

Patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en meningoencefalitis infecciosas pediátricas

Alberto Juan Dorta-Contreras

Laboratorio Central de Líquido Cefalorraquídeo (LABCEL)
Apartado Postal 10 049, CP 11 000, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: adorta@infomed.sld.cu

RESUMEN

Los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas forman parte de la respuesta inmune en el sistema nervioso central (SNC). Demostrar que la edad del paciente, las características del agente biológico y las condiciones epidemiológicas modulan los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas (IgG). Como objetivo general, en este estudio se describen los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en meningoencefalitis provocadas por bacterias, virus y parásitos en niños. El objetivo específico es describir el patrón de síntesis intratecal de inmunoglobulinas y subclases de IgG en niños con meningoencefalitis eosinofílicas por *Angiostrongylus cantonensis*, el patrón de respuesta inmune intratecal y el funcionamiento de la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo en niños con meningoencefalitis por *Neisseria meningitidis*, Echovirus 4, 6, 9, 16 y Coxsackie A₉ y B₅, así como proponer nuevas aplicaciones y modificaciones al reibergrama. Se demuestra que los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas son típicos para cada afección estudiada. Estos patrones aparecen en los niños antes que en los adultos con iguales enfermedades. Se observan variaciones en algunas infecciones virales en periodos epidémicos que las diferencian de los periodos interepidémicos. El reibergrama permite caracterizar las epidemias, porque su patrón de síntesis intratecal es particular y la diferencia de otras. El reibergrama se adecua para las subclases, especialmente novedoso para la IgG₃. Por primera vez se reportan los patrones de síntesis intratecal para estas enfermedades infecciosas en niños. El nuevo uso del reibergrama y la evaluación las subclases de IgG, abren nuevas perspectivas para la neuroinmunología en general y para la neuroinmunología pediátrica y tropical en particular.

Introducción

La neuroinmunología como ciencia, derivada de sus ciencias matrices, la neurología y la inmunología, tiene su inicio en las últimas décadas del siglo xx.

Para evidenciar lo que sucede en el cerebro a nivel molecular, se ha recurrido al estudio del líquido cefalorraquídeo (LCR), para así llegar a un diagnóstico, junto con el empleo de las técnicas imagenológicas [1, 2]. Sin embargo, no existían estudios sobre la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en niños con enfermedades transmisibles, que ocasionan epidemias de forma sistemática, lo cual constituye un problema de salud mundial y para Cuba en particular.

Los estudios sobre síntesis intratecal de inmunoglobulinas se realizaban en pacientes adultos y, en general, no se vinculaban con epidemias [3-5], sino que se sobreentendía que existía un patrón uniforme para las meningoencefalitis virales, excepto para las herpéticas [6, 7].

La hipótesis que se planteó fue que la edad del paciente, las características del agente biológico y las condiciones epidemiológicas modulan los patrones de síntesis intratecal de las inmunoglobulinas. Para comprobarla, fue necesario modificar el reibergrama para poder evaluar la síntesis intratecal de la IgG₃ y encontrar el valor epidemiológico de los patrones aportados por este.

Materiales y métodos

Se estudiaron niños con meningoencefalitis ocasionada por *Angiostrongylus cantonensis*, *Neisseria meningitidis*, Echovirus 4, 6, 9, y 16 y los Coxsackie A₉ y B₅, en condiciones epidémicas y/o no epidémicas. El número de pacientes sometidos al estudio en condiciones epidémicas fueron: 84

pacientes (Echovirus 4, en 1985), 43 pacientes (Echovirus 6, en 1995), 48 pacientes (Coxsackie B5, en 1994), 31 pacientes (Coxsackie A9, entre 1993 y 1994), 23 pacientes (Echovirus 9, en 1999) y 18 pacientes (Echovirus 16, en 2000).

A estos pacientes se les tomaron muestras de suero y de LCR, para su uso en el diagnóstico y se cuantificaron IgA, IgM, IgG y albúmina por nefelometría o por inmunodifusión radial en ambos líquidos biológicos. Las subclases de IgG se cuantificaron por inmunodifusión radial.

Como la masa molecular de IgG₃ es mayor y su estructura molecular la hace diferente de la IgG₁, IgG₂ e IgG₄, se modificó el reibergrama correspondiente. Se realizó un reibergrama general para cada agente biológico, en condiciones epidémicas y fuera de epidemias.

Resultados

Se describieron los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas, los cuales eran mayores en las meningoencefalitis estudiadas, de causa diversa en niños que procedían de una misma área geográfica de la Ciudad de La Habana (Tabla 1).

