG). Los puntos situados por encima de la línea hiperbólica más fuerte se correspondieron con los pacientes que sintetizaron intratecalmente las distintas clases de inmunoglobulinas. Como puede observarse, 17 pacientes sintetizaron IgG, todos sintetizaron IgA y 16 pacientes sintetizaron IgM. Los pacientes que no sintetizaron estas inmunoglobulinas no fueron ubicados en esta Figura.

Hubo síntesis intratecal simultánea de IgG, IgA e IgM en 13 (65%) de los pacientes estudiados que se ubicaron en los patrones I y II, ya que el patrón I incluyó, además, la síntesis intratecal de C3c. En el resto de los pacientes se produjo la síntesis de al menos dos clases de inmunoglobulinas y se ubicaron en los patrones III y IV.

Tabla 1. Patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas mayores y el componente C3c en pacientes con meningoencefalitis por *N. meningitidis*.

No	Patrones de síntesis	Frecuencia
I	C3c+ IgA+IgM+IgG	12
II	IgA + IgG + IgM	1
III	C3c + IgA + IgG	4
IV	C3c + IgA + IgM	3

Tabla 2. Fracción intratecal promedio de las inmunoglobulinas según el patrón de síntesis intratecal.

Patrón	Fracción intratecal promedio		
	IgA	IgM	IgG
I	73,1	81,3	92,4**
II	82,2	62,4*	89,4
III	98,5		61,3**
IV	76,4	98,5*	

$\Psi^2 = 6,15$; $gl = 1$; $p = 0,0131$ * Diferencia significativa

$\Psi^2 = 3,82$; $gl = 1$; $p = 0,05$ ** Diferencia significativa

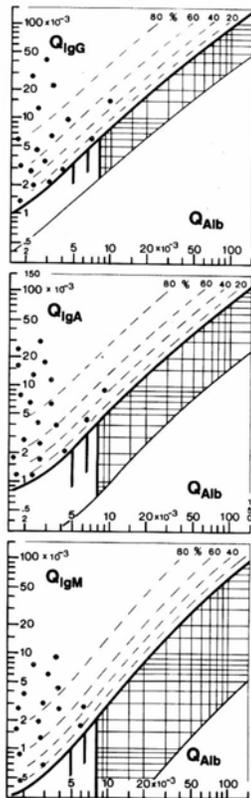


Figura 1. Reibergrama para la síntesis intratecal de las clases principales de inmunoglobulinas. La razón LCR/suero (Q) es el cociente obtenido de la división entre la concentración del analito en el LCR y en el suero. La curva hiperbólica más fuerte representa la línea de descripción (Q límite) entre la fracción de inmunoglobulina derivada del SNC y la fracción de la sangre.

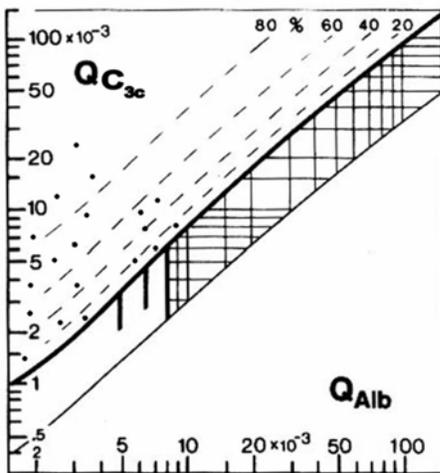


Figura 2. Reibergrama para la síntesis intratecal de C3c. De igual forma que el reibergrama de las inmunoglobulinas los puntos ubicados por encima de la línea hiperbólica más fuerte indica que ha habido síntesis intratecal de C3c.

Para determinar el funcionamiento de la barrera sangre-LCR se tomó en cuenta el valor de Q albúmina que no es más que el cociente entre la concentración de esta proteína en LCR y en suero. Esta variable es edad-dependiente. Para los niños la disfunción de esta barrera se produjo cuando la Q albúmina es mayor de 5×10^{-3} y en este estudio seis pacientes tuvieron una disfunción de la barrera sangre-LCR. En la Figura 1 se observa que dos de los pacientes con síntesis intratecal de inmunoglobulinas también tuvieron disfunción de esta barrera y los cuatro restantes tuvieron solamente disfunción de barrera sin síntesis de ninguna clase de inmunoglobulinas.

