

INMUNIDAD AL MENINGOCOCO: ESTUDIO DE UN GRUPO DE CONVALECIENTES

LABORATORIO DE MENINGOCOCO. CENTRO
NACIONAL DE BIOPREPARADOS

*Dra. Hilda Pauste Ruiz**, *Dr. Eric Martínez Torres***, *Dra. María A. Campa Huergo****, *Lic. Luis García Imía***** y *Dra. Teresita Leyva******

Pauste Ruiz, H. et al.: *Inmunidad al meningococo: Estudio de un grupo de convalecientes.*

Se midió el título de anticuerpos contra el polisacárido capsular meningocócico grupo B en muestras de suero de 158 convalecientes de enfermedad meningocócica y en 158 testigos. En los convalecientes los títulos de anticuerpos, medidos por hemaglutinación pasiva, fueron significativamente más altos que en los testigos. La concentración de anticuerpos IgG contra el antígeno de serotipo 15, determinada por análisis inmunoenzimático, en una muestra de convalecientes y de testigos, también fue significativamente mayor en los convalecientes. No hubo diferencias en los títulos de anticuerpos contra los polisacáridos A y C. Estos resultados están de acuerdo con la clasificación de la mayor parte de las cepas de meningococos aisladas en el país durante este período como pertenecientes al serogrupo B y al serotipo 15.

INTRODUCCION

La enfermedad meningocócica constituye en estos momentos, en nuestro país, uno de los principales problemas epidemiológicos. A pesar de la sensibilidad de la *Neisseria meningitidis* (meningococo) a los antibióticos, en ocasiones éstos resultan incapaces de impedir la muerte del enfermo. En la actualidad existen vacunas efectivas contra los meningococos pertenecientes a los serogrupos A, C, Y y W135, utilizadas fundamentalmente durante las epidemias provocadas por uno de estos serogrupos. No existen vacunas efectivas contra los meningococos del serogrupo B, ni una vacuna de amplio espectro que pueda utilizarse como método de prevención de la enfermedad.

La clasificación de los meningococos en diferentes serogrupos se basa en la utilización de antisueros específicos dirigidos contra los polisacáridos de la cápsula que rodea a estos microorganismos. Nueve grupos con diferentes polisacáridos capsulares habían sido descritos (A, B, C, D, X, Y, Z, W135 y 29E).¹

* Candidata a Doctora en Ciencias. Investigadora Agregada. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC).

** Vicedirector Docente. Hospital Pediátrico Docente "William Soler". Asistente.

*** Residente de Pediatría. Hospital Pediátrico Docente "William Soler".

**** Licenciado en Bioquímica. Laboratorio de Meningococo. Ciudad de La Habana.

***** Especialista de I Grado en Microbiología. Jefa del Laboratorio de Infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC). Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Ciudad de La Habana.

Recientemente se han descrito 4 nuevos grupos (H, I, K, L). Existen también cepas no capsuladas, aisladas a partir del exudado nasofaríngeo de individuos portadores asintomáticos.

Además de la cápsula de polisacáridos, los meningococos están rodeados por una membrana externa; la cual posee proteínas y lipopolisacáridos que resultan inmunogénicos, tanto en los animales de experimentación como en enfermos y portadores.²⁻⁴

Con sueros hiperinmunes dirigidos contra los lipopolisacáridos y las proteínas de la membrana externa los meningococos pertenecientes a un serogrupo pueden clasificarse en varios inmutipos y serotipos.^{5,6} Los anticuerpos tienen un papel determinante en los mecanismos de inmunidad contra el meningococo.⁷ La mayoría de los adultos poseen anticuerpos protectores inducidos por el contacto con el microorganismo o con otros microorganismos que poseen estructuras antigénicas comunes.^{8,9} La concentración de anticuerpos circulantes con actividad bactericida determina el nivel de protección del individuo contra la enfermedad.

El polisacárido del serogrupo B no induce la producción de niveles altos de anticuerpos bactericidas, sino fundamentalmente anticuerpos opsonizantes.¹⁰ Los anticuerpos con capacidad bactericida contra los meningococos del grupo B están dirigidos principalmente contra las proteínas de la membrana externa conocidas como proteínas de serotipo.¹¹

El objetivo de este trabajo ha sido conocer la respuesta de producción de anticuerpos en un grupo de personas convalecientes de infección meningocócica, por la utilidad de esta información para futuros programas de inmunización.