Además, por primera vez se reportaron los patrones de síntesis intratecal de una enfermedad del sistema nervioso central, ocasionada por un parásito: la meningoencefalitis eosinofílica por *Angiostrongylus cantonensis* (figuras 1 y 2).

En la primera punción lumbar no hubo síntesis intratecal de inmunoglobulinas y hubo disfunción de la barrera sangre-LCR. Los patrones de síntesis de las inmunoglobulinas mayores en el líquido cefalorraquídeo, se obtuvieron en la segunda punción lumbar y fueron

1. Reiber H, Sindic CJM, Thompson EJ. Cerebrospinal fluid-clinical neurochemistry of neurological diseases. Heidelberg: Springer, 2004:1-356.

2. Csepány T, Bereczki D, Kollar J, Sikuka J, Kiss E, Csiba L. MRI findings in central nervous system lupus erythematosus are associated with immunoserological parameters and hypertension. *J Neurol* 2003;250:1138-54.

3. Reiber H. Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics. *Restor Neurol Neurosci* 2003;21:79-96.

4. Reiber H, Thompson EJ, Grimsley G, Bernardi G, Adam P, Monteiro de Almeida S, Fredman P, Keir G, Lammers M, Liblaur R, Menna-Barreto M, Sa MJ, Seres E, Sindic CJ, Teelken A, Trendelenburg C, Trojano M, Van Antwerpen MP, Verbeek MM. Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:331-7.

5. Reiber H, Otto M, Trendelenburg C, Wormek A. Reporting cerebrospinal fluid data: knowledge base and interpretation software. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:324-32.

6. Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001;184:101-22.

7. Felgenhauer K. Laboratory diagnosis of neurological diseases. En: Thomas L (editor). *Clinical Laboratory Diagnostics*. Frankfurt/Main: TH Books 1998:1308-26.

Tabla 1. Patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas (primera punción)

Agente biológico	Patrones de síntesis epidémico (frecuencia)	Patrones de síntesis Interepidémico (frecuencia)
Echo 4	IgA+IgM+IgG (74/84) IgA+IgG (10/84)	IgA+IgM+IgG(7/8) IgAS+IgG(1/8)
Echo 6	IgG (42/43) IgA+IgG (1/43)	IgA+IgM+IgG (3/10) IgA+IgG (7/10)
Echo 9	Sin síntesis (15/23) IgM (6/23) IgA+IgM (2/23)	-
Echo 16	Sin síntesis (16/18) IgA+IgM (2/18)	-
Coxsackie A9	IgM(5/31) IgG (2/31) IgA+IgM(2/31)IgG+IgM (1/31)sin síntesis (20/31)	IgA+IgM+IgG (7/10) IgA+IgG (2/10) IgG (1/10)
Coxsackie B5	IgA+IgM+IgG(14/48) IgA+IgM (5/48) IgM+IgG (2/48) IgG (17/48) Sin síntesis (10/48)	IgA+IgM+IgG (6/8) IgA+IgG (1/8) IgG(1/8)
Neisseria meningitidis	-	IgA+IgM+IgG (9/26) IgA+IgG (12/26) IgA (2/26) Sin síntesis (3/26)
Angiostrongylus cantonensis	-	Sin síntesis (0/24) Sin síntesis (0/10)

de las tres clases de inmunoglobulinas o de IgA + IgG. La síntesis intratecal de subclases tuvo un patrón IgG₁ + IgG₂.

Los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en meningoencefalitis virales no son iguales entre sí. Estos pueden variar para un mismo virus en condiciones epidémicas y no epidémicas.

Es preciso destacar que estos resultados describen los patrones de síntesis intratecal en pacientes con meningoencefalitis virales por Echovirus 4 y 6 y Coxsackie A₉ y B₅, los cuales no se conocían.

El patrón en los pacientes adultos con meningoencefalitis por *Neisseria meningitidis* depende de la IgA, pero en los niños ocurre desde la primera punción diagnóstica. Desde la primera punción lumbar en los niños afectados con meningoencefalitis bacterianas y virales, se observó la aparición del patrón de síntesis intratecal de inmunoglobulinas.

El reibergrama posee también un valor epidemiológico, ya que los cambios en las frecuencias de los patrones de síntesis o los patrones de síntesis que sean diferentes, pudieran estar relacionados con cambios estructurales y distintas manifestaciones clínicas de las meningoencefalitis virales.