La Figura 2 muestra los resultados de la aplicación del reibergrama para la síntesis intratecal de C3c. Se apreció que en el 95% de los pacientes estudiados hubo síntesis intratecal de este componente del sistema de complemento. Cuando se compararon los patrones de síntesis se tomó en cuenta la intensidad de la respuesta inmune intratecal, o sea, al valorar la fracción intratecal promedio para cada inmunoglobulina producida entre los distintos patrones se observó diferencia significativa para la IgG entre los patrones I y III y para la IgM entre los patrones II y IV (Tabla 2).

Valores ubicados por encima de esas líneas discriminatorias representan síntesis intratecal de IgG, IgA, IgM u otro componente a analizar. Las curvas de puntos indican la fracción intratecal en porcentaje con respecto a la concentración total de la inmunoglobulina en el LCR. La Q albúmina depende de la edad y para valorar mejor esta hay tres barras verticales más pronunciadas: la primera (de izquierda a derecha) señala el límite normal hasta los 15 años ($Q_{Alb}=5 \times 10^3$), la segunda hasta los 40 ($Q_{Alb}=6,5 \times 10^3$) y la tercera hasta los 60 ($Q_{Alb}=8 \times 10^3$).

Discusión

En el mundo ocurre un aproximado anual de 500.000 casos de EM, notificándose alrededor de 60.000 pacientes con secuelas permanentes y más de 50.000 muertes. Por lo que la posibilidad de prevenir esta enfermedad con vacunas toma gran importancia (14). Esta constituye una infección endémica en el mundo. Las tasas de incidencia varían desde 1-3/100.000 habitantes en los países industrializados hasta 10-25/100.000 en los países del tercer mundo. Esta entidad clínica es frecuente en las regiones con un clima templado y tropical.

La EM se puede presentar de forma epidémica con ondas cíclicas cada 10 años y puede también ocurrir en brotes, sobre todo durante la estación invierno-primavera, aunque suelen presentarse casos esporádicos durante todo el año (14).

El estudio de la respuesta inmune es de vital importancia para comprender la fisiopatología de las enfermedades infecciosas y dentro de ellas, la meningoencefalitis por *N. meningitidis*. La mayoría de los pacientes que tuvieron

una funcionalidad adecuada de la barrera sangre-LCR exhibieron síntesis intratecal de las inmunoglobulinas mayores.

Desde el punto de vista clínico el problema fundamental presentado por la barrera sangre-LCR es que los agentes terapéuticos deben llegar al cerebro para tratar las enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC) y la función atribuida a la barrera sangre-LCR es su capacidad para controlar el intercambio molecular con propiedades informativas, como pépticos y proteínas reguladoras, entre el SNC y la circulación periférica (15,16).

Según lo descrito en la literatura, el patrón predominante para esta enfermedad es el de IgA + IgG, seguido por el de las tres clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), como es el caso que nos ocupa (17).

La síntesis intratecal de al menos dos clases de inmunoglobulinas en la fase aguda de la enfermedad es un signo distintivo en los pacientes con meningoencefalitis por *N. meningitidis*, como se comprobó en los resultados del reibergrama. Sin embargo, la síntesis intratecal de IgM fue menos numerosa en relación con las otras inmunoglobulinas, con un 20% de pacientes que no mostraron síntesis intratecal de esta inmunoglobulina.

Los cuatro patrones de síntesis de los pacientes con meningoencefalitis por *N. meningitidis* pueden servir para compararlos con otros patrones de enfermedades de origen bacteriano que afecta el SNC.