MATERIAL Y METODO

CONVALECIENTES Y TESTIGOS

Se tomó muestra de suero sanguíneo a 158 individuos convalecientes de infección meningocócica, a los cuales se les había hecho el diagnóstico de la enfermedad entre 1 y 15 meses antes de la extracción de sangre (de enero de 1983 a marzo de 1984). El suero se conservó congelado a -20°C hasta el momento de ser utilizado. El grupo estaba constituido por 117 niños y 41 adolescentes y adultos, distribuidos según la edad en la forma siguiente: 29 lactantes, 32 preescolares, 56 escolares y 41 mayores de 15 años. Según el sexo 70 eran hembras y 88 varones. Los convalecientes provenían de los hospitales pediátricos y de los hospitales de adultos de la Ciudad de La Habana. Los criterios de diagnóstico de la enfermedad meningocócica fueron: a) pacientes con un síndrome infeccioso y aislamiento de *N. meningitidis* en sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) o cultivo de petequias; b) pacientes con un cuadro clínico humoral compatible con una meningoencefalitis purulenta y presencia de diplococos gramnegativos al examen microscópico directo del LCR; c) pacientes con fiebre de probable causa infecciosa y manifestaciones purpúricas, de súbita instalación, en los cuales no se comprobó otra causa (diagnóstico clínico epidemiológico). Se logró aislamiento bacteriano mediante cultivo en 52 enfermos, de los cuales 49 correspondieron al serogrupo B (94,2 %), 2 al serogrupo C y 1 al serogrupo A.

Como testigos se tomaron muestras de suero sanguíneo de 117 niños con edades entre 1 y 14 años, quienes asistieron a las consultas del Hospital Pediátrico "William Soler", por diferentes motivos no relacionados con la infección meningocócica y 41 adultos donantes

del Banco de Sangre Provincial de la Ciudad de La Habana. La distribución por edades y sexos de los niños utilizados como testigos era similar a la de los convalecientes.

POLISACARIDOS

Los polisacáridos A, B y C fueron purificados en el laboratorio a partir de cepas de referencia, con el empleo del método y los controles descritos por el comité de expertos de la OMS en patrones biológicos.¹² Se utilizaron las cepas ATCC 13077, ATCC 1309 y ATCC 13102, conservadas en el laboratorio.

ANTIGENO DE SEROTIPO

El antígeno de serotipo 15 (AST 15) fue obtenido mediante extracción con LiCl y ultracentrifugación por el método desarrollado por *Frasch y Gotschlich*¹³ a partir de una cepa de referencia B15 (LNPN 2434), gentilmente donada por el doctor *I. J. Riou*, del Instituto Pasteur de París.

HEMAGLUTINACION PASIVA

Los títulos de anticuerpos contra los polisacáridos capsulares A, B y C, se determinaron mediante el método de hemaglutinación pasiva. Se utilizaron glóbulos rojos humanos frescos, del grupo O, Rh negativo, sensibilizados con los polisacáridos al seguir el procedimiento publicado por *Artenstein et al.*¹⁴ Se hicieron diluciones dobles de los sueros a partir de 1:2. Los sueros que no aglutinaron los glóbulos sensibilizados en esta primera dilución fueron considerados negativos. La especificidad de la reacción de los sueros con altos títulos contra el polisacárido B fue comprobada con la repetición de las determinaciones después de adsorber dichas muestras con polisacáridos B insolubilizados con gel de hidróxido de aluminio. Las comparaciones de los datos obtenidos se realizaron mediante análisis de varianza de clasificación simple, seguido de una prueba de Duncan. Los resultados se expresan como los valores recíprocos de los títulos.

