

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**



**LAS BASES GENÉTICAS DE LA  
SUSCEPTIBILIDAD A LA ENFERMEDAD  
MENINGOCÓCICA**

**Nazareth Martín Torres**

**Departamento de Estadística, Universidad de Salamanca  
Salamanca, 2015**



# **LAS BASES GENÉTICAS DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA**

---

Memoria que para optar al grado de **Doctor**,  
por el Departamento de Estadística  
de la Universidad de Salamanca, presenta:

**Nazareth Martín Torres**

**Salamanca**

**2015**

## **FEDERICO MARTINÓN TORRES**

*Profesor Asociado de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, y acreditado como Profesor Titular por la ANECA*

## **ANTONIO SALAS ELLACURIAGA**

*Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela*

## **M<sup>a</sup> PURIFICACIÓN VICENTE GALINDO**

*Profesora Contratada Doctora del Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la Universidad de Salamanca*

---

**CERTIFICAN:** Que **D<sup>a</sup> Nazareth Martínón Torres** ha realizado, bajo su dirección, el trabajo que para optar al Grado de Doctor presenta con el título: "**Las bases genéticas de la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica**", y para que conste, firman el presente certificado en Salamanca, el 25 de mayo de 2015.



**Federico Martínón Torres**

**Antonio Salas Ellacuriaga**

**M<sup>a</sup> Purificación Vicente Galindo**





A Juan, por haberme encontrado y hecho perder la cuenta de los poemas y las flores.

A Nazareth, con quien tanto soñé de niña, 'joya de orfebre habilísimo', de alegría infinita y contagiosa.

A ti, que vienes en camino, impulsando esta Tesis al ritmo de sus/mis latidos. Hace tiempo que ya no me imagino la vida sin ti.



## AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos, aun cuando suenan largos en el discurso, suelen quedarse cortos.

A los que me dirigisteis en este proyecto, capaces de aglutinar en personalidades tan dispares y capaces, toda cuanta cualidad se me antoja discurrir: el Prof. Antonio Salas Ellacuriaga, simbiosis perfecta de conocimiento y humildad, y con quien comparto, además, lo inusual de ser el séptimo hijo de una familia numerosa; el Dr. Federico Martínón Torres, hermano mayor por antonomasia, en lo personal y en lo profesional, sencillamente sin techo; el Dr. José María Martínón Sánchez, ejemplo silencioso de bondad y trabajo desinteresados, y que siempre está ahí; y las Dras Purificación Vicente y Purificación Galindo, por la lección de apoyo incondicional y por su confianza en un paso tan importante para mi madurez científica. Muchas cosas os debo a todos. Gracias.

A mi padre, el Dr. Federico Martínón Sánchez, que no sólo me lo ha dado todo, incluida la vocación como Pediatra, sino que además es estímulo y baluarte permanente al que acudir, y fuente inagotable de la que recibir.

A mi madre, porque quienes la conocen saben que no existe nadie que se parezca a ella, mujer ejemplar, llena de gracia, absolutamente inimitable y capaz. A ningún molde me gustaría asemejarme tanto como al suyo.

A mi abuela Felisa, que no puede imaginarse lo mucho que participa en mi día a día, con tantísimas cosas (y expresiones) que de ella he aprendido y heredado. Y a mis abuelos Rafael, Duvi y Federico, las otras tres patas indispensables que erigieron este bastión familiar del que hoy me siento parte orgullosa.

A mis hermanos, para quienes las palabras no llegan. Teneros me hace sentir afortunada a cada momento, bajo el calor de un abrazo permanente que siempre me acompaña. Os quiero. Y os doy las gracias por aumentar este entramado de abrazos con cuñados y sobrinos que no hacen más que aumentar mi tesoro.

A Juan y Dolores, y a su vasta prole. No sólo por Juan, que es más que mucho, sino por vuestro cariño y vuestra ayuda, que han sido indispensables para esta Tesis y muchas otras empresas.

A Mateo, que es derroche de paciencia. A Marisa, que la echo de menos. A mis amigos de Orense y de Santiago, que me son fieles a pesar de los horarios imposibles. A los GENVIP. A todos os quiero mucho, y os doy las gracias.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>2. REVISIÓN DEL PROBLEMA</b> .....	9
<b>2.1. Enfermedad meningocócica</b> .....	9
<b>2.1.1. Definición de enfermedad meningocócica y terminología</b> .....	9
<b>2.1.2. Reseñas históricas</b> .....	10
<b>2.1.3. Epidemiología de la enfermedad meningocócica</b> .....	12
2.1.3.1. Visión global .....	12
2.1.3.1.1. África .....	13
2.1.3.1.2. Asia .....	14
2.1.3.1.3. Australia y Nueva Zelanda .....	14
2.1.3.1.4. América .....	15
2.1.3.1.5. Europa .....	16
2.1.3.2. Situación en España .....	16
<b>2.1.4. Características microbiológicas</b> .....	19
<b>2.1.5. Fisiopatología e historia natural de la enfermedad</b> .....	23
2.1.5.1. Adhesión e invasión de la mucosa nasofaríngea .....	24
2.1.5.2. Estado de portador nasofaríngeo .....	25
2.1.5.3. Enfermedad meningocócica invasiva .....	26
2.1.5.3.1. Enfermedad meningocócica invasiva: factores de riesgo .....	26
2.1.5.3.1.1. Factores del patógeno .....	27
2.1.5.3.1.2. Factores del huésped .....	28
2.1.5.3.1.3. Factores ambientales .....	30
2.1.5.3.2. Meningococemia y respuesta inflamatoria sistémica .....	32
2.1.5.3.2.1. Mediadores inflamatorios .....	32
2.1.5.3.2.2. Lesión endotelial y fuga capilar .....	38
2.1.5.3.2.3. Coagulación y fibrinólisis .....	39
2.1.5.3.2.4. Disfunción miocárdica .....	40
2.1.5.3.3. Meningitis .....	41
<b>2.1.6. Manifestaciones clínicas</b> .....	42
<b>2.1.7. Diagnóstico</b> .....	44
<b>2.1.8. Intervenciones terapéuticas</b> .....	46



2.2.2.1.2. Moléculas de adhesión .....	77
2.2.2.2. Variabilidad genética en la respuesta inmunológica innata del huésped .....	78
2.2.2.2.1. Receptores de tipo <i>Toll</i> .....	79
2.2.2.2.2. Sistema del complemento .....	80
2.2.2.2.3. Proteínas del surfactante .....	83
2.2.2.3. Variabilidad genética en la respuesta inmunológica adquirida del huésped ..	84
2.2.2.4. Control genético de la coagulación y <i>purpura fulminans</i> .....	85
2.2.2.4.1. Factor V .....	86
2.2.2.4.2. Activador tisular del plasminógeno (t-PA) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI) .....	86
2.2.2.4.3. Proteína C (PC) .....	87
2.2.2.4.4. Inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina (TAFI) .....	87
2.2.2.5. Importancia de la variabilidad genética en las citocinas .....	88
2.2.2.6. Otros determinantes genéticos de la enfermedad meningocócica .....	89
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>93</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>97</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>101</b>
<b>5.1. Metodología de laboratorio .....</b>	<b>101</b>
<b>5.2. Primera fase del estudio: UK-GWAS .....</b>	<b>102</b>
<b>5.2.1. Diseño del estudio .....</b>	<b>102</b>
<b>5.2.2. Participantes en el estudio .....</b>	<b>103</b>
5.2.2.1. Casos .....	103
5.2.2.1.1. Cohorte del UK-GWAS .....	104
5.2.2.1.2. Cohorte de replicación del Oeste de Europa .....	105
5.2.2.1.3. Cohorte de replicación ESIGEM-Spain .....	105
5.2.2.2. Controles .....	106
<b>5.2.3. Análisis de genotipado y control de calidad .....</b>	<b>106</b>
<b>5.2.4. Análisis estadístico .....</b>	<b>107</b>
<b>5.3. Segunda fase del estudio: ESIGEM-Spain GWAS .....</b>	<b>109</b>
<b>5.3.1. Diseño del estudio .....</b>	<b>109</b>
<b>5.3.2. Participantes en el estudio .....</b>	<b>110</b>
5.3.2.1. Casos .....	111
5.3.2.2. Controles .....	112

5.3.3. Análisis de genotipado y control de calidad .....	112
5.3.4. Análisis estadístico .....	113
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>117</b>
6.1. Primera fase del estudio: UK-GWAS .....	117
6.1.1. GWAS de Reino Unido .....	117
6.1.2. Primera replicación: replicación en la cohorte del Oeste de Europa .....	124
6.1.3. Segunda replicación: replicación en la cohorte de España .....	125
6.1.4. Mapeo e identificación de alelos de susceptibilidad .....	126
6.2. Segunda fase del estudio: ESIGEM-Spain GWAS .....	134
6.2.1. Análisis preliminar del genotipado de datos GWAS y análisis de ancestralidad .....	134
6.2.2. Metaanálisis de los GWAS de Reino Unido y España .....	136
6.2.3. Replicación en el Oeste de Europa .....	142
6.2.4. Imputación de los datos .....	143
<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>149</b>
7.1. Región <i>CFH</i> y susceptibilidad a enfermedad meningocócica .....	149
7.2. Una posible explicación para el "cinturón de la meningitis" africano .....	152
7.3. Enfoque traslacional de la asociación <i>CFH</i> y la susceptibilidad a enfermedad meningocócica: nueva generación de vacunas .....	153
7.4. Región <i>CFH</i> y susceptibilidad a otras enfermedades .....	154
7.5. Región <i>ABCA4</i> y susceptibilidad a enfermedad meningocócica .....	155
7.6. <i>Neisseria meningitidis</i> como potencial agente desencadenante de la enfermedad de Stargardt y de la degeneración macular senil en pacientes susceptibles .....	156
7.7. Acceso de <i>Neisseria meningitidis</i> al ojo .....	158
7.8. Enfermedad meningocócica y otras asociaciones genéticas .....	159
7.9. Limitaciones del estudio .....	159
7.10. Perspectivas futuras .....	161
<b>8. CONCLUSIONES .....</b>	<b>167</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>171</b>

<b>ANEXO I: La red ESIGEM .....</b>	<b>205</b>
<b>ANEXO II: Relación de publicaciones y actividades científicas más relevantes derivadas de la realización de la tesis doctoral y de sus resultados .....</b>	<b>233</b>



## RESUMEN

---

**Antecedentes:** La enfermedad meningocócica (EM), ocasionada por *Neisseria meningitidis*, es la principal causa de muerte por infección en la infancia en los países industrializados, a través de sepsis y/o meningitis. Una de sus características más llamativas es el alto grado de variabilidad interindividual existente, tanto en la susceptibilidad a adquirir la infección, como en la presentación clínica, espectro de gravedad y pronóstico. Se sabe que hay factores genéticos implicados en esta variabilidad, pero aún estamos lejos de conocer los genes responsables de su aparición y evolución. La disponibilidad de nuevas tecnologías y en concreto los estudios de asociación de base poblacional como los basados en el *barrido genómico* (ampliamente conocidos en la jerga genómica como *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) están permitiendo identificar variantes comunes de baja penetrancia, capaces también de modular la susceptibilidad y pronóstico de muchas enfermedades. Ésta es la primera vez que se realiza un GWAS en el contexto de la EM.

**Objetivo:** El objetivo principal de este estudio es determinar si existe algún tipo de condicionamiento genético que explique la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica.

**Material y métodos:** El estudio constó de dos fases. En la primera fase (UK-GWAS), se realizó el primer GWAS de susceptibilidad a EM comunicado hasta el momento, en 475 pacientes y 4.703 controles de Reino Unido. Los SNPs que mostraron mayor significación fueron replicados en otras dos cohortes europeas (Oeste de Europa y España), y mediante mapeo fino se identificaron los polimorfismos asociados en las tres cohortes. La segunda fase del estudio (ESIGEM-Spain GWAS) consistió en la realización de un segundo GWAS de susceptibilidad a EM, en 419 pacientes españoles y 967 controles. A continuación se realizó un metaanálisis de ambos GWAS, y los SNPs que mostraron mayor asociación fueron replicados en una tercera cohorte (Oeste de Europa). Se concluyó con un metaanálisis de los polimorfismos seleccionados en las tres poblaciones europeas, tratando de buscar la variante causal mediante mapeo fino e imputación de la región asociada.

**Resultados-Discusión:** La mayor evidencia de asociación con la susceptibilidad a la EM se detectó, de forma independiente en las tres cohortes, en un agrupamiento de SNPs localizados en el factor H del complemento (*CFH*) (rs1065489,  $P$ -valor =  $2.2 \times 10^{-11}$ , OR = 0.64) y en la proteína 3 relacionada con el factor H del complemento (*CFHR3*) (rs426736,  $P$ -valor =  $4.6 \times 10^{-13}$ , OR = 0.63). Se sabe que la unión de *N. meningitidis* al CFH del huésped, a través de la proteína de unión al CFH (fHbp), contribuye a evadir la acción bactericida del complemento. El segundo locus más significativo en el metaanálisis conjunto de todas las poblaciones fue *ABCA4* (rs544830,  $P$ -valor =  $9.17 \times 10^{-10}$ , OR = 1.30), que se expresa predominantemente en la retina, pero también en el cerebro y los plexos coroideos, pudiendo jugar un papel en la función de la barrera hematoencefálica. Como *CFH* y *ABCA4* habían sido previamente asociados con la degeneración macular, nuestros hallazgos plantean una posible causa genómica común o un mecanismo patogénico compartido entre la EM y la degeneración retiniana.

**Conclusiones:** Hemos demostrado que existen bases genéticas que condicionan la susceptibilidad a la EM. Determinados polimorfismos comunes localizados en *CFH* se comportan como factores protectores, y otros ubicados en *ABCA4*, como factores de predisposición. Estos hallazgos contribuyen a explicar el patrón de respuesta individual y variable a la infección por *N. meningitidis*. Asimismo plantean una posible nexa entre la EM y la degeneración macular, cuya relación funcional está aún por explorar.

## **1. INTRODUCCIÓN**

---



# 1. INTRODUCCIÓN

---

La enfermedad meningocócica invasiva, causada por *Neisseria meningitidis*, es una de las infecciones con potencial más devastador para el ser humano, especialmente en la infancia y en la adolescencia tardía. Es la **principal causa de muerte por infección en los países industrializados**, a través de sepsis y meningitis<sup>1</sup>.

La incidencia global de la enfermedad en Europa, según la OMS, se sitúa en torno a 1-2 casos por cada 100.000 habitantes/año, pero esta cifra se multiplica hasta por quince veces cuando nos referimos a niños entre 1 y 4 años (15.9/100.000 habitantes). La letalidad puede llegar hasta el 100% en los casos en los que no se instaure tratamiento. En España se ha registrado un promedio de 800 casos anuales de enfermedad meningocócica (rango 600-1000) a lo largo de la última década, y a pesar de un diagnóstico y tratamiento precoces, la mortalidad se sitúa de manera estable en torno al 10%. Esto se traduce, de manera global, en unos 500.000 casos y 50.000 muertes al año en el mundo. Además, un 25-30% de los que sobreviven, lo harán con algún tipo de secuela grave permanente (sordera, amputaciones, injertos...)<sup>2</sup>.

La distribución mundial de los serogrupos de *N. meningitidis* es variada y dinámica, haciendo la evolución epidemiológica de la **enfermedad impredecible**<sup>2</sup>. La introducción de vacunas conjugadas frente al serogrupo C ha reducido drásticamente su incidencia en los países desarrollados. Sin embargo, la falta de una vacuna efectiva frente al serogrupo B y el fracaso en la implementación de vacunas conjugadas disponibles frente a los serogrupos A, C, Y y W-135 en muchos países, hacen que la enfermedad meningocócica siga siendo un importante reto en todo el mundo<sup>3</sup>.