El patrón de síntesis intratecal de las clases de inmunoglobulinas mayores constituyó un elemento diagnóstico auxiliar para esta enfermedad, aunque para afirmarlo se necesita aumentar el número de observaciones para la evaluación de las clases mayores de inmunoglobulinas. En general, este comportamiento corresponde a la dinámica de la respuesta inmune dentro del SNC; la síntesis local de inmunoglobulinas es una información insustituible para valorar el comportamiento inmunológico de estos pacientes frente a los agentes invasores (18, 19).

Como ya se refirió en este estudio, el patrón más frecuente fue el de las tres clases de inmunoglobulinas y el C3c. La primera línea de defensa del hospedero y la más importante contra *N. meningitidis* es la integridad de las mucosas; una vez que atraviesa esta membrana y alcanza el torrente sanguíneo, la defensa principal es el sistema de complemento y la presencia de anticuerpos específicos. El componente C3 está presente en las tres vías de activación del complemento, por lo que medir el metabolito final de este, el C3c resulta esencial para valorar el papel del complemento en estos pacientes.

Se ha estudiado que el déficit de la vía alternativa o vía final común está asociado de manera especial a infecciones (meningitis y neumonía) debido a *N. meningitidis*, el déficit de la vía clásica generalmente se asocia a enfermedades autoinmunes y el de los componentes iniciales del complemento está asociado con infecciones causadas por *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (20). En todos los pacientes estudiados, excepto en uno, se constató síntesis intratecal y liberación al LCR de C3c.

La síntesis intratecal de C3c y su liberación al LCR significa, en primer lugar, que se produjo la activación del sistema de complemento en alguna de las tres vías en que interviene y, además, que se le ha dado un uso biológico a esta proteína y luego que cumplió sus funciones biológicas, sufrió un proceso de degradación y liberación al LCR en forma de C3c.

La respuesta inmune intratecal en los pacientes con meningoencefalitis por *N. meningitidis* tienen características distintivas que lo diferencian de otras meningoencefalitis de origen bacteriano, por lo que en su conjunto, podrían ser elementos a tener en cuenta para auxiliar al médico en su diagnóstico diferencial.

Referencias

1. Daley AJ. Meningococcal disease. Aust Fam Physician 2003;32:597-601.
2. Vázquez JA. Portadores de meningococo: un enigma a finales del siglo XX. Enferm Infecc Microbiol Clin 2000;18:352-5.
3. Climent Y, Urwin R, Yero D, Martínez I, Martín A, Sotolongo F, et al. The genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in Cuba before and after the introduction of a serogroup BC vaccine. Infect Genet Evol 2010;10:546-54. .
4. Holst J, Martín D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, et al. Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. Vaccine 2009;27 Suppl 2:B3-12. .
5. Domínguez F, Menéndez J, Ochoa R. An effective serogroup B meningococcal vaccine. Vaccine 2006;24:7025-6.
6. Sotolongo F, González N. VA-MENGOC-BC®, una década de experiencia. Avances Médicos de Cuba 1999;18:8-12.
7. Sierra GV, Campa HC, Valcárcel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination in Cuba. NIPH Ann 1991;14:195-207.
8. Dorta Contreras AJ, Noris García E, Bu-Coifui Fanego R y Padilla Docal B. Bases moleculares de la Neuroinmunología (I). Barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y síntesis intratecal de inmunoglobulinas. Rev Cubana Pediatr 2005;77(3). Disponible en: <http://bvs.sld.cu/revistas/vol77: 3-4. 05/ped03305.htm>
9. Dorta-Contreras AJ, Noris-García E, Bu-Coifui Fanego R, Padilla-Docal B. Bases moleculares de la Neuroinmunología (II). El reibergrama y su uso en Neuroinmunología. Rev Cubana