ANALISIS INMUNOENZIMATICO

A un grupo de convalecientes y 38 testigos se les determinó la concentración de anticuerpos de la clase IgG contra el AST 15, mediante análisis inmunoenzimático. Placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano se recubrieron con AST 15 disuelto en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6. Las muestras de suero se diluyeron 1:250 con solución salina fosfato (pH 7,2), con *Tween 20* al 0,1 % (V/V) y seroalbúmina bovina (1g/L). La presencia del complejo antígeno anticuerpo fue revelada con IgG de carnero anti IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina. Como sustrato de la enzima se utilizó paranitrofenil fosfato diluido en tampón de dietanolamina con MgCl₂ (pH 9,8). Las placas se mantuvieron durante los distintos pasos de incubación a temperatura ambiente y la lectura de la reacción de la enzima con el sustrato se realizó a los 30 min, al medir la densidad óptica de cada pocillo a 405 nm. Como referencia se utilizó el suero de una convaleciente al que arbitrariamente se le asignó un valor de 5 000 unidades de anticuerpo contra el AST 15. El análisis de los resultados se realizó empleando la prueba de la t de Student, con la utilización de los logaritmos de los valores de las unidades de anticuerpo. Se consideró como nivel de significación $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontró que los títulos de anticuerpo contra el polisacárido B fueron significativamente superiores en el conjunto de los convalecientes menores de 14 años, que en el grupo de los testigos de igual edad (tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre los títulos de anticuerpos contra los polisacáridos A, B y C entre los convalecientes y los testigos menores de 14 años.

Medias de los títulos de anticuerpos (N = 109)			
	Anti-A	Anti-B	Anti-C
Convalecientes	63,1	14,0	1,8
Testigos	72,2 (a)	0,6 (b)	2,5 (a)

Leyenda: (a): Diferencia no significativa (b): Diferencia significativa, $\alpha = 0,05$.

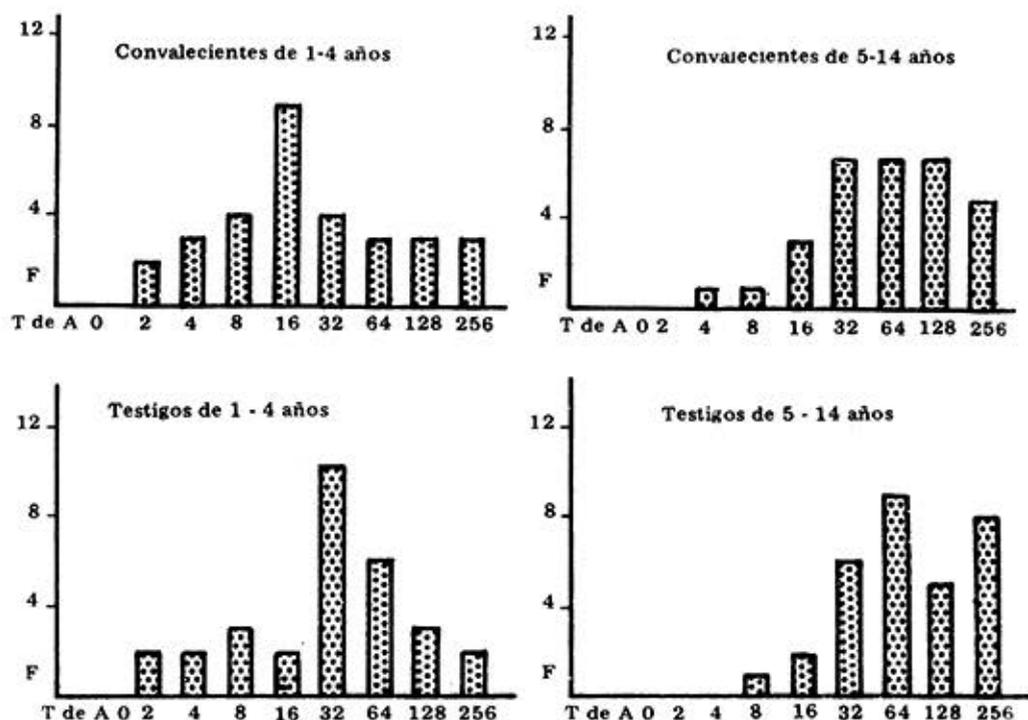
En el año 1983 el 80,7 % de las cepas recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Neisseria* pertenecieron al serogrupo B, en el año 1984 aumentó hasta el 93,2 %, además, el 94,2 % de los aislamientos de meningococos que se realizaron en los enfermos comprendidos en este grupo de estudio pertenecían al serogrupo B; por lo que podemos considerar que el incremento de los títulos de anticuerpos contra el polisacárido B, se debió a que la mayoría de los enfermos estuvieron afectados por cepas pertenecientes a este serogrupo. Similar análisis en el caso de los anticuerpos específicos para los polisacáridos A y C no arrojó diferencias significativas entre los títulos de los convalecientes y de los testigos.