Aun cuando desde el punto de vista cualitativo el patrón de síntesis fue el mismo en la epidemia de Echovirus 4 y en situación no epidémica, y no así para el resto de los virus estudiados (Figura 3), se procedió al análisis de las frecuencias del patrón de tres clases, dos clases y una clase sin tomar en cuenta la inmunoglobulina involucrada.

Se evidenció que no existían diferencias en cuanto a las frecuencias en situaciones epidémicas y no epidémicas, lo que subraya la importancia del aspecto cualitativo con respecto a la clase de inmunoglobulina involucrada. Se reafirmó que el patrón de síntesis en los virus que afectaron a la población estudiada fue diferente en situaciones

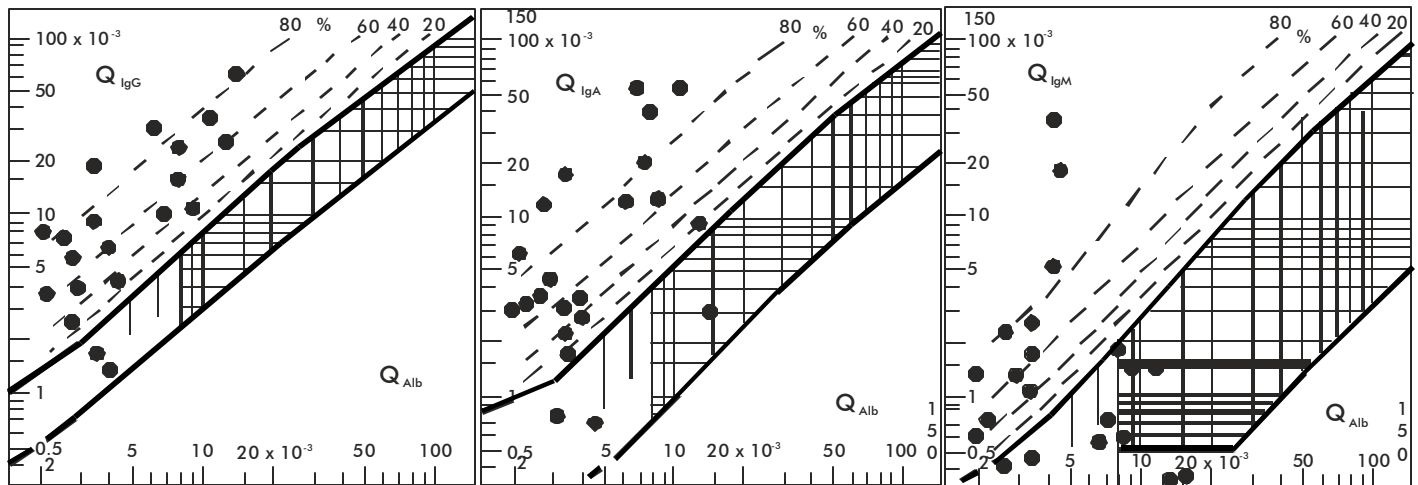


Figura 1. Reibergrama de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en pacientes con meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis*. Cuando la razón Q Ig se encuentra por encima de la curva hiperbólica más fuerte, hay síntesis intratecal de esta proteína. Hay un predominio de síntesis intratecal de IgG e IgA.