- Pediatr 2005;77(3). Disponible en: <http://www.bvs.sld.cu/revistas/vol77:3-4.05/ped04305.htm>
10. Dorta-Contreras AJ. Reibergramas: elemento esencial en el análisis inmunológico del líquido cefalorraquídeo. Rev Neurol 1999; 28:996-8.
 11. Dorta-Contreras AJ, Noris-García E, Reiber H. Reibergrama para la evaluación de la síntesis intratecal de IgE. Rev Neurol 2004;39:794-5.
 12. Dorta-Contreras AJ, Noris-García E, Padilla-Docal B, Rodríguez-Rey A, Bu-Coifui Fanego R, Magraner-Tarrau ME, et al. Reibergrama para la evaluación de la síntesis intratecal de C3c. Arq Neuropsiquiatr 2006; 64 (3-A):585-8.
 13. Padilla-Docal B, Dorta-Contreras AJ, Bu-Coifui-Fanego R, Rodríguez-Rey A. C4CSF/serum quotient graphs for the evaluation of intrathecal C4 synthesis Cerebrospinal Fluid. Research 2009, 6:8. Disponible en: <http://www.cerebrospinalfluidresearch.com/content/6/1/8>.
 14. Sáfadi MA, Cintra OA. Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention. Neurol Res. 2010 Apr;32(3):263-71.
 15. Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) –a concept common to normal blood- CSF barrier function and to dysfunction in neurological diseases. J Neurol Sci 1994;122:189-203.
 16. Dorta Contreras A J, Reiber H, Noris García E, Padilla Docal B, Bu Coifui Fanego R, Pedroso Camejo F L, et al. Barrera Sangre-Líquido Cefalorraquídeo. Ciudad de la Habana; Editorial Academia; 2006.
 17. Dorta Contreras AJ, Nuñez N, Pérez O. Neuroinmunología de la meningoencefalitis por *Neisseria meningitidis*. En: Dorta Conteras AJ, Bu Coifui Fanego R, Magraner Tarrau ME, Montoro Cardoso E, Nuñez Fernández FA, Fundora Hernández H. Neuroinmunología Clínica. Ciudad de la Habana: Editorial Academia; 2009. p. 11-15.
 18. Bu Coifui Fanego R, Dorta Contreras AJ, Ferrá Valdés M, Torres Romo U. Ruptura de la barrera hematoencefálica y síntesis intratecal de inmunoglobulinas II. Síntesis local de inmunoglobulinas. Rev Cubana Pediatr 1993; 65(2):94-103.
 19. Lejon, V, Robays J, N'Siesi FX, Mumba D, Hoogstoel A, Bisser S, et al. Treatment failure related to intrathecal immunoglobulin M (IgM) synthesis, cerebrospinal fluid IgM, and interleukin-10 in patients with hemolymphatic-stage sleeping sickness. Clin Vacc Immunol 2007;14:732-7.
 20. Padilla Docal B, Dorta Contreras AJ, Bu Coifui Fanego R, Noris García E, Fundora Hernández H, Callol Barroso J, et al. Síntesis intratecal de C3c e inmunoglobulinas en niños con meningoencefalitis bacteriana. VacciMonitor 2008;17(3):1-5.

Neuroimmunological response in children with meningoencephalitis by *Neisseria meningitidis*

Abstract

Meningococcal disease is a clinical entity that remains as health world problem. It mostly affects children population producing gravity, a severe evolution, and a high quantity of deaths and sequels. *Neisseria meningitidis* is the etiological agent. The mucosa membranes of human nasopharynx are its natural habitat. This paper aims at establishing and determining the characteristics of the neuroimmunological response in children suffering from meningoencephalitis caused by *Neisseria meningitidis*. Twenty children with this diagnosis from 1998 and 2009 were studied. Cerebrospinal fluid lumbar puncture and blood extraction were performed. Samples were collected at the time of admission of the children to the hospital. IgA, IgG, IgM, C3c and albumin were quantified. A reibergram was done according to the data obtained in the quantification. Blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction was present in 6 of studied patients and there was intrathecal synthesis of major immunoglobulins and C3c in 65 and 95% respectively. The occurrence of intrathecal synthesis of at least 2 types of major immunoglobulins associated to C3c was demonstrated, which participate in the mechanisms involved in the immune response in this disease.

Keywords: Blood-CSF barrier dysfunction, complement, C3c, cerebrospinal fluid, *Neisseria meningitidis*, reibergram.

Recibido: Julio de 2010

Aceptado: Septiembre de 2010