Se sabe que hay **factores genéticos** que influyen en su incidencia y gravedad de presentación, pero aún estamos lejos de conocer los genes responsables de su aparición. Se han identificado mutaciones simples en muchos componentes de la vía del complemento relacionados con la recurrencia de EM; mutaciones muy penetrantes, pero extremadamente infrecuentes<sup>4-5</sup>, y que por tanto sólo explican una reducida parte de los casos de EM que observamos. Varios autores han sugerido también que determinadas variaciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) suponen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades multifactoriales como la EM<sup>6-10</sup>. Sin

embargo, nuestro grupo de estudio no encontró evidencia de asociación entre la susceptibilidad, evolución y pronóstico de la EM y el ADNmt, al menos desde el punto de vista de los polimorfismos analizados en las muestras poblacionales consideradas<sup>11</sup>.

Con la disponibilidad de nuevas técnicas de genotipado masivo en los últimos años se ha extendido enormemente la realización de **estudios de asociación de genoma (GWAS)** con el fin de identificar alelos de susceptibilidad de baja penetrancia, pero muy frecuentes en la población. Este abordaje **nunca se había realizado hasta la fecha en el contexto de la enfermedad meningocócica**, y constituye el eje central de la tesis que aquí presentamos.

## **2. REVISIÓN DEL PROBLEMA**

---



## 2. REVISIÓN DEL PROBLEMA

---

### 2.1. ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA

#### 2.1.1. Definición de enfermedad meningocócica y terminología

La enfermedad meningocócica (EM) invasiva es una infección bacteriana ocasionada por *Neisseria meningitidis*, un bacilo gram negativo. Puede presentarse con un espectro clínico que varía desde una meningitis aguda (con afectación predominante de las meninges) a una meningococemia (o septicemia meningocócica), que puede progresar rápidamente a púrpura fulminante, shock y muerte<sup>1</sup>.

Desde el punto de vista clínico, habitualmente se presenta de tres formas:

- Meningococemia o septicemia meningocócica: se caracteriza por fiebre, petequias o púrpura y afectación del estado general;
- Meningitis meningocócica: se caracteriza por fiebre, vómitos, cefalea, fotofobia y signos meníngeos (Kerning y Brudzinski positivos), asociados o no a manifestaciones cutáneas. En lactantes la clínica puede ser más inespecífica, y presentarse con somnolencia o irritabilidad, así como con la fontanela abombada;
- Combinación de ambos, septicemia y meningitis.

Desde el punto de vista terminológico y de cara a establecer estrategias de control de la enfermedad, el Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Manejo de la EM invasiva del Ministerio de Sanidad de España<sup>12</sup> ha aceptado las siguientes denominaciones:

- **Caso primario o índice:** aquel caso que tiene lugar en ausencia de contacto próximo previo con otros pacientes;
- **Casos co-primarios:** aquellos casos que tienen lugar en un grupo de contactos próximos con inicio de síntomas de enfermedad en menos de 24 horas;
- **Caso secundario:** aquel caso que tiene lugar en un contacto próximo a un caso primario, tras 24 horas o más del inicio de síntomas en el caso primario. La definición de casos co-primarios limitaba el tiempo hasta 31 días, debido a que

se había observado que hasta el 90% de los casos secundarios se producían en las dos semanas siguientes a la aparición del primer caso, pero recientemente se ha constatado que la mitad de los casos secundarios aparecen después de 5 semanas o más de la presentación del primer caso;

- **Caso confirmado:** aquel en el que se aísla *N. meningitidis* a partir de un sitio normalmente estéril (LCR, sangre, etc.) en un paciente con clínica compatible de EM invasiva;
- **Caso probable:** aquel en el que se detecta el antígeno polisacárido en el LCR (por ejemplo, mediante aglutinación en latex, reacción en cadena de la polimerasa o inmunohistoquímica) o la presencia de clínica de púrpura fulminante en ausencia de un diagnóstico por cultivo, en un paciente con clínica compatible de EM invasiva.

### 2.1.2. Reseñas históricas

Las enfermedades infecciosas han estado acompañando al hombre desde el origen de la humanidad. En el caso concreto de las infecciones originadas por *N. meningitidis*, conocemos referencias de la enfermedad que se remontan al S XVI, o incluso anteriores: algunos escritos de Avicena (980-1037) son considerados como la primera descripción clínica de la enfermedad.

Sin embargo fue Vieusseux (1746-1814), médico ginebrino, el primero que marcó un hito en el conocimiento de la EM, al identificar una epidemia de meningitis en 1805, que ocasionó 33 muertes<sup>13</sup>: *"...empezó de repente con postración extrema, el rostro demacado, el pulso débil, a veces apenas se podía sentir. Hubo un fuerte dolor de cabeza, sobre todo frontal, entonces aparecieron los vómitos biliosos, la deformación de la columna vertebral y convulsiones en los bebés. El cuerpo presentaba manchas lívidas, sobre todo después de la muerte"*.

Poco después serían otros médicos (Danielson y Elias Mann) los que describirían una sintomatología similar en Vermont y Medfield respectivamente, haciendo alusión a las características clínicas y la naturaleza fulminante de la afección.

El microorganismo fue aislado por primera vez, en líquido cefalorraquídeo, en 1887 por Weichselbaum (Figura 1) durante una epidemia ocurrida en Viena<sup>14</sup>.



**Fig. 1. Anton Weichselbaum, austriaco a quien debemos el primer aislamiento de *N. meningitidis* en líquido cefalorraquídeo (1887). Fuente: <http://www.meningitis.com>**

En 1885, Trevisan efectuó una clasificación de los diplococos creando el género *Neisseria* en honor al médico alemán Albert Neisser (1855-1916), que había centrado sus trabajos en las enfermedades de transmisión sexual, quedando renombrado el *Diplococcus intracellularis meningitidis* —acuñado por Weichselbaum— como *Neisseria meningitidis*<sup>15</sup>. Kiefer y Albrecht, posteriormente, identificarían el estado de portador, al aislar su presencia en la nasofaringe de individuos vivos.

A principios del S. XX comenzaron los primeros intentos de prevenir la enfermedad mediante la administración de sueros intravenosos, que consiguieron reducir la mortalidad de la enfermedad hasta en un 18% en Alemania, o hasta un 33% desde un punto de vista global, según Flexner<sup>16</sup>. La sueroterapia fue posteriormente sustituida por el empleo de antibióticos, que comenzó con la introducción de las sulfonamidas. Pero el mejor avance en el tratamiento de la meningitis fue, sin duda, el descubrimiento de la penicilina por Fleming (1881-1955).

Los ensayos clínicos llevados a cabo a finales de los años 1960 en reclutas militares por los investigadores Gotschlich, Artenstein y Glodschneider, de EEUU, llevaron a la producción de la primera vacuna antimeningocócica polisacárida eficaz<sup>17-18</sup>, que serviría como germen para el desarrollo de posteriores vacunas. Las vacunas

conjugadas y el reciente diseño de vacunas basadas en la genómica (vacunología inversa), suponen un importante avance en el intento por controlar esta enfermedad.

Han pasado más de 200 años desde que el conocemos, desde un punto de vista científico y microbiológico, la existencia de la enfermedad meningocócica, y sin embargo seguimos lejos de conocer las razones de su evolución y de su forma de respuesta al tratamiento.

### 2.1.3. Epidemiología de la enfermedad meningocócica

#### 2.1.3.1. Visión global

La EM es la principal causa de muerte por infección en los países industrializados. Se contabilizan unos 500.000 casos de EM y unas 50.000 muertes al año en el mundo a causa de esta enfermedad. Su incidencia oscila entre 0.5 y 10 casos por cada 100.000 habitantes al año, según la región geográfica a la que se haga referencia. La mayor incidencia se registra, con diferencia, en el llamado "cinturón de la meningitis" en África Subsahariana, donde la incidencia puede superar los 1000 casos por cada 100.000 habitantes durante las etapas epidémicas<sup>2</sup> (Tabla 1).

**Tabla 1. Incidencia de EM invasiva por país o región. Modificado de Halperin et al<sup>2</sup>.** \*La incidencia anual durante las epidemias provocadas por el serogrupo A en el "cinturón africano de la meningitis" pueden superar los 1,000 casos / 100,000 habitantes.

País/Región	Incidencia por cada 100,000 habitantes	Año
"Cinturón de la meningitis" africano	10-1,000 (durante epidemias)*	No aplicable
Nueva Zelanda	2.2	2010
Australia	1.2	2009
Europa	0.92	2009
Chile	0.5	2010
Argentina	0.6	2008
Canadá	0.47	2008
EEUU	0.28	2009

La epidemiología de la EM es variada y dinámica en el lugar y en el tiempo, lo que contribuye a su difícil previsión, conocimiento y control. La distribución de los serogrupos según regiones geográficas es un factor clave para el diseño de programas específicos de prevención. Los serogrupos A, B y C son, en conjunto, los responsables de hasta el 90% de casos de EM en todo el mundo<sup>1</sup>: B y C son los principales agentes etiológicos en Europa y América, mientras que A y C son los predominantes en Asia y África. Los EEUU, Israel y Suiza son los únicos países que han comunicado un aumento en la enfermedad ocasionada por el serogrupo Y.

#### **2.1.3.1.1. África**

La región de la sabana africana que se extiende desde Etiopía (en el Este) a Senegal (en el Oeste) aglutina la mayor incidencia de EM en todo el mundo, pudiendo afectar, en determinadas epidemias, hasta al 1% de la población. Es por ello que a esta franja de territorio subsahariano, que abarca una población de unos 300 millones de habitantes, Lapeysonnie acuñó en 1963 como "cinturón de la meningitis"<sup>19</sup>. Las condiciones climáticas de estos países parecen contribuir a la recurrencia anual de tales epidemias, sobre todo en relación con la llegada del *Harmattan*, el viento cálido y seco que preludia la llegada de la estación seca, a principios de año.

La epidemia más grave de meningitis meningocócica que ha experimentado África hasta el momento fue la de 1996, causada por el serogrupo A, con más de 150.000 casos y 16.000 muertes registradas. Fue Burkina Faso, en 2002, el primer país que experimentó una epidemia por el serogrupo W135.

A pesar de que el serogrupo A ha sido clásicamente el responsable de la mayor parte de casos y brotes a lo largo de todo el continente, en los últimos años se ha registrado un aumento de los casos producidos por los serogrupos W135 y también, más al sur, por el serogrupo X (Tabla 2).

**Tabla 2. Distribución de serogrupos causantes de meningitis meningocócica en el "cinturón africano de la meningitis" entre 2007 y 2011. Modificado de Halperin et al<sup>2</sup>.** <sup>a</sup>La proporción de casos analizados varía entre países y de año a año, pero estuvo normalmente en torno al 10%. <sup>b</sup>En las muestras restantes se aislaron otras bacterias o los cultivos fueron negativos. <sup>c</sup>Principalmente serogrupo X. <sup>d</sup>Hasta la semana 26.

Año	Nº de muestras analizadas <sup>a</sup>	Meningococo (serogrupo) <sup>b</sup>		
		A	W135	Otros
2007	2533	609	63	9
2008	3413	1062	7	65 <sup>c</sup>
2009	5688	1966	167	47
2010	4132	439	726	75
2011 <sup>d</sup>	4278	197	495	144

La disminución de casos por meningococo A en la zona del "cinturón" ha seguido en el tiempo a la introducción de una nueva vacuna conjugada frente a meningococo A (MenAfriVac<sup>TM</sup>) a finales de 2010. El hecho de que también se registrasen pocos casos de este serogrupo en zonas que no fueron objeto de vacunación, hace que el que impacto real de esta vacuna esté aún por establecerse.

#### 2.1.3.1.2. Asia

Son pocas las publicaciones acerca de la epidemiología de la enfermedad en este continente. Las principales epidemias han ocurrido en China (1978-1079), Mongolia (1973-1974, 1994-1995) y La India, especialmente en el norte del país (Nueva Delhi y alrededores), donde la última epidemia aconteció en 2005-2006. El serogrupo A ha sido siempre el principal agente etiológico, aunque la epidemia de Vietnam en 1977-1979 y los últimos brotes acontecidos en el continente fueron debidos predominantemente al serogrupo C<sup>20</sup>.

#### 2.1.3.1.3. Australia y Nueva Zelanda

Estos países de gran tamaño y dispersión poblacional, manifiestan diferencias regionales en relación con los serogrupos más prevalentes.

Las zonas del Sur de Gales y Victoria se han visto afectadas, predominantemente, por los serogrupos B y C. En 2003, en respuesta a un aumento en el registro de casos por el serogrupo C se introdujo un programa de vacunación nacional muy eficaz, que consiguió una reducción de más del 90% de estos casos: de 1.15 a 0.07 por cada 100.000 habitantes<sup>21-22</sup>. En el Oeste de Australia la afectación ha sido y es, especialmente, debida a meningococo B.

En los últimos 20 años apenas se han detectado casos por el serogrupo A, que en los años 80 correspondieron a indígenas australianos residentes en el centro de Australia<sup>23</sup>.

Nueva Zelanda se caracteriza por haber registrado una cepa circulante de meningococo B (B:4:P1.7-2,4) como responsable de hasta 17 casos por cada 100.000 habitantes en 2000, lo que propició la introducción de una vacuna específica (MeNZB™) en 2004 que consiguió disminuir drásticamente su incidencia. Los demás casos han sido debidos al serogrupo C y, en mucha menor medida, a W135 e Y.

#### 2.1.3.1.4. América

- **Norte América:** La incidencia de la enfermedad en EEUU disminuyó ostensiblemente y de forma global desde 1997, año en el que se registró el último brote. Esta disminución hasta los 0.28 casos por cada 100.000 habitantes al año en 2009<sup>24-25</sup> aconteció mucho antes de la introducción de las vacunas conjugadas, y afecta también al serogrupo B, frente al cual aún no está disponible la inmunización. Canadá fue uno de los primeros países que implementó la vacunación universal frente al meningococo C a partir de 2002. Esto contribuyó, sin duda, a la disminución de la incidencia de la enfermedad por este serogrupo, aunque ya partía de unas tasas de afectación y endemidad para todos los serogrupos muy bajas (incidencia anual actual, de 0.2 por cada 100.000 habitantes). Meningococo B es el responsable de más de la mitad de los casos actuales, mientras que Y y W135 son serogrupos minoritarios.
- **América del Sur:** Los serogrupos B y C son los causantes de la mayor parte de casos de EM comunicados en esta región, en la que los datos epidemiológicos publicados son escasos y, probablemente, infraestimados. Su incidencia varía enormemente según la zona geográfica, pasando de 0.05 casos por cada 100.000 habitantes en México a casi 2 por cada 100.000, en Brasil.

Durante los años 70 Brasil experimentó su mayor epidemia (hasta 179 casos por 100.000 habitantes al año), con dos olas secuenciales de meningococo C y A, que consiguieron controlarse tras la introducción masiva de la vacuna polisacárida frente a ambos serogrupos. En 2010 pasó a ser el primer país de Latinoamérica en incorporar la vacuna conjugada frente a meningococo C en el calendario de inmunizaciones rutinario.

#### **2.1.3.1.5. Europa**

La incidencia global en Europa es cercana a 1 por cada 100.000 habitantes al año. El último registro oficial europeo a larga escala, en 2009, concluyó con que Irlanda, Lituania, España, Dinamarca y Austria superaban dicha media europea. Estas cifras de incidencia, además, alcanzan valores muy superiores en determinadas franjas etarias: 15.9 por cada 100.000 habitantes si nos referimos a niños pequeños, 5.4 por cada 100.000 en niños de 1 a 4 años, y 2 por cada 100.000 en adultos jóvenes. Casi la mitad de los casos registrados se presentan como meningitis (45%), el 34% como sepsis meningocócica, y el 4% como ambos, sepsis y meningitis.