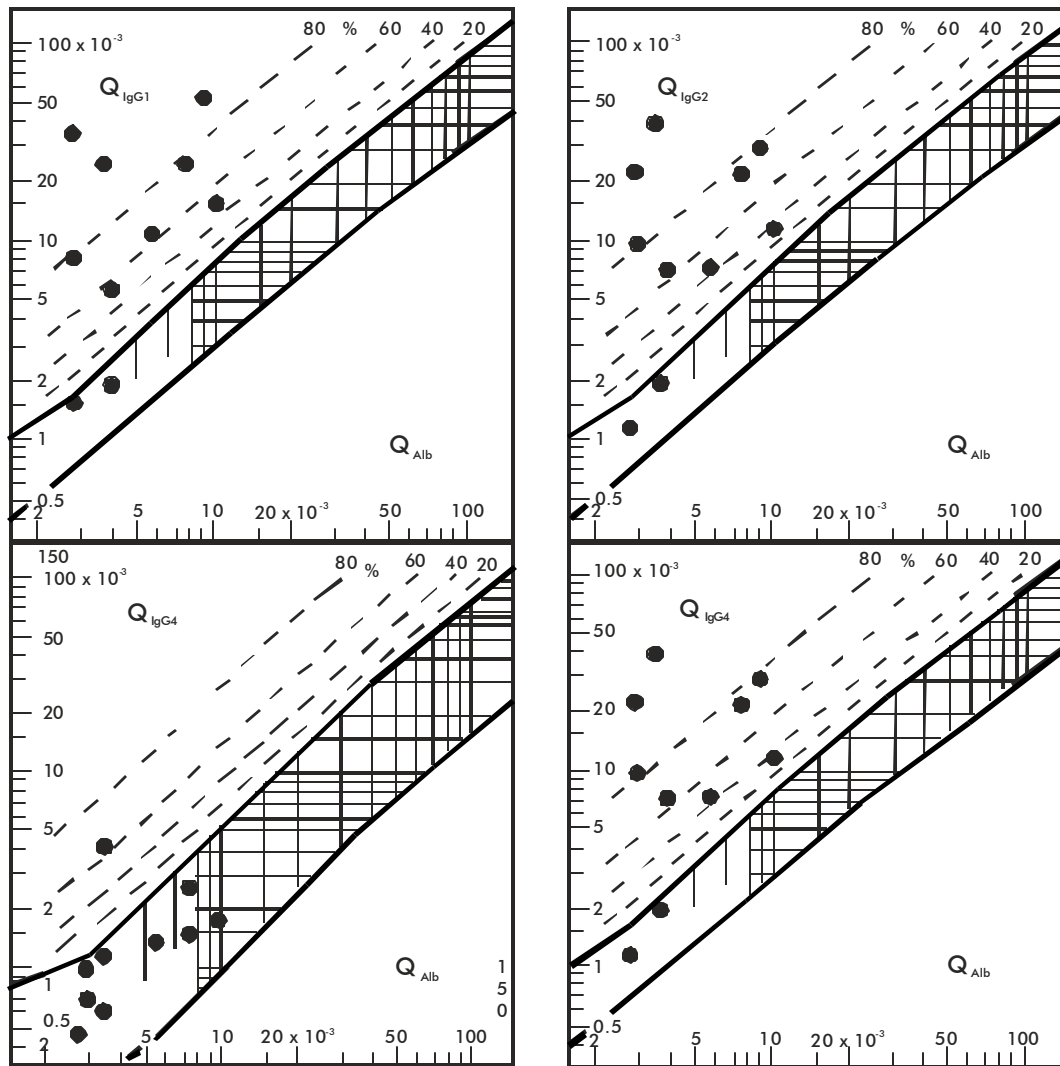


Figura 2. Reibergrama para la síntesis intratecal de subclases de IgG en pacientes con *Angiostrongylus cantonensis*. Existe un patrón predominante de IgG₁ + IgG₂.

epidémicas y no epidémicas. Esto se comprobó cuando se aplicó el estadígrafo chi cuadrado y el coeficiente f , y cuando se usó la razón de momios o de ventaja.

Uno de los resultados metodológicos que nos permitió avanzar más en la caracterización de los patrones de síntesis intratecal fue la adecuación del reibergrama para la IgG₃, pues las características moleculares de esta subclase requería de un reibergrama distinto al de la IgG.

Al tratarse de una nueva fórmula para el cálculo de la IgG₃ local, se procedió a su comparación con las fórmulas utilizadas antes para los mismos propósitos.

Se observó que en los pacientes con meningoencefalitis viral por Echovirus 6, a partir de los cuales se confeccionaron las curvas, existe identidad entre el índice de Link, el reibergrama de IgG₃ y el nuevo reibergrama propuesto. Esto junto con las ventajas biológicas del nuevo reibergrama, apoyado en sus características moleculares y sobre la base de la teoría de difusión molecular/flujo del LCR, hizo considerar el reibergrama propuesto como el mejor.

Discusión

Los resultados parciales de esta tesis se publicaron en nueve artículos en revistas internacionales de impacto, y se incluyeron en el Index Medicus/Medline en los últimos 5 años [8-16] y los anexos [17-20].

Los resultados, novedosos y originales de esta investigación en Cuba y a escala mundial son:

1. Describir los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas y de las subclases de IgG en una enfermedad parasitaria.

2. Evidenciar que los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en pacientes con meningoencefalitis virales no son iguales entre sí, pueden, incluso, variar para un mismo virus en condiciones epidémicas, en relación con el patrón encontrado en pacientes fuera de epidemias.

3. Describir los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en pacientes con meningoencefalitis virales por Echovirus 4, 6, 9 y 16 y por virus de Coxsackie A₉ y B₅.

8. Dorta Contreras AJ, Reiber H. Intrathecal synthesis of immunoglobulins in eosinophilic meningoencephalitis due to *Angiostrongylus cantonensis*. Clin Diagn Lab Immunol 1998;5:452-5.