Al comparar los títulos de anticuerpos contra los polisacáridos A y C por grupos de edades, se encontró que los niños tenían igual comportamiento, ya pertenecieran a los testigos o a los convalecientes, según se muestra en las figuras 1 y 2. Para ambos polisacáridos se pudo apreciar que la frecuencia de títulos más altos aumentó con la edad. Los títulos de anticuerpos contra el polisacárido C fueron más bajos que los títulos contra el polisacárido A.

Se ha demostrado que los anticuerpos circulantes contra el polisacárido A aparecen más temprano y alcanzan concentraciones más elevadas que los anticuerpos dirigidos contra el polisacárido C. El aumento de las concentraciones de anticuerpos inducidos por la vacunación con polisacárido A se mantiene durante un tiempo más largo que el aumento inducido por la vacunación con polisacárido C.^{15,16}

En las encuestas hechas a los convalecientes y a los testigos se recogió que al menos una parte de ellos recibió la vacuna combinada A + C que se administró en nuestro país en 1979 y 1980.

En la figura 3 se presenta la distribución de frecuencia de los títulos de anticuerpos contra el polisacárido B de los convalecientes clasificados en cuatro grupos etarios. Las diferencias de los títulos de las personas de 15 y 40 años resultaron significativas en relación con los grupos de 1 a 4 años y al grupo menores de 1 año. Los títulos del grupo de 5 a 14 años fueron significativamente más altos que los títulos de los menores de 1 año. Las diferencias entre los grupos de edades contiguas no fueron significativas.



F = Frecuencia. T de A = Título de anticuerpos.

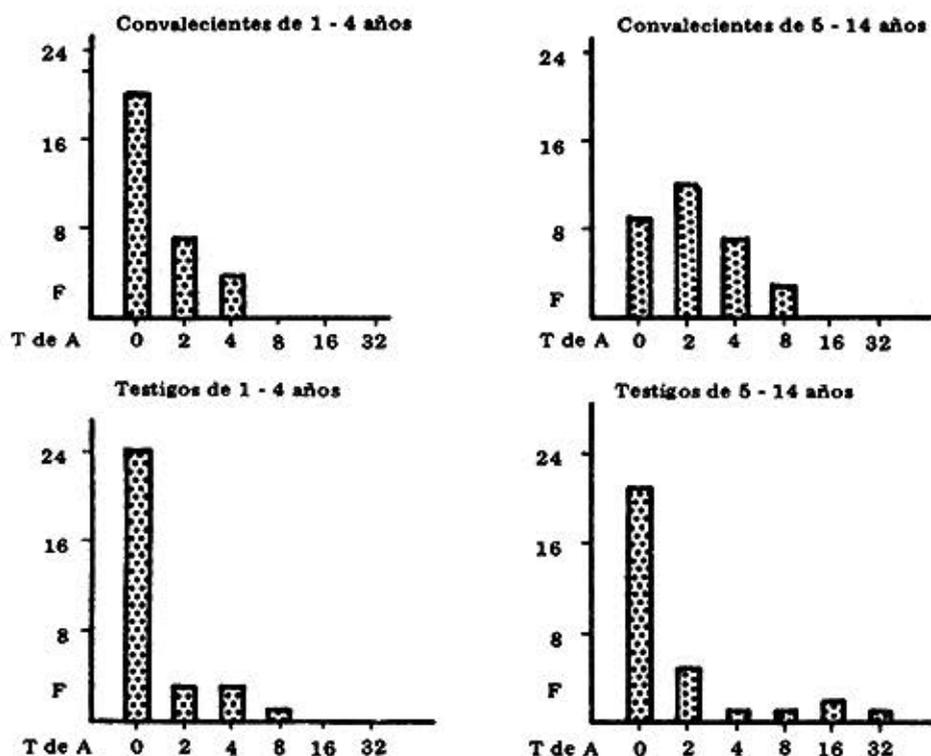
Figura 1. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra el polisacárido del grupo A (N = 31).