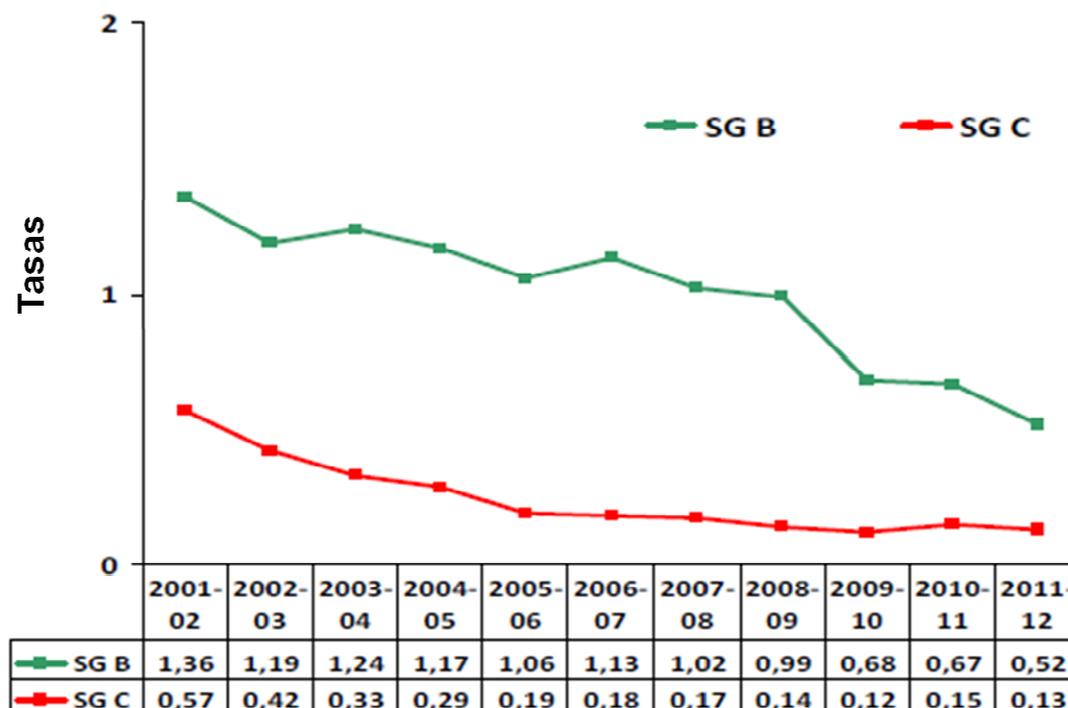
La introducción de la vacuna conjugada frente a meningococo C consiguió reducir la incidencia global a casi la mitad de pacientes en la última década. Sin embargo el serogrupo B, para el que todavía no está disponible ninguna medida preventiva, es el causante de más de dos tercios de todos los casos (71%), especialmente en niños menores de 5 años, seguido del serogrupo C (13%) y del Y (4%), que ha experimentado un aumento en los últimos años, sobre todo en los países nórdicos.

#### **2.1.3.2. Situación en España**

En España, la enfermedad meningocócica es de declaración obligatoria, urgente e individual, y se registra por la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) mediante la notificación al Sistema de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO)<sup>26</sup>. Según datos publicados en los boletines epidemiológicos semanales, durante el periodo 2006-2007 la tasa de incidencia de casos declarados (casos confirmados y sospechosos no confirmados) fue de 1,37 por cada 100.000 habitantes, y descendió a 1,21 por cada 100.000 habitantes en 2010<sup>26-27</sup>. En la temporada 2011-2012 se ha registrado la tasa más baja en los últimos 12 años; se declararon un total de 482 casos

de enfermedad meningocócica a la RENAVE, 371 de ellos (el 77%) confirmados, lo que supone una tasa de incidencia de 0.80 por cada 100.000 habitantes. De estos casos, el 65% fueron causados por el serogrupo B<sup>27</sup> (Tabla 3).

**Tabla 3. Evolución de las tasas de incidencia de enfermedad meningocócica para los serogrupos B y C. Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología<sup>27</sup>.**



Sin embargo, aunque se han observado importantes reducciones en las tasas de hospitalización y mortalidad por esta enfermedad durante los últimos años, su morbimortalidad continúa siendo importante en menores de 5 años<sup>28</sup>.

Existen diferencias entre las tasas de incidencia en las distintas comunidades autónomas. Durante el periodo 2006-2007, algunas comunidades registraron tasas de incidencia de hasta 4,19 por cada 100.000 habitantes, y en 2009-2010 algunas alcanzaron tasas de hasta 3,33 por cada 100.000 habitantes<sup>26-27</sup> (Tabla 4).

Tabla 4. Incidencia de enfermedad meningocócica por CCAA (casos declarados), año 2010. Tomada de Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III<sup>26</sup>.

Tasa de incidencia de enfermedad meningocócica por CC.AA. (casos declarados) por 100.000 habitantes. España, 2010	
Andalucía	1,53
Aragón	0,70
Asturias	1,05
Baleares	1,12
Canarias	0,77
Cantabria	3,33
Castilla-La Mancha	1,31
Castilla y León	0,82
Cataluña	1,45
C. Valenciana	0,84
Extremadura	1,67
Galicia	1,85
Madrid	3,65
Murcia	0,63
Navarra	2,12
P. Vasco	1,51
La Rioja	0,95
Ceuta	2,91
Melilla	0
<b>Total España</b>	<b>1,21</b>

En general se observa mayor incidencia en algunas CCAA del Norte de España, como País Vasco, Navarra, Cantabria o Galicia, pero también en Andalucía<sup>27</sup>.

La introducción de la vacuna frente al serogrupo C en el año 2000 ha determinado un cambio importante en la epidemiología de la enfermedad meningocócica en nuestro país, dejando al serogrupo B como el principal responsable de la enfermedad invasiva<sup>29</sup> (Tabla 5).

Tabla 5. Enfermedad meningocócica en España. Tasas y casos por 100.000 habitantes según el diagnóstico microbiológico. Fuente: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología<sup>27</sup>.

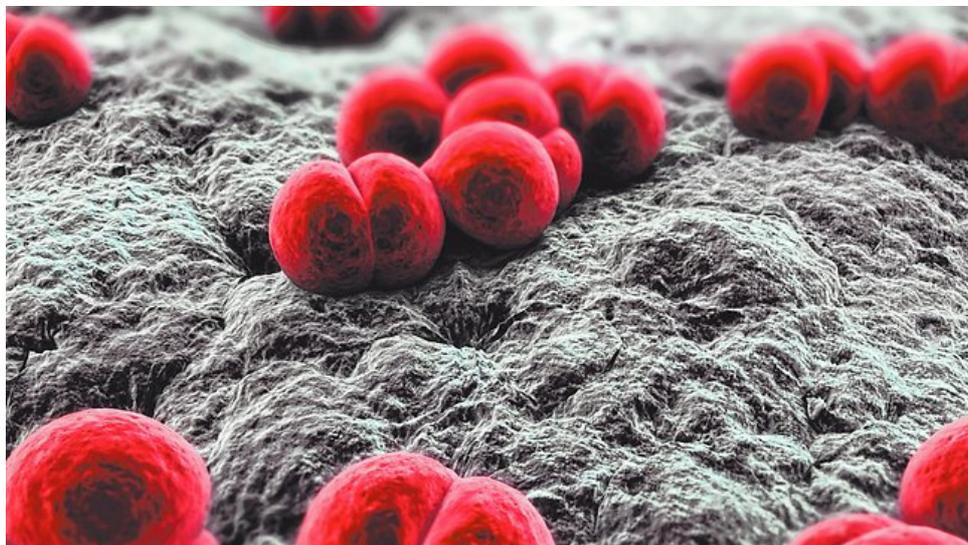
Resultado microbiológico	2006-2007		2007-2008		2008-2009		2009-2010		2010-2011		2011-2012	
	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas	Casos	Tasas
Serogrupo B	498	1.13	459	1.02	453	0.99	313	0.68	307	0.67	240	0.52
Serogrupo C	78	0.18	77	0.17	64	0.14	55	0.12	67	0.15	60	0.13
No tipables	13	0.03	22	0.05	32	0.07	34	0.07	24	0.05	27	0.06
Otros serogrupos	9	0.02	16	0.04	20	0.04	23	0.05	14	0.03	30	0.06
Serogrupo desconocido	13	0.03	20	0.04	3	0.01	17	0.04	21	0.05	14	0.03
Total confirmados	611	1.39	594	1.32	572	1.25	442	0.96	433	0.94	371	0.80
Total sospechosos	189	0.43	173	0.38	165	0.36	117	0.25	110	0.24	111	0.24
Total	800	1.82	767	1.68	737	1.62	559	1.22	543	1.18	482	1.04

Sin embargo, en ausencia de una vacuna efectiva contra el serogrupo B, es difícil modificar o reducir la morbimortalidad por esta enfermedad en nuestro medio. Las tasas de incidencia de casos confirmados durante los últimos años (aproximadamente desde 2006 hasta 2010) han oscilado de 0,17 a 0,12 para el serogrupo C y de 1,12 a 0,69 para el serogrupo B. El descenso del número de casos del serogrupo B que se ha observado, particularmente en el año 2010, es similar al descenso que se ha observado en otros países europeos<sup>30</sup>. Puede tener su origen en la naturaleza cíclica de la enfermedad<sup>1-3,31-32</sup> y estar determinado por diversos factores ambientales y conductas asociadas a riesgo<sup>3</sup>. Esta naturaleza cíclica obliga a mantener una vigilancia estricta que permita generar datos para utilización potencial de vacunas basadas en formulaciones diferentes, así como monitorizar el impacto de las intervenciones con dichas vacunas. Por ejemplo, en la década de 1975-1985 la enfermedad meningocócica en Galicia alcanzó tasas de 30 casos por 100.000 habitantes. Del resto de serogrupos (A, W135 e Y) se notifican sólo de 10 a 30 casos en toda España, según la temporada (incidencias del 0,02 al 0,06 por 100.000 habitantes)<sup>26-27</sup>.

#### 2.1.4. Características microbiológicas

*N. meningitidis* o meningococo es un diplococo gramnegativo, intracelular, de forma arriñonada o "en grano de café". Debido a estas características fue denominado

*Diplococcus intracellularis meningitidis* en 1887 por Weichselbaum, quien primero lo aisló, en líquido cefalorraquídeo (Figura 2).



**Fig. 2. *Neisseria meningitidis*.**

Este microorganismo, de aproximadamente  $0,6 \times 0,8 \mu\text{m}$ , es clasificado en 13 serogrupos en función de la reactividad inmunológica de los polisacáridos de su cápsula (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W-135, X, Y, Z), aunque tres de estos serogrupos (A, B y C) son los responsables de casi el 90% de casos de enfermedad meningocócica en nuestro medio.

Su membrana citoplasmática está rodeada por el espacio periplásmico que la separa de la pared celular, la cual está compuesta por una fina capa de peptidoglicano y por la membrana externa. Esta membrana externa, a su vez, está dividida en una capa interior de fosfolípidos y una capa externa de lipooligosacáridos (LOS), y se encuentra repleta de distintos tipos de proteínas (OMP, *outermembrane protein*). Las OMP se clasifican a su vez en clase 1 o PorA, clase 2 o PorB2, clase 3 o PorB3 y clase 5 u Opa y Opc. Las OMP de tipo Por actúan principalmente como porinas, regulando el flujo de nutrientes y productos metabólicos, y las de tipo Opa y Opc (proteínas de opacidad), como sistemas de adhesión (Figura 3 y Tabla 6).

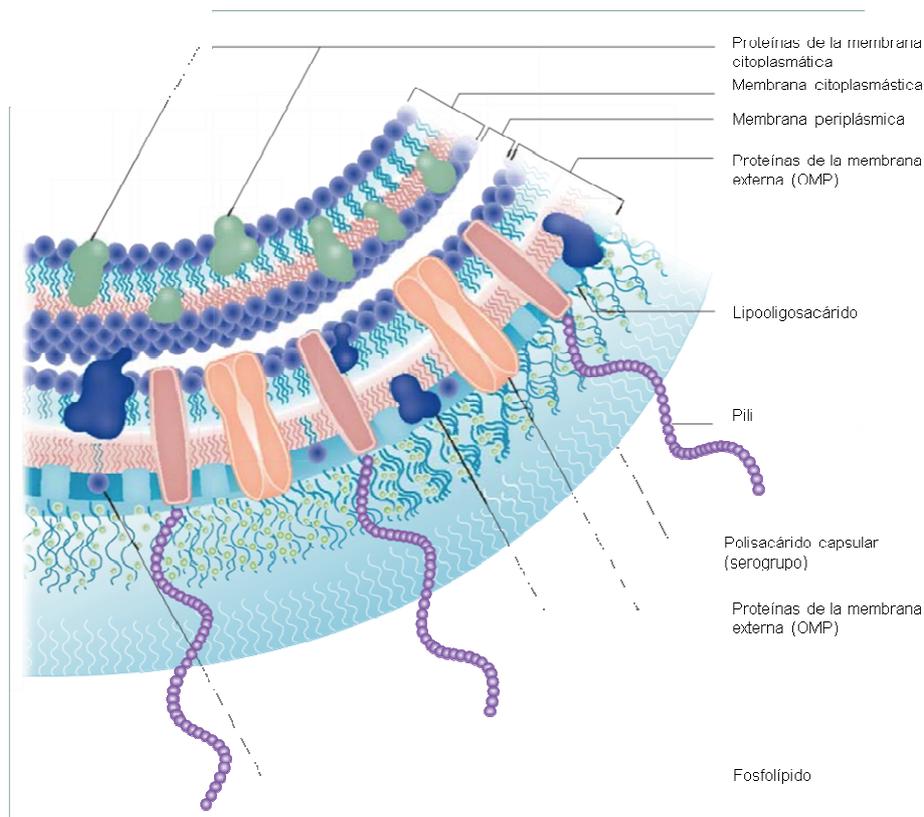


Fig. 3. Esquema de la membrana del meningococo. Adaptado de *Stephens et al*<sup>33-34</sup>.

Tabla 6. Función y clasificación de los componentes de membrana de *N. meningitidis*. Adaptado de *Rosenstein et al*<sup>1</sup>.

Componente			Función	Clasificación
Cápsula			Protege frente a la bacteriolisis y la fagocitosis mediada por el huésped y dependiente del complemento	13 serogrupos (A, B, C, E-29, H, I, K, L, M, W-135, X, Y, Z)
Proteínas de membrana externa (OMP)	Porinas	Por A	Crean poros a través de los cuales los pequeños nutrientes hidrófilos pueden difundir al interior, mediante selección catiónica o aniónica	Proteína de membrana externa clase 1 (subserotipo)
		Por B		Proteína de membrana externa clase 2 o 3 (serotipo)
	Proteínas asociadas a opacidad	Opa	Promueve adherencia a células del huésped y leucocitos	Proteína de membrana externa clase 5
		Opc	Promueve adherencia a células del huésped	

<b>Proteína de reducción modificable</b>	Desconocido	Proteína de membrana externa clase 4
<b>Lipooligosacárido (LOS)</b>	Potente actividad endotóxica	13 Inmunotipos
<b>Pili o fimbria</b>	Promueve la adherencia inicial a las células endoteliales y epiteliales, y a los eritrocitos	Clase I y II

No todas las cepas de *N meningitidis* son capsuladas, pero la presencia de la cápsula es necesaria para que puedan sobrevivir en la sangre y en el líquido cefalorraquídeo, al proporcionarles resistencia frente a la actividad bactericida del complemento y la unión de anticuerpos, y por inhibir la fagocitosis<sup>35</sup>. Además, la cápsula confiere propiedades antiadherentes y protectoras frente a la desecación. Por ello, sólo las cepas capsuladas producen enfermedad invasiva. La cápsula está compuesta por polisacáridos derivados del ácido siálico (ácido 5-N-acetilneuramínico [NANA]), excepto en el serogrupo A, en la cual consiste en unidades que se repiten de ácido N-acetilmanosamina-1-fosfato. En los humanos, el NANA es la forma más común de ácido siálico presente en la superficie de nuestras células, y desempeña un importante papel en el reconocimiento intercelular e intermolecular<sup>36</sup>. Al incorporarlo en su cápsula, *N. meningitidis* consigue pasar más desapercibida a nuestro sistema inmunitario. El caso más patente es el de la cápsula del serogrupo B, cuyo homopolímero de ácido siálico es NANA ligado a  $\alpha(2\rightarrow8)$  y es idéntico a la estructura de la molécula de adherencia de las células nerviosas humanas, que es fundamental en la plasticidad funcional de nuestro sistema nervioso central y periférico. Este parecido es la causa de la pobre respuesta inmunitaria generada frente a dicha cápsula por los humanos, y de las dificultades para fabricar una vacuna polisacárida frente a este serogrupo<sup>37</sup>.