9. Dorta Contreras AJ. Intrathecal synthesis of immunoglobulins in *Neisseria meningitidis* and echovirus 6 meningoencephalitis. J Mol Neurosci 1999;12:81-7.

10. Dorta Contreras AJ, Agüero Valdés E, Escobar Pérez X, Noris García E, Ferrá Valdés M. Respuesta inmune humoral intratecal en pacientes pediátricos con meningoencefalitis por Coxsackie B₃. Rev Neurol 1999;28:739-41

11. Dorta Contreras AJ, Reiber H, Lewczuk P, Noris García E, Noris García E, Escobar Pérez X, Bu Coifú Fanego R, Interina Morales MT. Patrones de síntesis de inmunoglobulinas en pacientes pediátricos con meningoencefalitis por Coxsackie A₉ durante la epidemia de neuropatía en Cuba. Rev Neurol 2000; 30:716-8.

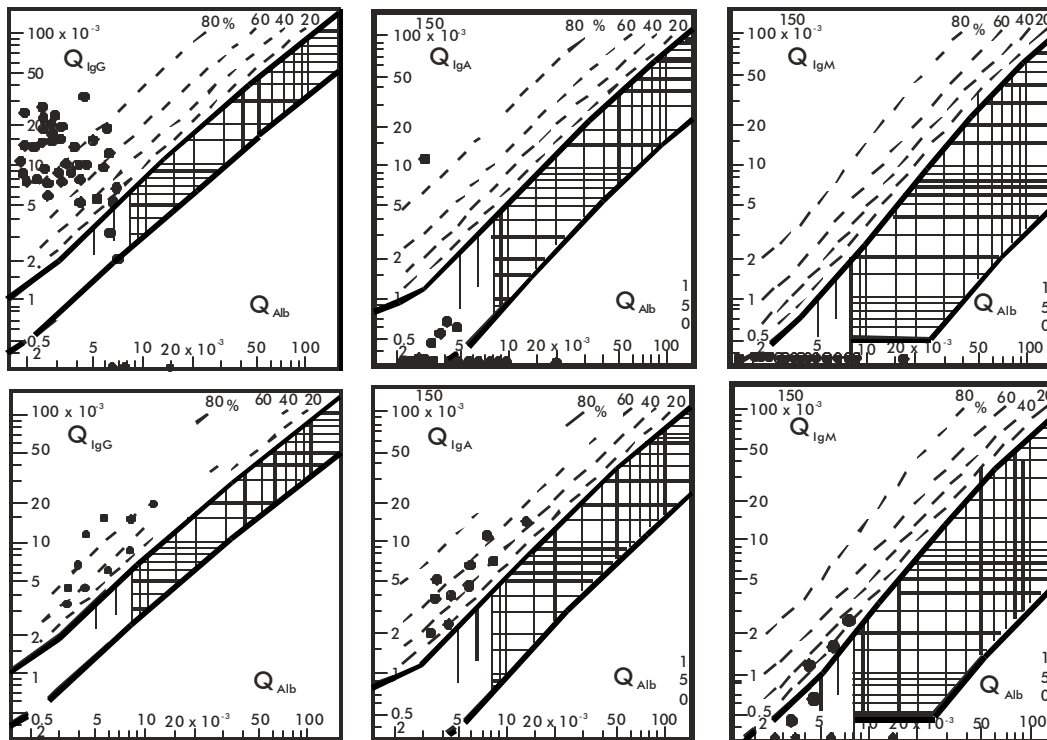


Figura 3. Reibergramas a partir de la epidemia de meningoencefalitis por Echovirus 6 (a) y en situaciones no epidémicas. Observe que en el reibergrama de la epidemia predomina la síntesis intratecal de IgG; solo un paciente sintetizó IgA y ninguno IgM; por tanto el otro reibergrama exhibe unos patrones de síntesis diferentes.

4. Probar que la síntesis intratecal de inmunoglobulinas en niños con meningoencefalitis virales y bacterianas se evidencia en la primera punción diagnóstica.

5. Agregar a sus otras aplicaciones, el valor epidemiológico del reibergrama, que relaciona el cambio del patrón de síntesis intratecal de inmunoglobulinas con las mutaciones estructurales y las modificaciones del comportamiento clínico en pacientes con meningoencefalitis virales.

6. Realizar adecuaciones al reibergrama para detectar con mayor precisión la síntesis intratecal de IgG₃.

A diferencia de otros líquidos biológicos, el estudio del líquido cefalorraquídeo comienza en 1891 con la primera punción lumbar, realizada por Quincke, con fines diagnósticos y terapéuticos.