La mayor frecuencia de títulos antipolisacáridos B más altos en los individuos de más edad se corresponde con una mayor madurez del sistema inmunitario y con una mayor probabilidad de un contacto previo con el polisacárido B o con antígeno similares en el transcurso de la vida. Aunque predominaron entre los testigos los títulos bajos contra el polisacárido B, se encontró una mayor frecuencia de sueros positivos en los adultos y en los niños de 5 a 14 años que en los niños más pequeños (tabla 2).

Tabla 2. Presencia de anticuerpos contra el polisacárido capsular del grupo B en el suero de los testigos.

Años de edad	Número de individuos	% de sueros (a) positivos
0 - 1	19	0
1 - 4	36	5,5
5 - 14	58	32,6
18 - 59	41	90,2

Leyenda: (a): Títulos de 1:2 o más altos.



F = Frecuencia. T de A = Título de anticuerpos.

Figura 2. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra el polisacárido del grupo C (N = 31).

*Goldschneider et al.*⁷ encontraron que los títulos de anticuerpos contra los polisacáridos meningocócicos disminuyen rápidamente después del nacimiento cuando desaparecen los anticuerpos recibidos de la madre y comienzan a crecer linealmente a partir de los 2 años de edad. En convalecientes de infección meningocócica causada por cepas del serogrupo B, se vió que la respuesta de producción de anticuerpos contra el polisacárido fue más pobre y menos frecuente en los niños que en los adultos.¹⁷

Los valores de unidades de IgG anti AST 15 fueron más altos en la muestra de los convalecientes que en la muestra de los testigos, aproximadamente 34 veces. En los convalecientes los valores más bajos se encontraron en los niños de menor edad (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones de anticuerpo anti AST 15 en una muestra de convalecientes clase de inmunoglobulinas.

	Testigos	Convalecientes	Convalecientes menores de 2 años	Convalecientes más de 6 años
Medias	791	2 658	1 725	5 681
No. de individuos	38	42	12	12

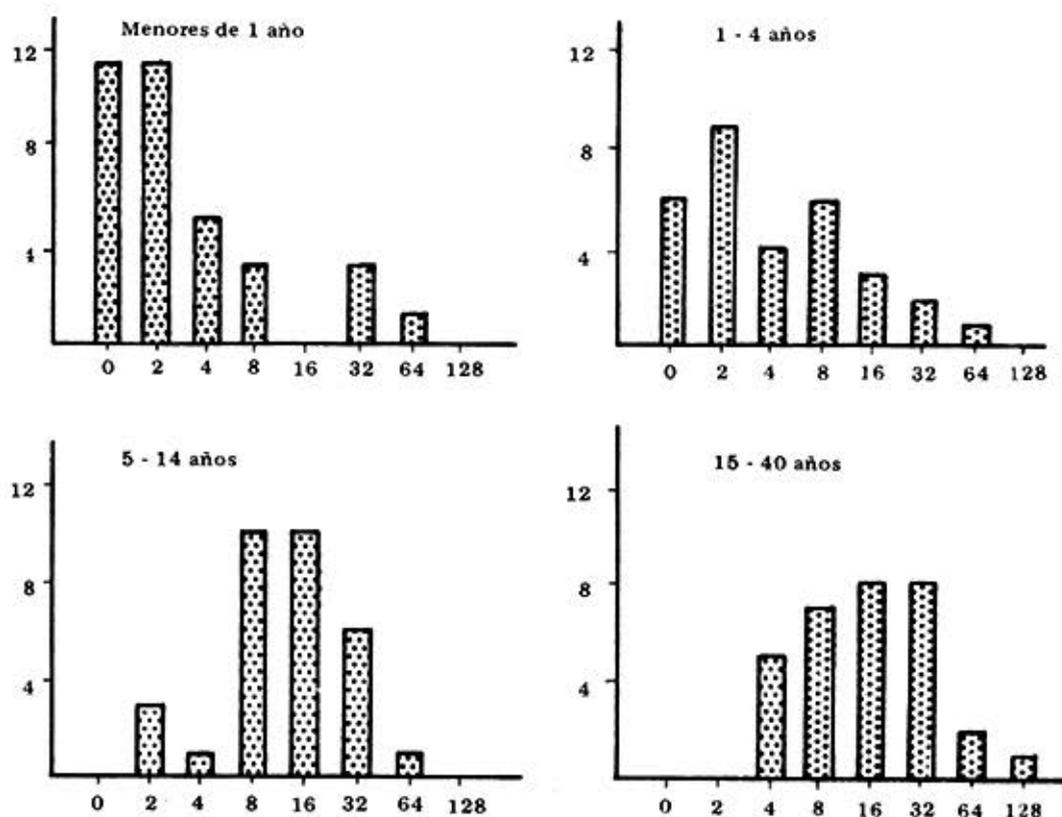


Figura 3. Frecuencia de los títulos de anticuerpos contra el polisacárido B en los convalecientes según la edad.