Algunas cepas de *N. meningitidis* pueden presentar fimbrias o *pili* de tipo IV compuestas por subunidades proteicas repetidas (*pilinas*)<sup>38</sup>. Los *pili* facilitan la adhesión a las células epiteliales de la nasofaringe humana por su interacción, entre otros, con los receptores CD46<sup>39</sup>. Resultan especialmente útiles para las cepas capsuladas, ya que pueden extenderse miles de nanómetros más allá de la cápsula e iniciar el proceso de unión a las células epiteliales. Además de la adherencia, este tipo de *pili* (al poder extenderse y retraerse con rapidez) pueden dotar a *N. meningitidis* de movilidad en *switching*, que le resulta muy útil para atravesar la capa mucosa epitelial y para formar microcolonias<sup>40</sup>.

*N. meningitidis* metaboliza algunos hidratos de carbono, como la glucosa y la maltosa, por vía oxidativa, pero no metaboliza la sacarosa ni la lactosa, lo que la diferencia de otras especies de *Neisseria*. Crece de forma óptima en ambientes húmedos, con 35-37°C de temperatura, y puede crecer en una atmósfera anaerobia. Es catalasa positiva y oxidasa positiva. Posee unas proteínas de unión al hierro que le permiten captarlo de la hemoglobina (HmbR), de la transferrina (TbpA y TbpB), de la lactoferrina (HbpA y HbpB) y del complejo hemoglobina-haptoglobina (HpnA y HpnB)<sup>41</sup>.

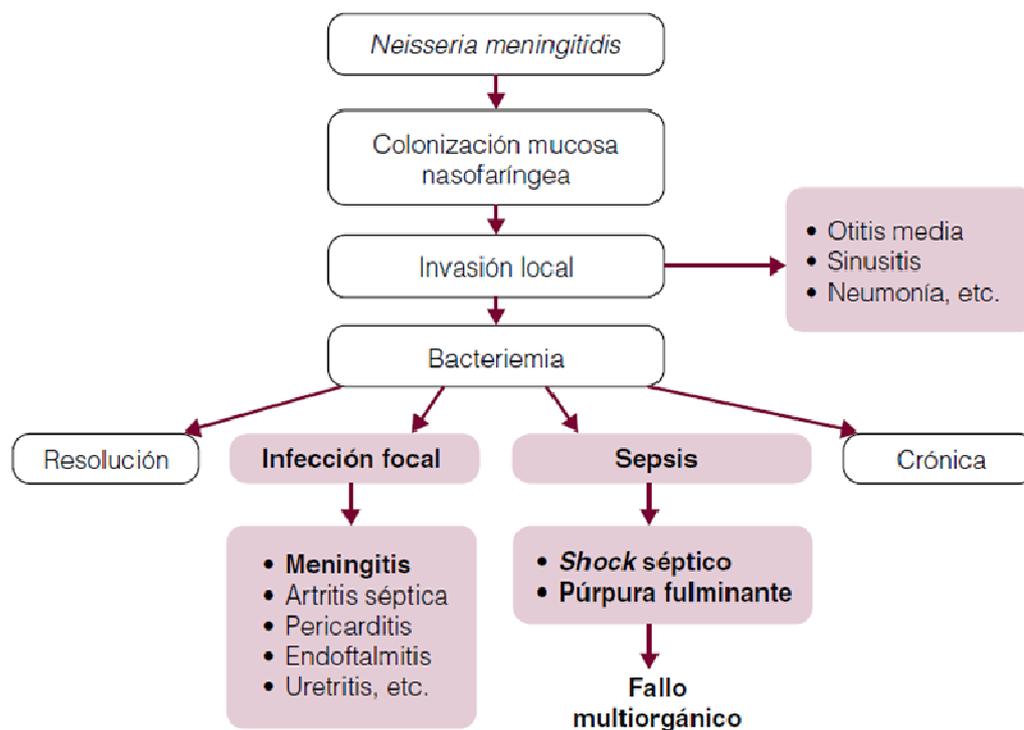
*N. meningitidis* es, al igual que *N. gonorrhoeae*, el único patógeno exclusivamente humano de este género. También comparten ambos unas altas demandas nutricionales, que hacen que sean muy lábiles en superficies inanimadas.

Los humanos son el único reservorio para *N. Meningitidis*, y la nasofaringe es el lugar desde el cual se transmite entre personas, a través de aerosoles o secreciones.

#### **2.1.5. Fisiopatología e historia natural de la enfermedad**

La mucosa nasofaríngea humana es el único reservorio natural conocido de *N. meningitidis*, la cual se transmite de persona a persona mediante el contacto directo con aerosoles o secreciones respiratorias de vías altas<sup>42</sup>. La adquisición del meningococo puede ser transitoria, resultar en la colonización nasofaríngea, o causar, en una pequeña proporción de casos, enfermedad meningocócica invasiva (EM).

Para el desarrollo de EM invasiva es necesario que se cumplan al menos tres condiciones: 1) exposición del huésped a una cepa patogénica de *N. meningitidis*; 2) colonización nasofaríngea de *N. meningitidis*; 3) penetración bacteriana de la barrera mucosa respiratoria alta e invasión del torrente sanguíneo. Los factores que determinan el desarrollo de la EM y su forma de presentación clínica no están totalmente dilucidados, pero se cree que dependen de una amplia variedad de características del patógeno, del huésped y del medioambiente<sup>1</sup> (Figura 4).

Fig. 4. Historia natural de la enfermedad meningocócica<sup>43</sup>

#### 2.1.5.1. Adhesión e invasión de la mucosa nasofaríngea

Tras la exposición del huésped a *N. meningitidis*, la bacteria alcanza la mucosa nasofaríngea, y se adhiere mediante diversas proteínas de membrana a la superficie de las células epiteliales columnares no ciliadas, donde prolifera formando microcolonias. Para ello utiliza adhesinas, entre las cuales figuran: Pili, PilC, PilQ, Opa, Opc, LOS, proteína de unión al factor H (fHbp), Por A, HrpA, PorB y NadA. De entre las múltiples adhesinas bacterianas identificadas, se cree que los *pili* tipo IV son las principales responsables de la adhesión inicial y agregación del meningococo en la nasofaringe, posiblemente mediante su unión al receptor CD46 (cofactor de membrana involucrado en la regulación de la activación del sistema de complemento)<sup>44</sup>. A continuación, otras dos proteínas de superficie de la membrana externa bacteriana asociadas a opacidad (Opa y Opc) se unen respectivamente al receptor CD66 (molécula de adhesión celular del antígeno carcino-embrionario, CEACAM) y a los receptores de proteoglicanos heparán sulfato de la mucosa nasofaríngea del huésped, estimulando la entrada del meningococo en las células en forma de vacuolas fagocíticas capaces de atravesar la barrera mucosa<sup>45</sup>. Tanto los *pili* tipo IV como Opa y Opc experimentan variación de fase durante este proceso.

Los meningococos capsulados son los únicos capaces de penetrar la mucosa nasofaríngea y por tanto, de producir enfermedad. Dos proteínas de la membrana externa bacteriana parecen estar implicadas en la supervivencia de los meningococos en el interior de las células epiteliales: la proteasa Inmunoglobulina A1 (degrada la glicoproteína de membrana asociada al lisosoma, LAMP1) y la proteína porB (frena la maduración del fagosoma)<sup>1</sup>. Además, la propia cápsula facilita la supervivencia intracelular proporcionando una mayor resistencia frente a los péptidos antimicrobiales catiónicos. Asimismo, la capacidad del meningococo de quelar hierro del huésped a través de sistemas de transporte especializados, facilita su replicación intracelular<sup>46</sup>.

La internalización y supervivencia del meningococo en vacuolas dentro del epitelio respiratorio no ciliado del huésped resulta en la colonización nasofaríngea y adquisición del estado de portador, el cual representa la fuente más común de transmisión de la infección.

#### **2.1.5.2. Estado de portador nasofaríngeo**

Se estima que en situaciones no epidémicas, entre el 5-10% de la población adulta es portadora nasofaríngea asintomática de cepas de *N. meningitidis*, la mayoría no patogénicas<sup>3</sup>. Diversos factores se han asociado a la adquisición del estado de portador. En primer lugar, la prevalencia del estado de portador varía con la edad, incrementando desde menos del 1% en lactantes hasta un 15-25% en adolescentes<sup>47</sup>. Probablemente consecuencia, entre otros factores, de cambios en los hábitos de conducta. Además, el riesgo de ser portador aumenta con agentes que dañan la mucosa respiratoria alta como la exposición activa o pasiva al tabaco, las coinfecciones respiratorias o la baja humedad ambiental. La colonización nasofaríngea también aumenta sustancialmente en grupos de población cerrados y con hacinamiento (p.ej. ejército, residencias de estudiantes, peregrinaciones, etc), y con el contacto íntimo con portadores. Otros factores que han sido asociados al estado de portador son la secreción de la glicoproteína de los antígenos de grupo sanguíneo ABO y determinados grupos étnicos<sup>48</sup>.

En la mayoría de individuos, el estado de portador es asintomático e inmunizante, y puede durar desde días a años<sup>49</sup>. Se han descrito tres tipos de portadores: transitorios, en los que el estado de portador es muy corto (días, semanas); crónicos, cuando este estado se mantiene durante largos períodos de tiempo, de hasta 2 o más años; e intermitentes, cuando presentan colonizaciones

repetidas durante cortos períodos de tiempo. Algunas cepas de meningococo son altamente transmisibles, en general las del serogrupo C, por lo que rara vez producen un estado de portador.

Así, en respuesta a la colonización nasofaríngea de cepas patogénicas y no patogénicas de meningococo u otras especies de *Neisseria* antigénicamente relacionadas, la mayoría de personas produce anticuerpos opsonizantes o bactericidas que les confieren protección contra la infección. Sin embargo, en un número pequeño de casos, los meningococos logran atravesar la barrera mucosa respiratoria, invadir el torrente sanguíneo y causar EM invasiva. Ésta ocurre habitualmente en un periodo breve de tiempo tras la adquisición de la infección, relacionándose más con la transmisión que con el estado de portador. Así, la probabilidad de desarrollar EM disminuye drásticamente a los pocos días de la infección, siendo muy improbable tras 10-14 días<sup>34</sup>, tiempo que se estima necesario para la producción de anticuerpos.

### **2.1.5.3. Enfermedad meningocócica invasiva**

Una vez colonizada la barrera mucosa respiratoria, en un pequeño número de casos *N. meningitidis* invade el torrente sanguíneo, probablemente a través de capilares y vénulas del tejido submucoso subyacente. La bacteriemia puede ser transitoria, o resultar en EM invasiva. De este modo, los meningococos pueden diseminarse e invadir otros tejidos causando EM focal (meningitis principalmente), o inducir una respuesta inflamatoria sistémica que puede conducir en pocas horas a un shock séptico fulminante y fracaso multiorgánico en hasta un 30% de los niños con infecciones por los serogrupos B y C<sup>50</sup>. La propensión marcada a invadir las meninges y la capacidad de proliferar rápidamente en la sangre conduciendo al shock hacen al meningococo único entre los patógenos humano. Además, *N. meningitidis* puede extenderse de la nasofaringe a las superficies epiteliales adyacentes, provocando ocasionalmente infecciones locales como neumonía, sinusitis u otitis media. En casos aislados la meningococemia puede cronificarse, dando lugar a una entidad clínica característica<sup>51</sup>.

#### **2.1.5.3.1. Enfermedad meningocócica invasiva: factores de riesgo**

Los mecanismos que determinan la transición de colonización a EM invasiva no están completamente dilucidados, pero se cree que son el resultado de una combinación de

factores de virulencia del patógeno, susceptibilidad del huésped, presencia o no de anticuerpos bactericidas capaces de activar la bacteriolisis mediada por complemento o la opsonofagocitosis, y factores socio-ambientales (Figura 5).

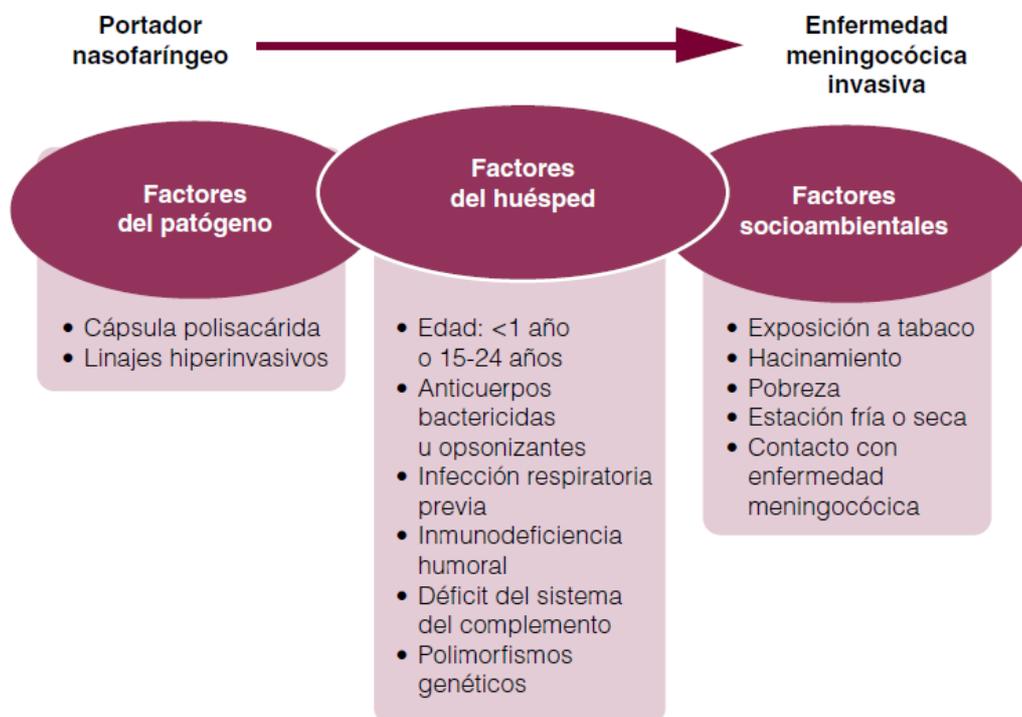


Fig. 5. Factores que condicionan la transición del estado de portador a enfermedad meningocócica

43

#### 2.1.5.3.1.1. Factores del patógeno

*N. Meningitidis* normalmente actúa como bacteria comensal, exclusivamente en los humanos. Solamente una minoría de las bacterias aisladas a partir de muestras nasofaríngeas causa enfermedad invasiva posterior. El meningococo que conduce a una enfermedad invasiva posee una cápsula que le confiere protección frente a los mecanismos de defensa del huésped. Además, ciertas adhesinas (como los *pili*), los factores que actúan sobre la adquisición de nutrientes y los mecanismos específicos para adquirir hierro de la lactoferrina, la transferrina y la hemoglobina del huésped dan potencia a la patogenicidad de la bacteria. Pero el factor de virulencia más importante es la capacidad de liberar vesículas de la membrana externa, que consisten en lipooligosacáridos (endotoxinas), proteínas de membrana externa, fosfolípidos y polisacáridos capsulares. El meningococo es capaz de llevar a cabo su propia

autólisis, liberando así ADN y componentes de la pared bacteriana, lo cual desencadena una potente respuesta inflamatoria en el huésped. Las razones por las que un determinado clon bacteriano conlleva a una enfermedad invasiva no se conocen en profundidad. No obstante, se sabe que poseen características antigénicas que no son reconocidas por el huésped consiguiendo burlar los mecanismos de respuesta inmune adaptativa<sup>1,52</sup>.