Los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas son las inmunoglobulinas fabricadas en el sistema nervioso central, a partir de clones de linfocitos B activados que, en su maduración, dan lugar a células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas. Estas últimas se detectan por estar en exceso en el LCR.

El reibergrama tiene valor clínico porque brinda elementos que contribuyen al diagnóstico de las enfermedades neurológicas. Ofrece información simultánea sobre la barrera sangre-LCR, de acuerdo con la edad del paciente: permite conocer si hay síntesis intratecal de inmunoglobulinas y qué parte del total de estas proteínas del LCR se han sintetizado en el sistema nervioso central, que es la fracción intratecal. El patrón de síntesis es típico de las enfermedades y puede contribuir a su diagnóstico.

Junto con otras pruebas clínicas y otros datos que suministre el médico, el patrón de síntesis intratecal puede usarse para descartar un grupo de enfermedades. Se podrá llegar a conocer la causa de la enfermedad por el índice de anticuerpo o llegar a la caracterización temprana de un proceso inflamatorio crónico como la esclerosis múltiple. Se puede evaluar la eficacia de terapias y conocer el curso orgánico cerebral de enfermedades psiquiátricas, entre otros usos.

También el reibergrama puede aportar conocimientos básicos y teóricos que contribuyan a la fisiopatología de las enfermedades neurológicas.

La meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis* (Chen, 1935), se detectó en Cuba por primera vez en 1981, y en 1998 se pudo estudiar, el patrón de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en niños infectados [8]. Por primera vez en la literatura científica quedó reportado el patrón para una enfermedad parasitaria que afecta el sistema nervioso central.

Después de publicado el trabajo sobre *A. cantonensis*, se iniciaron los estudios de los patrones de síntesis intratecal en la tripanosomiasis africana [21, 22]. Se describen los patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en pacientes con *Neisseria meningitidis*, serogrupo B, germen que provocó epidemias de meningoencefalitis hasta que Cuba desarrolló la vacuna, única de su tipo en el mundo hasta el momento [23-25].

El patrón de síntesis involucra de forma importante a la IgA. La función de esta inmunoglobulina en los patrones de síntesis intratecal se justifica porque la IgA₁ inicia el proceso de la lisis de esta bacteria [26-

12. Dorta Contreras AJ. Reibergrama como herramienta epidemiológica: nuevo enfoque. *Rev Neurol* 2001;33:36-40.

13. Dorta Contreras AJ. Nuevo reibergrama para la evaluación de la síntesis intratecal de IgG₃. *Rev Neurol* 2001;33:694-6.

14. Dorta Contreras AJ, Reiber H, Magraner Tarrau ME, Wessbrich B, Interina Morales MT, Noris García E, Escobar Pérez X, González Hernández T. Valor neuroinmunoepidemiológico del reibergrama en la primera epidemia de meningoencefalitis a Echovirus 16 en Cuba. *Rev Neurol* 2002;35:517-20.

15. Dorta Contreras AJ, Reiber H, Magraner Tarrau ME, Weidbrich B, Interina Morales MT, Noris García E, Escobar Pérez X, González Mujica IO. Patrones de síntesis intratecal de inmunoglobulinas en epidemia de meningoencefalitis a Echovirus 9. *Rev Neurol* 2002;35:904-7.

16. Dorta Contreras AJ, Noris García E, Escobar Pérez X, Dueñas Flores A, Mena López E. Patrones de síntesis de subclases de IgG en meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis*. *Rev Neurol* 2003;36:506-9.

17. Dorta Contreras AJ, Reiber H. Teoría de la difusión molecular/flujo del líquido cefalorraquídeo. *Rev Neurol* 2004;39:564-9.

18. Dorta Contreras AJ. Reibergramas: elemento esencial en el análisis del líquido cefalorraquídeo. *Rev Neurol* 1999;28:996-8.

19. Dorta Contreras AJ. Dinámica de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas. *Rev Neurol* 2000;31:991-3.

28]. Este patrón, que es el mismo del adulto en composición pero no en tiempo, ya se había reportado [29]. Se detectó en la primera punción lumbar diagnóstica, al igual que en el resto de los niños evaluados, lo que constituye un hallazgo, ya que en la literatura se reporta que en general, al inicio de los síntomas no se observa síntesis intratecal, pero siempre se han referido a infecciones en los adultos [30].