Estas diferencias resultaron estadísticamente significativas. Las mayores concentraciones de anticuerpos contra el antígeno de tipo 15 encontradas en los convalecientes concuerdan con los resultados de la serotipificación del Laboratorio Nacional de Referencia: durante el período en que el grupo estudiado contrajo la enfermedad el 90 % de las cepas del grupo B recibidas, que fueron sometidas a serotipificación por difusión en gel de Agar, fueron clasificadas como tipo 15. Como está demostrado que los anticuerpos con actividad bactericida para los meningococos del grupo B están dirigidos contra los antígenos de serotipo de la membrana externa y pertenecen a la clase de inmunoglobulinas IgG^{3,11,16} podemos suponer que en el grupo de convalecientes estudiados el nivel de protección contra los meningococos del serotipo 15 habrá aumentado como consecuencia de la infección padecida. Cuando se correlacionó el título de anticuerpos contra el polisacárido B y el número de unidades de IgG anti AST 15 con el tiempo de convalecencia se obtuvieron los siguientes resultados:

- a) No se apreciaron variaciones significativas en los títulos de antipolisacárido B entre 1 y 15 meses (tabla 4).

Tabla 4. *Anticuerpos contra el polisacárido μ según el tiempo de convalecencia*

Tiempo en meses	Medidas de los títulos	
	6 - 40 años (N = 14)	0 - 40 años (N = 29)
1 - 3	9,0	12,5
3 - 6	11,4	16,7
6 - 9	11,1	12,6
9 - 15	11,7	16,1

- b) La concentración de anticuerpos contra el AST 15, al considerar solamente a los convalecientes de más de 2 años, tampoco mostró variaciones significativas (tabla 5).

Tabla 5. *Concentración de anticuerpos IgG anti AST 15 según el tiempo de convalecencia*

Tiempo en meses	Número de individuos	Medias de las unidades
1 - 5	12	4 052
5 - 9	11	2 749
9 - 15	13	5 340

- c) En la literatura se recogen pocos casos de repetición de infección meningocócica en un mismo individuo y en estos casos se ha demostrado una mayor frecuencia de deficiencias de los componentes del complemento que en el resto de las personas.^{19,20}
- d) Durante la infección meningocócica sistémica los antígenos del microorganismo se ponen en contacto con el sistema inmunitario durante un tiempo prolongado y en dosis suficientes para inducir una respuesta capaz de proteger al individuo durante un largo período o por toda la vida.

CONCLUSIONES

1. Se encontró que las concentraciones de anticuerpos circulantes contra el polisacárido B y contra el AST 15 fueron significativamente más altas en el grupo de los convalecientes que en el grupo de los testigos, debido a que la mayoría de ellos estuvieron afectados por cepas de meningococos B 15.
2. Los títulos de anticuerpos contra el polisacárido B se mantuvieron con valores similares, al menos durante los primeros 15 meses después de contraída la enfermedad.
3. Se observó un crecimiento en las concentraciones de anticuerpos contra los polisacáridos A, B y C con el aumento de la edad de las personas.

SUMMARY

Pauste Ruiz, H. et al : *Immunity to meningococcus. Study of a group of convalescents.*

Antibody titer against group B meningococcal capsular polysaccharide was measured in serum samples of 158 convalescents from meningococcal disease and of 158 controls. Antibody titers, measured by

passive hemagglutination, were significantly higher in convalescents than in controls. IgG antibody concentration against serotype 15 antigen, determined by enzyme immunoassay, in a sample of convalescents and controls was also significantly higher in convalescents. There was not difference in antibody titers against A and C polysaccharides. These results agree with the typing of most of the meningococcal strains isolated in the country during this period, as corresponding to serogroup B and serotype 15

RÉSUMÉ

Pauste Ruiz, H. et al.: *Immunité au méningocoque. Etude d'un groupe de malades convalescents.*