Por tanto, la **cápsula polisacárida del meningococo** es el factor más determinante de la virulencia de la bacteria, ya que sólo los meningococos capsulados son capaces de penetrar en las células epiteliales. Por otra parte, **los linajes hiperinvasivos** de meningococo producen un mayor riesgo de transmisión y desarrollo de la enfermedad.

#### 2.1.5.3.1.2. Factores del huésped

- **Edad:** Factor importante de riesgo de EM, tal y como se demuestra con la variación en la incidencia de EM según la franja etaria. La máxima incidencia de EM invasiva ocurre en lactantes, seguida de niños de 1 a 5 años y con un tercer pico de incidencia en adolescentes de 15 a 19 años<sup>53</sup>. El serogrupo B afecta sobre todo a los menores de 5 años; el serogrupo C tiene una distribución más bimodal, afectando también a los adolescentes (15-19 años); el serogrupo A afecta más a los adultos jóvenes (15-19, 25-44 y 10-14 años) y el serogrupo Y afecta fundamentalmente a mayores de 65 años<sup>1,54-55</sup>.

La incidencia de la enfermedad en el neonato es baja, debido a la presencia de anticuerpos maternos; a estas edades las manifestaciones clínicas son extremadamente graves. Dentro del grupo de enfermos menores de 1 año, los de 6-9 meses son los más afectados y los menores de 3 meses los que tienen un cuadro más leve.

La mortalidad es mayor en los más jóvenes (0-3 años). El meningococo C, en particular, ocasiona una mayor mortalidad en los adolescentes y adultos jóvenes<sup>41</sup>.

- **Sexo:** Se ha observado una mayor morbilidad en los varones (razón de masculinidad: entre 1.2 y 1.4), mientras que la mortalidad es mayor en las mujeres (razón de masculinidad: 0.9)<sup>4</sup>.
- **Anticuerpos opsonizantes o bactericidas:** La producción de estos anticuerpos en respuesta al estado de portador nasofaríngeo, confiere protección contra la infección. Por tanto, la ausencia de estos anticuerpos protectores se considera el

factor individual predisponente más importante para el desarrollo de EM invasiva. De hecho, el pico de incidencia de EM en lactantes (a partir del 6º mes de vida) coincide con la pérdida de los anticuerpos transferidos por la madre<sup>56</sup>.

- **Infecciones respiratorias previas:** Se ha observado una asociación de las infecciones – especialmente por virus Influenza, adenovirus, virus respiratorio sincitial y *Mycoplasma pneumoniae* – con la enfermedad meningocócica. La interacción entre las infecciones respiratorias víricas y las bacterianas se debe a que las primeras lesionan los mecanismos de auto depuración bacteriana de la mucosa rinofaríngea, al destruir el epitelio ciliado, inhibir el poder fagocitario de los leucocitos y producir modificaciones fisicoquímicas de las secreciones respiratorias<sup>1,56-59</sup>. No obstante, recientemente un estudio de casos y controles llevado a cabo por *Dunlop* y colaboradores<sup>60</sup> concluye que el virus respiratorio sincitial no aumenta la susceptibilidad de desarrollar enfermedad meningocócica. La colonización entérica por gérmenes de los géneros *Bacillus* y *Micrococcus*, que comparten antígenos de superficie con meningococo, puede influir en la presentación epidémica de la enfermedad. Estos gérmenes, debido a fenómenos de inmunidad cruzada, producen IgA sérica y secretora antimeningococo, que no solo no lisa, sino que bloquea el proceso lítico de la IgG y de la IgM. Ello se demostró al comprobar que, eliminando la IgA del suero de soldados susceptibles, se restablecía la actividad bactericida frente al meningococo. Por tanto, la presentación epidémica de la enfermedad meningocócica podría depender no sólo de la transmisión aérea del meningococo sino también de la transmisión fecal-oral de estos gérmenes<sup>54</sup>.
- **Inmunidad humoral:** Desempeña un papel trascendental en la defensa frente a la enfermedad meningocócica, como lo corrobora el hecho de que se afectan fundamentalmente los niños, la presentación en ciclos epidémicos, la existencia de inmunidad permanente tras la curación y la agrupación geográfica de determinados tipos de anticuerpos antimeningocócicos. En los niños de corta edad, la incidencia de la enfermedad está relacionada con la desaparición de los anticuerpos maternos que existen hasta el cuarto mes de vida. Es casi imposible detectarlos desde esa edad hasta alrededor de los 8 meses, momento en que se elevan progresivamente<sup>61</sup>.
- **Sistema del complemento:** Individuos con déficits congénitos o adquiridos en la vía terminal común del complemento (C3, C5-C9) o del factor D presentan mayor riesgo de padecer infecciones recurrentes por meningococo. Asimismo el déficit o

disfunción de la properdina incrementa el riesgo tanto de adquisición de la EM como del desarrollo de una forma grave de la misma<sup>62</sup>. Se trata de un trastorno genético ligado al cromosoma Y, lo que ayudaría a explicar el patrón de predominio masculino<sup>1,34,63</sup>. Los déficits de proteína C o proteína S, así como la expresión endotelial disminuida de los receptores de trombomodulina y proteína C predisponen a una mayor gravedad de la EM y al desarrollo de *purpura fulminans*.

- **Miscelánea:** Personas con enfermedades crónicas como síndrome nefrótico, lupus eritematoso sistémico o insuficiencia hepática, o con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, probablemente tienen mayor riesgo de EM, pero muy inferior a la susceptibilidad que presentan frente a otras infecciones como *S. pneumoniae*, al igual que las personas con asplenia anatómica o funcional.
- **Factores genéticos** del huésped. En los últimos años han adquirido especial relevancia. El papel de la genética del huésped tanto en la susceptibilidad, como en la presentación y pronóstico de la EM, especialmente variaciones en el gen del factor H del complemento, condicionan una mayor o menor resistencia a la enfermedad. El conocimiento de este condicionante genético es, precisamente, el punto de partida de la presente tesis.

#### 2.1.5.3.1.3. Factores ambientales

- **El hacinamiento** (en ejército, prisión, peregrinaciones, residencias de estudiantes), medido por el volumen de aire por habitante en la casa, favorece la presentación de la enfermedad. Es el factor más claramente asociado con la prevalencia elevada de portadores<sup>1</sup>.
- **El nivel socio-económico bajo**, muchas veces ligado al hacinamiento, también se ha asociado con mayor número de casos.
- **La convivencia cercana o contacto íntimo** con portadores nasofaríngeos u otros casos de EM, incrementa también el riesgo de adquisición y desarrollo de la enfermedad. El ambiente en el que existe mayor riesgo de adquirir la infección meningocócica es el familiar, entre las personas que conviven en la misma casa y sobre todo entre las que duermen en la misma habitación. En estos casos se han observado tasas de ataque secundario de 2.2 a 2.8 por cada 1.000 habitantes, valores mil veces mayores que los observados en la población (0,23 por cada 100.000 habitantes). Las tasas de ataque secundario en epidemias son mucho más altas que las halladas en investigaciones de casos esporádicos<sup>1</sup>. Durante mucho

tiempo se atribuyó gran importancia al ambiente escolar como factor de riesgo, hasta el punto de adoptarse el cierre de centros tras la presentación de casos. En la actualidad, todos los expertos en la materia coinciden en señalar que el medio escolar no representa un mayor riesgo de adquirir la enfermedad meningocócica. Excepto viviendas, cuarteles, internados y guarderías infantiles, los restantes ambientes como hospitales, fábricas, etc, no representan un mayor riesgo de adquirir la enfermedad. Se ha descrito un mayor riesgo en los militares en épocas de movilización, favorecido por el hacinamiento en los barracones, el estrés y el cansancio. En general, puede afirmarse que el riesgo de contraer la enfermedad es incierto en las personas que no son convivientes domiciliarios, entendiéndose por tales los que duermen en la misma casa<sup>1</sup>.

- **Estación/condiciones ambientales:** La enfermedad meningocócica se presenta en ondas multianuales, con epidemias cada 10-12 años. En las zonas templadas del hemisferio norte, el año epidemiológico de la enfermedad meningocócica abarca de julio a junio; la mayoría de los casos se presentan en los meses de invierno y primavera, lo que se ve favorecido por factores como la mayor concentración de personas en locales cerrados, la baja humedad y el frío<sup>54</sup>.

La enfermedad meningocócica a través de ondas epidémicas extensas ocasionadas por el meningococo A causa miles de muertes en el llamado “cinturón de la meningitis” del África subsahariana. Este cinturón se define entre las latitudes 4º y 16º norte. La predominancia geográfica de las epidemias y su mayor incidencia en estaciones secas así como el descenso de la misma con el comienzo de las lluvias sugieren el posible papel que juegan los condicionantes medioambientales, si bien se desconocen los mecanismos concretos. Se ha postulado que el bajo nivel de humedad y el polvo del desierto pueden alterar la barrera mucosa y/o inhibir los mecanismos de defensa inmune, lo cual favorece la invasión<sup>64</sup>. Un reciente análisis de la distribución epidémica y ambiental de la enfermedad indica que los perfiles de humedad y el tipo de superficie terrestre marcan las áreas de alto y bajo riesgo de epidemia así como la alta densidad poblacional y el polvo del desierto presente en algunas regiones<sup>65</sup>.

- **La exposición activa o pasiva al tabaco:** El efecto del tabaco se cree relacionado con el daño que provoca en el epitelio respiratorio, y la subsiguiente disminución de la función mucociliar y reducción del aclaramiento bacteriano.

### **2.1.5.3.2. Meningococemia y respuesta inflamatoria sistémica**

La respuesta inflamatoria inducida por *N. meningitidis* ha sido estudiada extensamente tanto en pacientes como en diversos modelos experimentales. Una vez alcanza el torrente sanguíneo, el meningococo es reconocido por el sistema inmunológico innato del huésped, e induce una respuesta inflamatoria exagerada y destructiva en la vasculatura, corazón, riñones y resto de órganos. La activación de dicho sistema supone la liberación de citocinas proinflamatorias, la activación del sistema del complemento y la activación descontrolada de la cascada de la coagulación. Esta potente respuesta inmunológica resulta clínicamente en un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, lesión endotelial y fuga capilar, coagulación vascular diseminada, rash purpúrico característico y shock. La combinación de hipoperfusión tisular y coagulopatía puede conducir al fallo multiorgánico y necrosis de las extremidades en casos graves, resultando en ocasiones en la muerte del paciente en horas o dejando secuelas permanentes en los supervivientes (Figura 6).

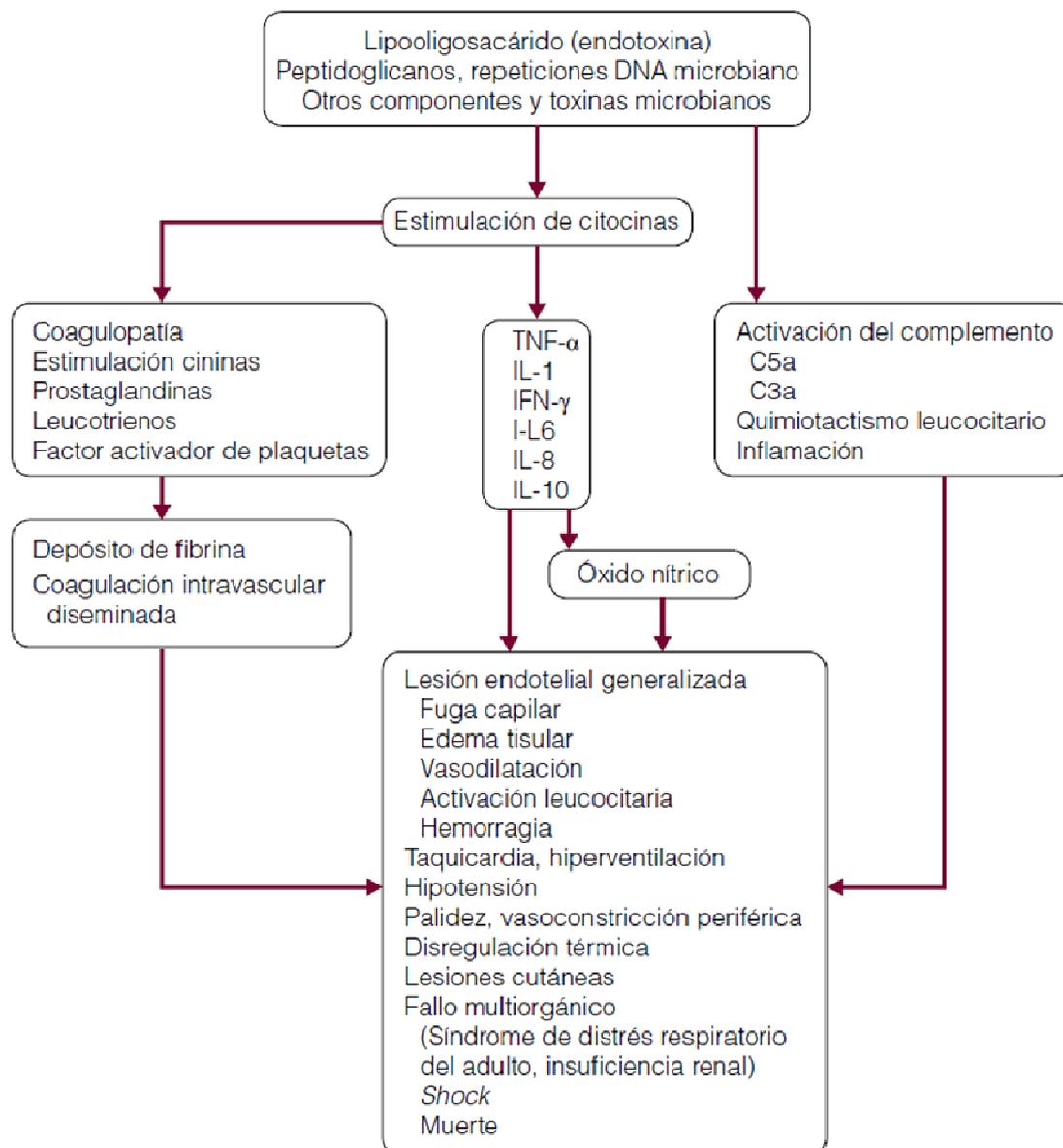


Fig. 6. Fisiopatología de la sepsis meningocócica. Consecuencias clínicas de la activación de la respuesta inflamatoria, la cascada de la coagulación y el sistema del complemento<sup>43</sup>.