El número de células normales que se encuentran en el líquido cefalorraquídeo de los niños es $20 \text{ células}/10^6 \text{ L}$ y en los adultos es $5 \text{ células}/10^6$ [29]. En la literatura se suele encontrar la justificación de que en los niños el sistema de barreras está inmaduro y, por tanto, esto permite el paso menos restringido de células y moléculas [31]. Sin embargo, la teoría de la difusión molecular/velocidad de flujo del LCR plantea que, desde la etapa prenatal, las barreras están plenamente definidas.

Esta entrada de células al espacio subaracnoideo, procedentes del torrente sanguíneo, se debe a que hay menor longitud o trayectoria efectiva desde el comportamiento sanguíneo hacia el espacio subaracnoideo. La entrada se mantiene y se incrementa en los procesos inflamatorios infecciosos. Por ello, en el niño, la entrada de un número mayor de linfocitos B activados en menor tiempo, permite una síntesis intratecal de inmunoglobulinas más temprana que la observada en el adulto. Además, en el niño ocurre con una velocidad de flujo del LCR menor, sobre todo en las edades más tempranas, en que poseen una Q albúmina muy elevada, y es particularmente notable la incidencia de infecciones bacterianas y virales en el sistema nervioso central.

De acuerdo con la teoría que apoya esta investigación, una Q albúmina elevada significa una velocidad de flujo del LCR menor y un aumento de moléculas (y de células) que pasan de la sangre al LCR [17].

En la literatura que trata sobre el estudio de los patrones de síntesis de inmunoglobulinas en meningoencefalitis virales [29], se aprecia un tratamiento uniforme de estas con excepción de las producidas por el virus de la parotiditis y las herpéticas. Sin embargo, existe un resultado diferente para cada agente viral mediante un patrón de síntesis intratecal típico, lo cual depende de la respuesta inmune, ya que son distintos inmunógenos.

Los patrones de síntesis intratecal en meningoencefalitis virales provocadas por los Echovirus 4, 6, 9 y 16 y Coxsackie B₅ y A₉ en períodos epidémicos e interepidémicos, reflejan particularidades en la respuesta inmune, que tienen su correspondencia con el cuadro clínico en estas epidemias. De ahí la utilidad del reibergrama en el estudio de las distintas epidemias. Cada una deja su impronta, su huella en el reibergrama, que se traduce en su propio patrón, el cual, en ocasiones, se diferencia del patrón en condiciones interepidémicas.

A partir de estudios recientes se ha comprobado que un enterovirus, en particular el Coxsackie, puede sufrir transformaciones en su estructura al pasar por

un receptor con estrés [32, 33]; entre otras causas, por la ausencia de micronutrientes. Esto origina distintas cepas de virus modificados.

En poblaciones con déficit nutricional o no, estos virus pueden ocasionar enfermedades distintas a las que provocaban antes de su modificación estructural, aunque en los estudios de rutina desde el punto de vista taxonómico, se clasifiquen de igual manera. Este parece ser el caso de, al menos, uno de los virus estudiados: Coxsackie A₉, fenómeno que comprobaron otros autores [34-36] en estudios secuenciales.

El valor del reibergrama como herramienta epidemiológica, se apoya en la experiencia del estudio neuroinmunológico, a lo largo de más de 15 años, en una misma población de Ciudad de La Habana, que es atendida en el Hospital Pediátrico de San Miguel del Padrón.

El patrón de síntesis que se encuentra en los enfermos durante la epidemia le corresponde a esa población afectada y, por tanto, es reflejo de las múltiples interacciones que se producen en el proceso salud-enfermedad.

Este valor agregado que posee el reibergrama, se debe a las fortalezas que exhibe el sistema de salud cubano, su organización y centralización, el cual garantiza, en primer lugar, que el paciente reciba atención médica especializada desde los primeros síntomas y no haya demora en su diagnóstico y tratamiento. A la vez, permite una colección de información confiable y sistemática [12].

Además del acercamiento epidemiológico del reibergrama, se profundizó en el estudio de su empleo para la cuantificación de la síntesis intratecal de las subclases de IgG. La IgG₃ tiene características moleculares que la distinguen del resto de las subclases de IgG. Su masa molecular es superior, por lo que la difusión molecular hacia el espacio aracnoideo es más lenta, de acuerdo con la primera ley de Fick ($J_i = -Dc/dx$). El coeficiente de difusión (D) depende de la masa molecular e influye en la velocidad de flujo del LCR (F).

El nuevo reibergrama para la IgG₃ resuelve los inconvenientes del reibergrama tradicional y permite calcular con más acierto y sobre bases reales, la fracción intratecal de esta subclase que se sintetiza en el sistema nervioso central [13].