On a fait le dosage des anticorps contre le polysaccharide capsulaire méningococcique groupe B sur des échantillons de sérum de 158 sujets convalescents de maladie méningococcique et de 158 témoins. Chez les convalescents les titres d'anticorps, mesurés par hémagglutination passive, ont été significativement plus élevés que chez les témoins. La concentration d'anticorps IgG contre l'antigène de sérotype 15, déterminée par analyse immuno-enzymatique sur un échantillon de convalescents et de témoins, a également été significativement supérieure chez les convalescents. Il n'y a pas eu de différences en ce qui concerne les titres d'anticorps contre les polysaccharides A et C. Ces résultats concordent avec la classification de la plupart des souches de méningocoques isolées dans le pays pendant cette période comme appartenant au sérotype B et au sérotype 15.

BIBLIOGRAFIA

1. Sippel, J. E.: Meningococci. *CRC Crit Rev Microbiol* 8: 267, 1981.
2. Zollinger W. D. et al.: Human antibody response to three meningococcal outer membrane antigens: comparison by specific hemagglutination assays. *Infect Immun* 10: 975, 1974.
3. Frasch, C. E.: Role of protein serotype antigens in protection against disease due to *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 136: 584, 1977.
4. Poolman, J. T. et al.: Immunogenicity of meningococcal antigens as detected in patient sera. *Infect Immun* 40: 398, 1983.
5. Zollinger W. D.; R. E. Mandrell: Outer-membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of *Neisseria meningitidis* by inhibition of a solid-phase radioimmunoassay. *Infect Immun* 18: 424, 1977.
6. Frasch, C. E.: Noncapsular surface antigens of *Neisseria meningitidis*. *Seminar in Infectious Disease*. Vol. II. L. Weinter and B. N. Fields, New York, 1979. P. 304.
7. Goldschneider, I. et al.: Human Immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 129: 1307, 1969.
8. Hoff, G. E.; N. Heiby: Recipitating antibodies against *Neisseria meningitidis* in normal sera and their possible origin. *Acta Pathol Microbiol Scand (C)* 86: 123, 1978.
9. Hoff, G. E.; N. Heiby: Cross-reactions between *Neisseria meningitidis* and twenty-seven other bacterial species. *Acta Pathol Microbiol Scand (B)* 86: 87, 1978.
10. Frasch, C. E. et al.: Protection against group B meningococcal disease I. Comparison of group-specific and type-specific protection in the chick embryo model. *J Exp Med* 144: 316, 1976.
11. Kasper, D. L. et al.: Antigenic specificity of bacterial antibodies in antisera to *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 127: 378, 1973.
12. OMS: Comités de expertos de la OMS en patrones biológicos. Normas para la vacuna de polisacáridos meningocócicos. 27^o Informes; series de informes técnicos 594. Organización Mundial de la Salud. Ginebra, 1976.
13. Frasch, C. E.; E. C. Gotschlich: An outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* group B responsible for serotype specificity *J Exp Med* 140: 87, 1974.
14. Artenstein, M. S. et al.: Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharide vaccination *J Infect Dis* 124: 277, 1971.
15. Goldschneider, I. et al.: Immunogenicity of group A and group C meningococcal polysaccharides in human infants. *J Infect Dis* 128: 769, 1973.
16. Gold, E.: Immunogenicity of meningococcal polysaccharide in man. *Immunology of Bacterial Polysaccharides*. J. A. Rudbach and P. J. Baker, Elsevier North-Holland, 1979. P. 121.

17. *Griffiss, J. M. et al.*: Immune response of infants and children to disseminated infection with *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 150: 71, 1984.
18. *Skevakis, L. et al.*: Class-specific human bactericidal antibodies to capsular and noncapsular surface antigens of *Neisseria meningitidis*. *J Infect Dis* 149: 387, 1984.
19. *Merino, J. et al.*: Prevalence of defects of complement components in patients with recurrent meningococcal infections. *J Infect Dis* 148: 331, 1983.
20. *Lambert, H. P. et al.*: Absence of the seventh complement component (C7) in a patient with recurrent meningococcal meningitis. *J Infect Dis* 1: 191, 1979.

Recibido: 15 de agosto de 1986. Aprobado: 20 de septiembre de 1986.

Dr. *Hilda Pauste Ruiz*. Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CENIC). Ave. 25 No. 158, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.