### 2.1.5.3.2.1. Mediadores inflamatorios

- **Lipooligosacárido (LOS, endotoxina):** Es el factor más importante de virulencia del meningococo y un elemento crucial en la patogenia de la EM. El LOS de *N. meningitidis* es bioquímicamente similar al lipopolisacárido de la pared celular de las bacterias gram negativas, aunque su componente sacárido carece de cadena lateral (O-antígeno). Así el LOS meningocócico contiene sólo dos cadenas cortas

de sacáridos unidas al subcomponente lipídico A conservado, que actúa como endotoxina. La endotoxina es la responsable principal de la potente actividad biológica del LOS en el huésped. En función de su especificidad por anticuerpos, se han descrito 12 inmunotipos diferentes de LOS.

Una vez alcanza el torrente sanguíneo, *N.meningitidis* libera masivamente endotoxinas dentro de estructuras vesiculares cubiertas de membrana celular externa, que contienen a su vez fosfolípidos, polisacáridos capsulares y otras proteínas de membrana, activando una intensa respuesta inflamatoria.

En las últimas décadas, se ha avanzado mucho en el conocimiento de la respuesta inmunológica innata del huésped frente a la infección, habiéndose descrito lo que se han denominado *patrones moleculares asociados a patógenos* (PAMP). Los PAMP son receptores no clonales localizados en células del sistema inmunológico innato, capaces de reconocer ciertas estructuras moleculares conservadas dentro de una misma clase de patógenos, y desencadenar respuestas inmunológicas innatas diferenciadas.

Hoy sabemos que los receptores *Toll-like 4* (TLR4) juegan un papel clave en la respuesta innata y patogenia de la EM, al reconocer específicamente el lipopolisacárido de microorganismos gram negativos, y desencadenar subsiguientemente una potente respuesta inmunológica diferenciada<sup>66</sup>. Así, la endotoxina meningocócica se une a los TLR4 de monocitos-macrófagos, previamente asociados a la proteína MD-2 (*Myeloid Differentiation protein*) y al CD14<sup>34</sup>. La unión de la endotoxina al TLR4 genera una señal transmembrana, que resulta finalmente en la producción masiva de citocinas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL1, IL6, IL8, etc), mediante la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) y otras vías de citosinas. Esto se traduce clínicamente en un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, vasculitis y fuga capilar generalizada, coagulación intravascular diseminada (CID) y shock, tan característicos de la sepsis meningocócica.

Curiosamente, diversos estudios han demostrado una correlación estrecha entre los niveles de LOS circulantes y la gravedad y pronóstico de la sepsis meningocócica<sup>67</sup>. Además, se ha demostrado la presencia de LOS en altas concentraciones en el líquido céfalo-raquídeo (LCR) de pacientes con meningitis meningocócica<sup>34</sup>.

Por otro lado, otras moléculas bacterianas distintas a los LOS también parecen capaces de activar el sistema inmunológico innato del huésped, aunque de forma más débil y con significado incierto en la fisiopatología de la EM. Entre ellas, la

porina PorB activa la vía del TLR2, el ADN meningocócico activa el TLR9 y determinados fragmentos de los peptidoglicanos pueden activar NOD1 y NOD2.

- **Citocinas:** La liberación de las citocinas es un fenómeno clave en la patogénesis de la sepsis meningocócica. En respuesta al LPS bacteriano, los monocitos y macrófagos se activan y liberan al torrente sanguíneo grandes concentraciones de citocinas proinflamatorias, junto con otras sustancias como el óxido nítrico (NO), leucotrienos, prostaglandinas, o el factor activador de plaquetas. Todos estos productos contribuyen a conformar la potente respuesta inflamatoria del huésped contra la infección, habiéndose observado una correlación entre las concentraciones plasmáticas de muchas de ellos y la gravedad y pronóstico de la EM<sup>68</sup>.

Entre las citocinas proinflamatorias producidas se encuentran el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y las interleucinas IL-1, IL-6, IL-8, e IL-12. Las más relevantes y primeras en desencadenar la potente cascada inflamatoria son el TNF- $\alpha$  y la IL-1.

El TNF- $\alpha$  se considera el principal responsable del shock séptico asociado a la meningococemia. Su liberación produce la activación local del endotelio vascular, con la consiguiente liberación de óxido nítrico, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Además, el TNF- $\alpha$  activa y aumenta la adhesión plaquetaria, siendo clave en la patogénesis de la coagulación vascular diseminada característica de la EM. El TNF- $\alpha$  es también un pirógeno endógeno, y estimula la producción de IL-8, favoreciendo la quimiotaxis de linfocitos y polimorfonucleares<sup>69</sup>.

Por su parte, la IL-1 induce la liberación de histamina por los mastocitos, contribuyendo así a la vasodilatación periférica y fuga capilar. Además, induce fiebre a través de la producción de prostaglandinas, promueve la síntesis hepática de proteínas de fase aguda, e induce la liberación de IL-6 e IL-8. Todo ello contribuye a la intensa respuesta inflamatoria del organismo frente al meningococo, mediante la activación de los linfocitos *T-helper*.

Las concentraciones plasmáticas de IL-6 aumentan algo más tardíamente, y se mantienen elevadas hasta la recuperación clínica, al contrario de lo que sucede con el TNF- $\alpha$  o la IL-1, cuyas concentraciones declinan rápidamente. La IL-6 se produce por monocitos/macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en respuesta al LOS y a la IL-1. Entre otros efectos, la IL-6 estimula la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno, promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas productoras de anticuerpos y facilita la maduración de precursores hematopoyéticos. Además, ha demostrado jugar un papel esencial en

la disfunción miocárdica asociada a la EM, correlacionando su concentración sérica con la gravedad de la enfermedad.

La IL-8 es un potente factor quimiotáctico y activador de los neutrófilos. Éstos migran a las zonas de inflamación y se adhieren a las células endoteliales de la vasculatura periférica. Curiosamente, la leucopenia se ha relacionado con la gravedad de la EM. La degranulación local de los neutrófilos desencadena una tormenta de enzimas proteolíticas y radicales libres, que además de facilitar la lisis bacteriana, contribuye aún más al daño endotelial vascular.

Por otro lado, la IL-12 parece ser importante en la diferenciación de los linfocitos Th1, y en la producción de INF- $\gamma$  por los linfocitos T y las células *natural killer* (NK). Los niveles de IL-12 en la sepsis meningocócica también se han correlacionado con el pronóstico y gravedad de la enfermedad<sup>70</sup>.

Tras su liberación aguda, las concentraciones sistémicas de TNF- $\alpha$  y del resto de citocinas proinflamatorias (a excepción de la IL-6), sufren un descenso rápido. Esto sugiere que tras un estado proinflamatorio inicial, existe una transición a un estado antiinflamatorio, en el que predominan citocinas contrarreguladoras como el antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra), los receptores solubles del TNF (sTNFRs) y la IL-10. De hecho, se cree que el balance entre las citocinas proinflamatorias y sus antagonistas pueda influenciar el pronóstico de la EM. Así, el IL-1Ra es capaz de modular la acción de la IL-1 mediante su unión competitiva al receptor, mientras que la unión del TNF- $\alpha$  a sus células diana induce la liberación de receptores solubles de TNF (sTNFR) que intentan proteger a la célula de la activación del TNF- $\alpha$ . Por otro lado, la IL-10 es la principal citocina antiinflamatoria e inmunosupresora, capaz de inhibir la síntesis de TNF- $\alpha$  o IL-1, entre otras. Además, la IL-10 estimula la producción de IL-1Ra y sTNFR y es un potente supresor de la actividad procoagulante del LPS sobre los monocitos.

- **Óxido nítrico:** Es un potente vasodilatador derivado del endotelio, que controla el tono vascular en reposo. En respuesta a la inflamación, las células endoteliales producen la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) que provoca la liberación masiva de NO. Esta superproducción de NO provoca la vasodilatación periférica, hipotensión y alteración de la contractilidad miocárdica. Se ha demostrado la presencia de concentraciones elevadas de metabolitos del NO en la EM. Diversos intentos terapéuticos con inhibidores de la sintasa de óxido nítrico no han demostrado ser eficaces en el tratamiento de la sepsis meningocócica.

- **Complemento:** El sistema del complemento es esencial en la defensa innata del huésped frente a la infección meningocócica. Además, es un importante mecanismo efector de la inmunidad adaptativa, ya que contribuye a la opsonización y lisis bacteriana en presencia de anticuerpos. Este papel clave del complemento en la defensa del huésped frente a la EM se pone de relieve en individuos con déficit congénito o adquirido de las proteínas del complemento, incluyendo properdina y factor D, quienes presentan un riesgo significativamente mayor de adquirir EM a lo largo de sus vidas<sup>71</sup>.

Más allá de su función protectora frente a la adquisición de la infección, el sistema del complemento se halla también ligado a la respuesta inflamatoria y activación de la coagulación. En condiciones normales, el sistema del complemento está altamente controlado por distintas proteínas reguladoras. Factores de membrana como el CD46, proteínas plasmáticas como el C1-inhibidor o el factor H del complemento (inhibidor clave de la vía alternativa del complemento) controlan la activación inapropiada de este sistema, evitando el daño a las propias células del huésped<sup>72</sup>. Prueba de la importancia del factor H en el proceso de defensa de nuestro organismo frente al meningococo, es que éste dispone de receptores específicos para ligar el factor H humano (fHbp), y evadir así nuestra sistema inmunológico innato. De esta manera, en respuesta a la invasión y proliferación del meningococo en el organismo, se produce una activación extensa y descontrolada de la cascada del complemento, en particular de la vía alternativa, jugando un papel crítico en la patogénesis de la EM y en el daño tisular resultante<sup>73</sup>. De hecho se ha visto que los individuos con déficit de las proteínas del complemento, a pesar de tener un aumento del riesgo de adquirir la enfermedad, suelen tener una evolución menos grave, tal vez reflejando el hecho de que estos casos son más frecuentemente causados por grupos capsulares infrecuentes como W135 o X.

Existen 2 vías principales de activación del sistema de complemento: la vía clásica, mediada por anticuerpos, y la vía más recientemente descrita, ligada a la lectina de unión a manosa (MBL) que se inicia tras la unión de la MBL a los carbohidratos microbianos. Además, existe una tercera vía alternativa que se activa tras la unión directa de componentes del complemento a la superficie del patógeno y que amplifica la acción de las dos vías iniciales<sup>62</sup>. Cada vía supone una serie de pasos proteolíticos que activan en cascada al resto de factores del complemento (Figura 7).

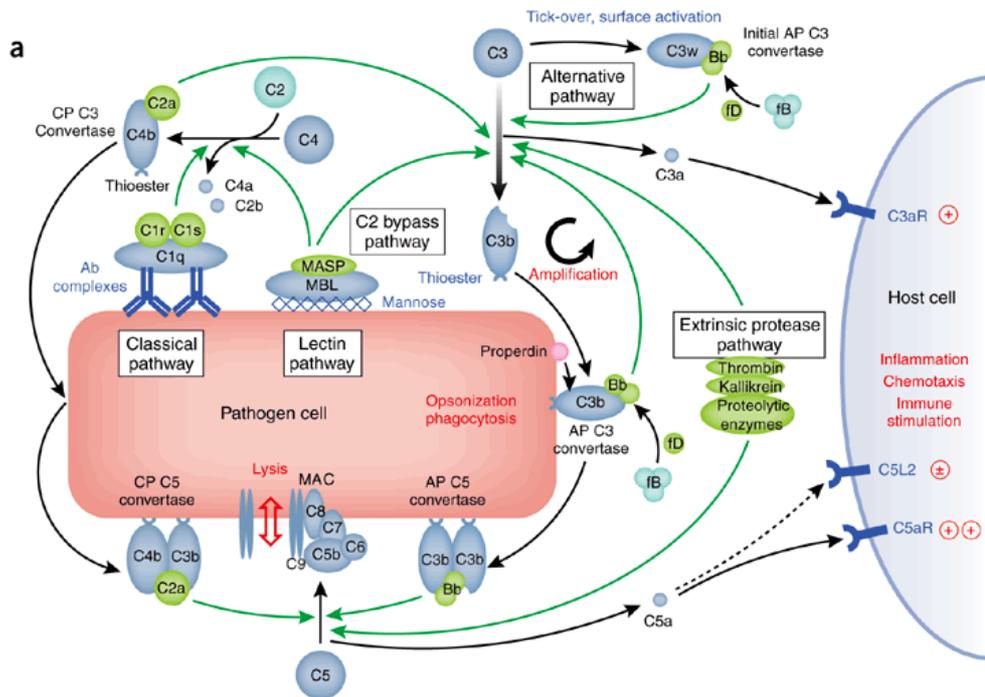


Fig. 7. Vías de activación del sistema del complemento. Modificado de *Ricklin B et al*<sup>74</sup>.

Así pues, el sistema del complemento reconoce al meningococo y se activa. Esto pone en marcha una cascada de fenómenos que contribuyen a la respuesta inflamatoria del huésped contra la infección. Entre ellos se encuentran la opsonización y fagocitosis del meningococo por macrófagos y neutrófilos; la lisis bacteriana a través del complejo de ataque de membrana C5-9; y la retroalimentación de la respuesta inflamatoria vía fragmentos del complemento (C3a, C4a y C5a)<sup>75</sup>. Estos últimos, llamados anafilotoxinas, se unen a basófilos e inducen su degranulación, con la consiguiente liberación de histamina, vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar. Asimismo, las anafilotoxinas aumentan la adherencia de monocitos y neutrófilos al endotelio para iniciar su extravasación y contribuyen al daño tisular observado en la EM.

#### 2.1.5.3.2.2. Lesión endotelial y fuga capilar

Durante la fase inicial de la sepsis meningocócica, el LOS, las citocinas y otros mediadores inflamatorios (leucotrienos, tromboxano A, cininas, factores de

complemento, etc) dañan y activan el endotelio vascular, el cual sufre un cambio de estructura y función<sup>63</sup>. Las células endoteliales se redondean, aumentan su adhesividad a los leucocitos, liberan óxido nítrico y citocinas inflamatorias, y pasan de un estado anticoagulante a uno procoagulante. La destrucción o disfunción de los glicosaminoglicanos (GAG) de la superficie endotelial, responsables de mantener la unión entre las células y restringir su permeabilidad a proteínas con carga eléctrica negativa como la albúmina, aumenta la permeabilidad del endotelio vascular, lo que resulta en la característica fuga capilar y edema. Estudios anatomopatológicos de lesiones cutáneas de niños con sepsis meningocócica han demostrado meningococos en el interior de células endoteliales, rodeados de complemento y depósitos de inmunoglobulinas<sup>66</sup>.

#### **2.1.5.3.2.3. Coagulación y fibrinólisis**

Los trastornos de la coagulación y fibrinólisis son característicos de los pacientes con EM, observándose un desbalance profundo entre la activación excesiva del sistema de coagulación, la inhibición de la fibrinólisis y sus respectivos moduladores. En respuesta a las altas concentraciones de endotoxina y TNF- $\alpha$ , se activa potentemente la cascada de la coagulación, tanto por la vía extrínseca (induciendo la expresión masiva del factor tisular en células endoteliales y monocitos que activará a su vez al factor VII), como por la vía intrínseca (factor XII). La manifestación más grave de esta coagulopatía es la coagulación intravascular diseminada (CID), que conduce a microtrombosis generalizada y diátesis hemorrágica por consumo. Así, aunque los tiempos de coagulación del paciente puedan estar muy alargados, existe una tendencia general a la trombosis, con trombocitopenia marcada secundaria al consumo rápido de plaquetas activadas. La CID contribuye de manera crítica a la patología y pronóstico de la sepsis meningocócica, agravando la hipoperfusión e hipoxia tisular que conducen al fallo multiorgánico fulminante y muerte del paciente<sup>76</sup>.