El patrón de síntesis predominante en las meningoencefalitis por *Angiostrongylus cantonensis* del tipo IgG₁ + IgG₂ evidencia la complejidad antigénica de la respuesta inmune frente al parásito, ya que la IgG₁ es la responsable de la respuesta frente a antígenos de naturaleza proteica y polipeptídica, y la IgG₂ generalmente se encuentra dirigida a los antígenos de naturaleza polisacáridica. Esta respuesta combinada podría ser el reflejo del carácter autolimitado de esta enfermedad en los pacientes estudiados [16].

Estos hallazgos podrían contribuir, modestamente, al desarrollo de la Neuroinmunología en general, y, particularmente, a la Neuroinmunología pediátrica y tropical.

20. Dorta Contreras AJ. Respuesta inmune poliespecífica en el sistema nervioso central. Empleo del índice de anticuerpo. Rev Neurol 2000;31:1070-3.

21. Lejon V, Reiber H, Legros D, Djé N, Magnus E, Wouters I, Sindic CJM, Büscher P. Intrathecal immune response pattern for improved diagnosis of central nervous system invol-

vement in trypanosomiasis. J Infect Dis 2003;187:1475-83.

22. Bisser S, Lejon V, Proux PH, Bouteille B,

- Stanghellini A, Jauberteau MO, Buscher P, Dumas M. Blood-cerebrospinal fluid barrier and intrathecal immunoglobulin compared to field diagnosis of central nervous system involvement in sleeping sickness. *J Neurol Sci* 2002;193:127-35.
23. Sierra GVG, Campa HC, Valcarcel NM, García IC, Sotolongo PI, Izquierdo PL, Casanueva GV, Baró SM, Legram CP, Rodríguez CR, Terry MH. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*. Protection trial and mass vaccination. Results in Cuba. *NIPH Annals* 1991;14:195-210.
24. Instituto Finlay. Meningococcal disease and its prevention. Gutiérrez-López O, Puig-Fernández Y (editores). La Habana, Cuba, Ediciones Finlay; 1997:1-11.
25. De Moraes, Perkins BA, Camango MCC, Rossetto Hidalgo NT, Barbosa HA, Tavares Sacchi C, Land Gral IM, Gattas VL, Vasconcelas HC, Plikaytis BB, Wenger JD, Brooms CV. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 1992;340:1070-8.
26. Shlush LT, Behar DM, Zelazny A, Keller N, Lupski IR, Beaudet AL, Bercorich D. Molecular epidemiological analysis of the changing nature of a meningococcal outbreak following a vaccination campaign. *J Clin Microbiol* 2002;40: 3565-71.
27. Jarvis GA, Griffis JM. Human IgA₁ initiates complement mediated killing of *Neisseria meningitidis*. *J Immunol* 1989; 149:1703-9.
28. Dorta-Contreras AJ, Vázquez-Martínez M, Ferrá-Valdés M, Bu-Coifú-Fanego R, García-Imías L. Inmunidad intratecal anti *Neisseria meningitidis*. *Rev Esp Pediatr* 1995;51:245-52.
29. Felgenhauer K. Laboratory diagnosis of neurological diseases. In: Thomas L (editor). *Clinical Laboratory Diagnostics*. Frankfurt/Main: TH Books; 1998:1308-26.
30. Zetl UK, Lehmitz R, Mix E (editors). *Klinische liquor diagnostik*, Berlin: Walter de Gruyter; 2003:1-437
31. Herndon RM, Brumback RA (editors). *The Cerebrospinal Fluid*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1989:1-306
32. Beck MA, Levander OA. Effect of nutritional antioxidants and other constituents on coxsackievirus-induced myocarditis. *Curr Trop Microbiol Immunol* 1997;223:81-96.
33. Beck MA, Levander OA. Host nutritional status and its effect on a viral pathogen. *J Infect Dis* 2000;182(1):S93-6.
34. Beck MA. Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. *Ann J Clin Nutr* 2000;71(6):S1676-581.
35. De la Fuente J, Hidalgo Y, Ochagavía ME, Muzio V, Rodríguez MP. Analysis of enterovirus sequences recovered from the cerebrospinal fluid of patients with epidemic neuropathy. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:152-61.
36. Mas P, Pelegrino JL, Guzmán MG, Comellas MM, Resik S, Álvarez M, Rodríguez R, Mune M, Capo V, Balmaseda A, Rodríguez L, Rodríguez MP, Handy J, Kouri G, Llop A. Viral isolation from cases of epidemic neuropathy in Cuba. *Arch Pathol Lab Med* 1997;121:825-33.