A nivel microscópico, la CID se traduce en daño endotelial difuso y microtrombos de fibrina ricos en leucocitos en arteriolas y capilares, muchas veces con la presencia de meningococos en las lesiones. La hemorragia focal y necrosis secundaria que se manifiesta inicialmente como púrpura cutánea, puede afectar a la totalidad de los órganos, incluyendo corazón, sistema nervioso central, o glándulas suprarrenales, las cuales son particularmente vulnerables<sup>66</sup>. La hemorragia suprarrenal masiva sin vasculitis, conocida como síndrome de Waterhouse-Friderichsen, es común en la

meningococemia fulminante y puede resultar en una insuficiencia suprarrenal aguda, que aun sin ser la causa primaria del fracaso cardiovascular, complica aún más el manejo clínico de estos pacientes.

De forma concomitante, los anticoagulantes naturales del organismo y el sistema de la fibrinólisis se activan y consumen en respuesta a la CID. Así, las concentraciones plasmáticas de proteína C, proteína S y antitrombina III en pacientes con sepsis meningocócica grave se encuentran marcadamente disminuidas, con la consiguiente elevación de complejos trombina-antitrombina y plasmina-antiplasmina circulantes, reflejo de la activación descontrolada de la trombina y plasmina respectivamente<sup>77</sup>. La proteína C se activa a través del complejo trombina-trombomodulina de las células endoteliales, inhibiendo los factores de coagulación Va y VIIIa. Intentos terapéuticos con proteína C activada parecen indicar un beneficio en el tratamiento de la purpura fulminans meningocócica, pero no han proporcionado resultados concluyentes<sup>78</sup>. Por otro lado, la cascada de la fibrinólisis, iniciada por la acción del activador tisular del plasminógeno (tPA), es contrarregulada por el enzima inhibidor del tPA (PAI-1). De hecho, en pacientes con EM fulminante y CID se observan concentraciones circulantes de PAI-1 significativamente superiores a las de tPA, lo cual indica una inhibición significativa de la fibrinólisis y una tendencia procoagulante. Estos altos niveles plasmáticos de PAI-1 han demostrado ser un importante predictor de fatalidad. Así, un polimorfismo genético en la región promotora del gen que codifica el PAI-1 (4G/5G) y que resulta en concentraciones especialmente elevadas de PAI-1, se ha correlacionado directamente con la mortalidad de la EM<sup>79-80</sup>. De similar modo, *Binder et al* han demostrado una correlación entre el polimorfismo 4G4G del mismo gen y el desarrollo de CID en la sepsis meningocócica<sup>81</sup>.

#### **2.1.5.3.2.4. Disfunción miocárdica**

El desarrollo progresivo de inestabilidad hemodinámica es característico de la sepsis meningocócica, pudiendo resultar en un fracaso multiorgánico fulminante y muerte del paciente en horas. A pesar de que la causa inicial del fracaso cardiovascular es el fallo circulatorio periférico, hoy sabemos que la función miocárdica se encuentra deprimida en un gran número de casos, causando shock grave refractario a inotrópicos. De hecho, la disfunción miocárdica es más prevalente y marcada en la sepsis meningocócica que en otras formas de bacteriemia por gram negativos. Estudios postmortem han demostrado la presencia de miocarditis histológica en más de la mitad

de pacientes fallecidos por EM<sup>82</sup>. Así pues, la disfunción miocárdica ha demostrado ser un importante marcador pronóstico en la sepsis meningocócica, contribuyendo de forma crítica a la letalidad de la infección.

Desde el punto de vista fisiopatológico, diversas citocinas proinflamatorias ejercen una acción depresora sobre el miocardio. De todas ellas, la más relevante es la IL-6, como han podido demostrar los estudios realizados por *Pathan N. et al*<sup>83</sup>. La unión de IL-6 a su receptor en los miocitos causa la homodimerización del receptor de membrana gp130 y la activación de proteínas tirosina quinasas y de múltiples factores de transcripción, que conducen a la activación de la vía de la quinasa p38MAPK (p38 *mitogen-activated protein kinase*), se cree que responsable última del efecto depresor miocárdico de la IL-6 en la sepsis meningocócica. Estos estudios han demostrado, además, que la IL-6 no sólo reduce la contractilidad basal del miocito in vitro, sino su respuesta a la isoprenalina; y que la inactivación de p38MAPK logra restaurar la sensibilidad del miocito al inotrópico<sup>84</sup>.

#### **2.1.5.3.3. Meningitis**

A partir de la diseminación hematógona, la infección meníngea sucede en más del 50% de los pacientes de EM. Se trata de la presentación clínica más frecuente de la enfermedad, pudiendo acompañarse de sepsis en un 10-15% de casos<sup>47</sup>. El escaso número de bacterias identificadas capaces de invadir las meninges sugiere que son necesarios factores de virulencia específicos para lograr penetrar el espacio subaracnoideo. *N. meningitidis* es el patógeno conocido con una afinidad mayor por invadir las meninges.

En los casos de meningitis, tras una bacteriemia de mayor o menor grado, *N. meningitidis* alcanza la barrera hemato-encefálica (BHE) del huésped y se adhiere a su endotelio, pudiendo replicarse y formar microcolonias en la superficie apical de las células. El nivel de bacteriemia está directamente correlacionado con la invasión meníngea de la bacteria, probablemente debido al aumento proporcional de la probabilidad de interacción del meningococo con la BHE. Una vez unido a la superficie endotelial, *N. meningitidis* penetra en el espacio subaracnoideo del huésped, posiblemente tras experimentar variación de fase de sus fimbrias. El lugar preciso y mecanismo de entrada de la bacteria en el LCR no ha sido aún completamente dilucidado. Inicialmente se creyó que el meningococo utilizaba preferentemente los plexos coroideos de los ventrículos laterales para atravesar la BHE. Sin embargo, la

meningitis debería asociarse a ventriculitis en este caso, hecho no corroborado en la clínica. Estudios recientes apuntan a que la adhesión bacteriana a las células endoteliales induce una señalización intracelular que resulta en la disrupción de las uniones intercelulares del endotelio y la trans migración de los meningococos a través del endotelio, con la consiguiente entrada en el espacio subaracnoideo<sup>85</sup>. El receptor endotelial de adhesión meningocócica aún no se ha identificado, pero los *pili* tipo IV son los responsables bacterianos de la interacción inicial con la célula endotelial.

Una vez en el espacio subaracnoideo, carente de los principales mecanismos de defensa humorales y celulares del huésped, la proliferación bacteriana es exponencial, alcanzando concentraciones de 3-5 log<sub>10</sub> veces superiores que las presentes en plasma. La liberación de endotoxina en el LCR desencadena la activación de citocinas proinflamatorias y degranulación de neutrófilos, provocando una respuesta inflamatoria compartimentalizada, que se traduce clínicamente en un cuadro florido de meningitis con rigidez de nuca y cefalea. A diferencia de lo que ocurre en pacientes con sepsis, el nivel de citocinas en LCR no se ha correlacionado con la gravedad o pronóstico del cuadro.

A nivel anatómico-patológico, la meningitis se caracteriza por la presencia de células inflamatorias agudas en las leptomeninges y espacios perivascuales. La cerebritis focal es un hallazgo infrecuente pero posible, que puede conducir a un cuadro de edema cerebral y aumento de la presión intracraneal. La respuesta inflamatoria es, sin embargo, la principal causa del daño neurológico asociado a la meningitis meningocócica. Intentos de suprimirla mediante el uso de corticoides no han proporcionado resultados concluyentes en estudios pediátricos, aunque parece existir un beneficio en su uso en niños de países industrializados<sup>86</sup>.

#### **2.1.6. Manifestaciones clínicas**

La meningitis y la sepsis son las principales formas de manifestación de la enfermedad meningocócica invasiva.

La meningococemia o sepsis meningocócica fulminante, con o sin meningitis asociada, es la forma más temida de esta enfermedad, ya que tiene un curso rápidamente progresivo y a menudo fatal. Aparece en un 20% a un 30% de las infecciones meningocócicas<sup>1,47</sup>. Se debe a la acción de la endotoxina o lipopolisacárido liberado por la bacteria, endotoxina que alcanza su mayor concentración en sangre en esta forma de presentación de la enfermedad<sup>34,87</sup>. La meningococemia se caracteriza

por lesiones purpúricas diseminadas que progresan y confluyen formando grandes placas equimóticas, que cubren extensas áreas de la piel (Figura 8). La enfermedad progresa rápidamente a *shock* y fallo multiorgánico. Es muy frecuente que no haya meningitis o que en el LCR se visualicen o aislen meningococos sin que se produzca pleocitosis, lo que traduce la incapacidad del sujeto para producir respuesta inflamatoria.



**Fig. 8. Manifestaciones cutáneas características de la enfermedad meningocócica. Lesiones inicialmente petequiales y purpúricas (a y b), que pueden acabar confluyendo y formando placas equimóticas, que cubren extensas áreas de piel (c y d).**

La trombosis generalizada ocasiona isquemia en tejidos cutáneos y subcutáneos, que en ocasiones condicionan amputaciones de miembros e injertos. Entre los factores de mal pronóstico se encuentran: la presencia de shock en la presentación inicial, un recuento leucocitario menor a 5000/mm<sup>3</sup>, trombocitopenia y purpura fulminante<sup>47</sup>.

La meningitis es la forma de presentación del 50% al 70% de los casos de enfermedad<sup>1,47,88</sup>. Sus síntomas son similares a los de las meningitis ocasionadas por

otras bacterias, aunque los signos focales y el riesgo de secuelas suelen ser menores que en las ocasionadas por neumococo o por *H Influenzae*<sup>89</sup>. Entre un 20 y un 60% de los pacientes, además, presentarán un rash purpúrico acompañante. En los menores de 2 años la sintomatología suele ser mucho más inespecífica.

Mucho más infrecuente, y especialmente en adultos, la enfermedad meningocócica se puede manifestar de forma crónica con fiebre intermitente, de más de una semana de duración, exantema localizado o generalizado (maculopapuloso, vesicular, pustular, petequeal o purpúrico), y artralgias migratorias. Si no se trata, la enfermedad se prolonga de 4 a 16 semanas<sup>47,90-91</sup>, aunque en ocasiones progresa a otras formas más graves. Clínicamente se asemeja a una vasculitis cutánea o a una artritis gonocócica reactiva.

Excepcionalmente, el meningococo puede ocasionar otras formas clínicas, como artritis, conjuntivitis<sup>92</sup>, neumonía, endocarditis o pericarditis<sup>51</sup>.

### 2.1.7. Diagnóstico

El diagnóstico precoz de la enfermedad meningocócica invasiva es particularmente difícil y requiere un elevado grado de sospecha clínica. En la mayor parte de los casos los pacientes requerirán una actuación médica inmediata, sin esperar a confirmaciones microbiológicas<sup>93-94</sup>. La prueba diagnóstica más sensible es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite detectar directamente ADN meningocócico, y cuyo resultado no se ve afectado por tratamiento antibiótico previo. Se utiliza también para la identificación definitiva de genogrupos (serogrupos) y genosubtipos (serosubtipos), siendo la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa la más usada. No obstante, el cultivo de la bacteria de un fluido corporal normalmente estéril, como la sangre o el líquido cefalorraquídeo (LCR), o la tinción de Gram del LCR, aún continúan siendo los métodos más ampliamente utilizados en el medio hospitalario, aunque es importante reseñar que la sensibilidad disminuye ostensiblemente si la muestra se obtiene tras haber iniciado tratamiento antibiótico<sup>93,95</sup>. La positividad del hemocultivo en caso de enfermedad meningocócica invasiva baja de un 50% hasta un 5% cuando se ha realizado tratamiento antibiótico previo<sup>96</sup>. Hay que tener en cuenta que la concentración de meningococos en sangre puede ser baja, de menos de una unidad formadora de colonias (UFC) por mililitro<sup>97</sup> y probablemente no es constante en el tiempo. Por ello se recomienda realizar al menos dos extracciones con la mayor cantidad de muestra posible (5-10 mL por extracción en adultos, y 1-3 mL en niños).

Una vez inoculados, los hemocultivos deben mantenerse a temperatura ambiente y ser enviados al laboratorio lo antes posible.

El examen del LCR obtenido por punción lumbar permite la confirmación microbiológica en casi el 90% de los casos<sup>98</sup>, pero muchas veces la punción lumbar está contraindicada (insuficiencia cardiorrespiratoria, aumento de la presión intracraneal por riesgo de herniación cerebral y coagulopatía), ya que puede causar deterioro en algunos pacientes y afectar aún más a la función cardiovascular en caso de *shock*. Debido a esto, la realización de la punción lumbar no debe ser prioritaria en la valoración inicial del paciente (Tabla 7).

**Tabla 7. Contraindicaciones para la realización de punción lumbar en pacientes con enfermedad meningocócica. Modificado de Moraga et al<sup>99</sup>.**

Contraindicaciones para la realización de punción lumbar
Signos sugestivos de hipertensión intracraneal <ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución o fluctuación del nivel de consciencia (escala de Glasgow &lt; 9 o descenso ≥ 3 puntos en 1 hora)</li> <li>- Bradicardia relativa e hipertensión arterial</li> <li>- Focalidad neurológica</li> <li>- Movimientos de decortización o descerebración</li> <li>- Midriasis, anisocoria o pupilas poco reactivas</li> <li>- Papiledema</li> <li>- Ojos de muñeca</li> </ul>
Shock
Púrpura extensa o que se disemina rápidamente
Después de presentar convulsiones y hasta su estabilización
Anomalías de la coagulación
Infección superficial local en el lugar de la punción
Insuficiencia respiratoria

Los métodos que no incluyen cultivos, como el uso de kits comerciales para la detección de antígenos polisacáridos en el LCR, se han desarrollado para facilitar y mejorar el diagnóstico del laboratorio. Estos métodos son rápidos y específicos, y pueden proporcionar un diagnóstico preciso del grupo, pero pueden producir con facilidad falsos negativos y presentan reactividad cruzada con otros serogrupos,

especialmente en la enfermedad por el serogrupo B<sup>95</sup>. Por ello, estos métodos no se incluyen generalmente entre los aceptados para confirmar un caso de enfermedad.

*N. meningitidis* también puede estar presente en otros líquidos normalmente estériles, como el sinovial, el pleural y el pericárdico, por lo que estas muestras también serán de utilidad para el diagnóstico. La toma se hace por punción percutánea de manera aséptica, para evitar la contaminación con la flora cutánea, y las muestras deben enviarse de inmediato al laboratorio manteniéndolas a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

El aislamiento de la bacteria en los frotis nasofaríngeos no tiene valor diagnóstico, tan solo indican una colonización, por lo que no se recomienda su utilización para el diagnóstico de la enfermedad invasiva.

### **2.1.8. Intervenciones terapéuticas**

La EM invasiva es una de las infecciones potencialmente más fulminantes y destructivas conocidas en el ser humano, y debe ser vista siempre como una emergencia médica. A pesar del gran avance que la introducción de vacunas y antibióticos han supuesto en la prevención y pronóstico de la EM, su mortalidad puede ser prácticamente del 100% sin tratamiento. El pronóstico de un paciente con EM depende principalmente de su edad; de la forma de presentación clínica (septicemia/meningitis); de las características del microorganismo (complejo clonal); y del manejo clínico-terapéutico. De estos factores, sólo podemos influir en el manejo terapéutico del paciente. De acuerdo con la evidencia existente en la actualidad, los aspectos más importantes del manejo de la EM son: 1) Reconocimiento precoz de la enfermedad; 2) Inicio precoz del tratamiento antibiótico; 3) Tratamiento agresivo del shock; 4) Derivación temprana a un centro hospitalario-terciario con Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos; 5) Monitorización clínica del paciente estrecha y evaluación pronóstica periódica<sup>100</sup>.

Se describen a continuación los principales tratamientos empleados en el manejo de la enfermedad meningocócica, las evidencias que sustentan su utilidad y sus indicaciones vigentes, clasificados en función del mecanismo de acción.

### 2.1.8.1. Reconocimiento de la enfermedad meningocócica

Dado el posible carácter fulminante de la sepsis meningocócica, el reconocimiento precoz de la enfermedad e instauración temprana del tratamiento son vitales. Las características más comunes de la EM son el exantema petequeal, la meningitis y/o la septicemia. Debe instruirse a los padres en el reconocimiento de las petequias en niños febriles y la necesidad de evaluación médica inmediata en caso de su aparición.

### 2.1.8.2. Tratamiento antibiótico

Los antibióticos representan la piedra angular en el tratamiento de la infección meningocócica. Se debe iniciar el tratamiento empírico tan pronto como se sospeche la infección meningocócica, sin esperar a la confirmación etiológica<sup>101</sup>. El objetivo fundamental de los antibióticos es alcanzar rápidamente una concentración bactericida en sangre y/o LCR, frenar la proliferación exponencial del meningococo, y así mitigar la endotoxemia y la cascada inflamatoria secundaria, previniendo secuelas y mortalidad.

Debido a la rapidez en la que progresa frecuentemente la EM, no resulta sorprendente que posponer la administración del antibiótico empeore el pronóstico del paciente<sup>102</sup>. Sin embargo, a pesar de ser recomendado en muchos países, no existe consenso sobre el beneficio de administrar antibióticos en el ámbito pre-hospitalario, habiendo demostrado diversos estudios resultados inconsistentes<sup>100</sup>. Con los datos actuales, y no habiendo evidencia de que el tratamiento antibiótico provoque la liberación masiva plasmática de endotoxina y agravamiento de la respuesta inflamatoria (reacción de Herxheimer), parece prudente administrar la primera dosis plena de antibiótico tan pronto como se sospeche la EM. Recientemente, se ha evaluado de forma aleatorizada doble ciego las ventajas potenciales de la administración del antibiótico en infusión continua junto con paracetamol frente a la administración pauta convencional en niños con meningitis bacteriana en Angola; sin poderse demostrar ningún impacto significativo de esta opción posológica en el pronóstico de la infección<sup>103</sup>.

La elección empírica del antibiótico debe hacerse en función de nuestro contexto epidemiológico, e inicialmente debe cubrir otros posibles causantes de meningitis o sepsis en la infancia, fundamentalmente el *S. pneumoniae*<sup>104</sup>. Los antibióticos de elección son los betalactámicos. Si la primera dosis es prehospitalaria, la bencilpenicilina o la ceftriaxona intramuscular son buenas opciones. Tras el ingreso

hospitalario y hasta la confirmación microbiológica, se recomienda tratar empíricamente con cefotaxima o ceftriaxona endovenosa, junto con vancomicina (60 mg/kg/día). El cloranfenicol sigue siendo una alternativa válida para países con bajos recursos. Tras el diagnóstico etiológico, se puede plantear continuar el tratamiento con cefalosporinas de tercera generación o cambiar a penicilina, siempre y cuando la cepa de *N. meningitidis* se demuestre sensible mediante antibiograma. En este sentido, es importante tener en cuenta que la sensibilidad del meningococo a la penicilina está disminuyendo mundialmente, debido al descenso en la afinidad de la proteína de unión a la penicilina 2 (PBP2) bacteriana. España presenta la tasa de resistencia moderada a penicilina de *N. meningitidis* ( $>0.06 \text{ mgL}^{-1}$  y  $<1 \text{ mgL}^{-1}$ ) mayor de Europa, superior al 50%<sup>105</sup>. La eficacia del tratamiento con penicilina en estos casos no puede garantizarse<sup>106</sup>.

El tratamiento se suele mantener de 5 a 7 días, tanto para la meningococemia como para la meningitis, aunque pautas de 4 días con ceftriaxona han demostrado ser igualmente efectivas<sup>107</sup>. La duración del tratamiento en otras formas infrecuentes de EM no está establecida, siendo la recomendación tratar hasta que los signos clínicos y analíticos de infección hayan desaparecido. En África la meningitis epidémica se suele tratar con una dosis única de cloranfenicol o ceftriaxona intramuscular.

### **2.1.8.3. Tratamiento de la meningococemia**

#### **2.1.8.3.1. Resucitación inicial y tratamiento del shock séptico**

El fracaso cardiovascular, consecuencia del daño endotelial, vasodilatación, fuga capilar y depresión miocárdica inducidas por el meningococo, es la primera causa de muerte por meningococemia. Dado su potencial curso fulminante, el reconocimiento temprano del shock y la instauración precoz y enérgica del tratamiento son cruciales. Signos clínicos comunes de shock son la taquicardia, un relleno capilar  $> 2$  segundos, pies y manos fríos, piel pálida o grisácea, distress respiratorio, disminución o alteración del estado de conciencia y disminución de la diuresis. El objetivo primordial es reinstaurar el volumen sanguíneo circulante con la administración agresiva de fluidos endovenosos. Se recomienda seguir las guías generales de resucitación cardiopulmonar pediátricas y Surviving Sepsis Campaigning (<http://www.survivingsepsis.org/>)<sup>108</sup>, además de las NICE guidelines inglesas (<http://guidance.nice.org.uk/CG102>) para el manejo del shock meningocócico<sup>109</sup>. El

traslado temprano a un centro con Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos debe hacerse de forma temprana y siempre por un equipo de transporte experto<sup>101</sup>.

#### **2.1.8.3.1.1. Oxigenoterapia y soporte respiratorio**

Después de asegurar que la vía aérea sea permeable, se recomienda la administración de oxigenoterapia a altas concentraciones de forma rutinaria durante la evaluación y manejo inicial, con el fin de restablecer el desequilibrio entre las demandas y la extracción tisular de oxígeno características del shock. Si no existen problemas con la vía aérea o respiración, debe darse prioridad a la evaluación y tratamiento del fracaso circulatorio. Las indicaciones para la intubación endotraqueal inmediata (siempre que sea posible con tubo con balón) son la hipoxia con distress respiratorio grave que sugieren la progresión a edema de pulmón; el shock refractario a la resucitación de volumen; y la disminución del nivel de conciencia (escala de Glasgow  $\leq 8$ , o descenso de 3 puntos en 1 hora) o la presencia de signos de hipertensión endocraneal. Los beneficios de la intubación temprana incluyen la reducción del consumo de oxígeno miocárdico y de la musculatura respiratoria, y la aplicación de presión positiva al final de la espiración.

#### **2.1.8.3.1.2. Acceso vascular**

En estos pacientes es preciso obtener un acceso vascular de forma inmediata. Se recomienda insertar al menos dos vías periféricas del mayor diámetro posible o una vía intraósea en los primeros 5-10 minutos. Extraer muestras sanguíneas para glucemia, gasometría, hemograma, bioquímica, coagulación, pruebas cruzadas y hemocultivo y corregir glucemia e hipocalcemia si necesario. El acceso venoso central será necesario en el manejo del paciente en shock para la administración de fármacos vasoactivos y monitorización de la saturación venosa central (ScvO<sub>2</sub>). Sin embargo, su obtención no debe demorar la resucitación inicial del paciente, que puede y debe realizarse por la vía que con más rapidez se pueda obtener (ya sea periférica o intraósea).

### 2.1.8.3.1.3. Fluidoterapia

El objetivo principal del tratamiento del shock séptico es mantener una adecuada oxigenación y perfusión tisular. Para ello resulta prioritario restaurar el volumen intravascular con la administración enérgica y precoz de fluidos, lo cual se ha asociado a una mejora de la supervivencia en niños con shock séptico<sup>110-111</sup>.

Se recomienda la administración inicial de un bolo de 20 ml/kg de una solución cristalinoide o coloide en 5-10 minutos, y repetir inmediatamente en función de la respuesta. Usualmente, a partir de 60 ml/kg de volumen existe riesgo de desarrollar edema de pulmón, y debe plantearse la ventilación mecánica. No es infrecuente que en las primeras 24 horas, se precisen cantidades de volumen dos o tres veces superiores a las propias volemias del niño. La expansión de volumen se combina normalmente con soporte vasoactivo e inotrópico con dopamina, dobutamina, adrenalina o noradrenalina. La presencia de meningitis concomitante no justifica la limitación de la fluidoterapia, pero exige ser más cautos con la reexpansión de la volemia si existen signos de edema cerebral.

Es esencial monitorizar de forma continua la respuesta del niño a la fluidoterapia y guiar así nuestra intervención posterior. Nuestros objetivos son: la normalización de la frecuencia cardíaca, el relleno capilar, la perfusión periférica y los pulsos centrales y periféricos; la restauración de una diuresis  $\geq 1$  ml/kg/hora; y la normalización del estado de conciencia, si es posible su evaluación. Además, es importante mantener la presión venosa central (PVC) entre 8-12 mmHg, y monitorizar la ScvO<sub>2</sub>, que idealmente debe ser  $\geq 70\%$ , los niveles de lactato y el exceso de bases<sup>112</sup>.

Aunque muchas guías pediátricas recomiendan inicialmente el uso de suero salino fisiológico al 0.9%, no existe a día de hoy evidencia concluyente sobre el beneficio de un tipo de fluido respecto a otro en el tratamiento del shock séptico pediátrico. En adultos, el suero fisiológico (0.9%) se ha demostrado igualmente eficaz que la solución de albúmina humana (4.5%) en el tratamiento del shock séptico, a pesar de sugerirse un beneficio de la albúmina en un subgrupo de pacientes<sup>113</sup>. El grupo inglés de *S. Nadel*, con gran experiencia en la EM, recomiendan el uso de albúmina en la sepsis meningocócica por haberse asociado a reducción de la morbi-mortalidad en algunos estudios observacionales de EM<sup>114</sup>. Los hemoderivados (plasma fresco congelado, concentrado de hematíes) se utilizarán en situaciones concretas (coagulopatía severa, anemia aguda (Hb < 10 g/dl) con inestabilidad hemodinámica). En la actualidad no existe recomendación para el uso de las soluciones salinas hipertónicas en los niños sin signos de edema cerebral.

**Recomendación:** Administrar inicialmente bolos de 20 ml/kg de suero salino fisiológico al 0.9% en 5-10 minutos, teniendo como objetivos la mejoría o normalización de los parámetros clínicos de shock, mantener la PVC 8-12 mmHg y la  $ScvO_2 > 70\%$ . En presencia de meningitis, se debe tener en cuenta el riesgo de edema cerebral.

#### 2.1.8.3.1.4. Soporte vasoactivo

Se debe iniciar el soporte vasoactivo si tras la expansión inicial de volumen (40-60 ml/kg) continua habiendo signos de compromiso hemodinámico (shock refractario a volumen). El shock meningocócico se puede presentar con un aumento o disminución de las resistencias vasculares periféricas, y con alto o bajo gasto cardíaco. Es importante tener en cuenta que el niño puede pasar de un estado hemodinámico a otro en diferentes momentos del shock y ajustar el tratamiento inotrópico o vasopresor en función del estado clínico del paciente.

Las aminos inicialmente recomendadas en la mayoría de guías son la dopamina (5-20 mcg/kg/min), por su efecto miocárdico -beta agonista- y vascular periférico -alfa-agonista-, o dobutamina (5-20 mcg/kg/min), que pueden administrarse por vía periférica hasta la obtención de un acceso venoso central. Las guías NICE recomiendan iniciar infusión de adrenalina en cuanto se disponga de vía central, si continúa la necesidad de administración de volumen endovenoso y soporte inotrópico periférico. En caso de shock caliente (extremidades calientes, pulsos saltones, presión diastólica baja) o hipotensión grave debe considerarse la administración de noradrenalina. En la actualidad no existe recomendación para el uso de la vasopresina como fármaco de primera línea.

Si el niño permanece en un estado de bajo gasto cardíaco normotensivo con altas resistencias periféricas, a pesar de la resucitación con volumen y el tratamiento inotrópico, puede considerarse el tratamiento vasodilatador e inotrópico con inhibidores de la fosfodiesterasa (milrinona)<sup>108</sup>.

Al igual que con la fluidoterapia, es esencial evaluar de forma continua la respuesta a nuestras intervenciones terapéuticas y ajustar el tratamiento de acuerdo a la misma.

**Recomendación:** Si tras dos bolos de 20 ml/kg de fluido siguen existiendo signos de compromiso hemodinámico, iniciar perfusión de dopamina o dobutamina (periférica o central). Cuando se disponga de vía central, iniciar adrenalina si persiste shock frío,

pudiendo ser necesario la adición de noradrenalina, vasopresina (o análogos), o milrinona.

#### **2.1.8.3.1.5. Otras terapias de soporte**

Igual que en otros tipos de shock séptico grave, los niños con sepsis meningocócica pueden presentar insuficiencia renal aguda con oliguria grave o anuria. En estos casos, antes de que se produzca una sobrecarga de volumen importante, es necesario instaurar técnicas de depuración extrarrenal, preferiblemente continuas.

En casos de shock refractario a todas las terapias convencionales, debe plantearse el soporte con ECMO (membrana de oxigenación extracorpórea).

#### **2.1.8.3.2. Terapias adyuvantes**

Muchas estrategias terapéuticas no convencionales han sido ensayadas en el tratamiento de la sepsis meningocócica. La mayoría se han centrado en modular las cascadas inflamatoria y de la coagulación.

##### **2.1.8.3.2.1. Corticoides**

El uso de corticoides en el shock séptico ha sido objeto de gran debate en la literatura durante décadas. En adultos, tratamientos cortos con altas dosis de corticoides en un intento de frenar la cascada inflamatoria debido a su acción anti-leucocitaria, no han demostrado beneficio alguno; sin embargo, cursos más prolongados con dosis bajas sustitutivas de hidrocortisona han sugerido en diversos estudios una posible mejoría en la supervivencia<sup>115</sup>.

En niños con EM, los niveles de cortisol iniciales se han correlacionado inversamente con la concentración de citocinas proinflamatorias y la gravedad del cuadro clínico. Los niveles altos de ACTH en estos pacientes sugieren la posibilidad de una insuficiencia suprarrenal "relativa", secundaria a una resistencia de los receptores tisulares a los corticoides. De hecho, si bien el fracaso adrenal absoluto (cortisol total  $\leq 18$  g/dL) debido a hemorragia adrenal es raro en la sepsis meningocócica, entre un 10-17% de los niños presentan insuficiencia suprarrenal parcial<sup>116</sup>.

Actualmente, no existe evidencia suficiente para recomendar el uso rutinario de corticoides en niños con sepsis meningocócica en ausencia de meningitis. Hasta la disponibilidad de un ensayo clínico aleatorizado en niños, los expertos recomiendan que el tratamiento sustitutivo con hidrocortisona sea reservado para el shock resistente a catecolaminas con sospecha o confirmación de insuficiencia suprarrenal<sup>108,117</sup>.

#### **2.1.8.3.2.2. Terapias inmunomoduladoras dirigidas al control de la cascada inflamatoria**

Un mejor conocimiento de la fisiopatología de la EM y la sepsis en general ha permitido el desarrollo en las últimas décadas de diversas terapias experimentales dirigidas a la modulación de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, a pesar de los datos prometedores de estudios en animales, los tratamientos inmunomoduladores no han podido hasta la fecha demostrar en ensayos clínicos fase III una mejora clara de la supervivencia de los pacientes con sepsis. Entre otros, se ha evaluado la acción de los corticoides, agentes antiendotoxina, anticuerpos contra citocinas proinflamatorias, y técnicas de depuración sanguínea.

- **Inmunoglobulinas iv:** El uso de inmunoglobulinas endovenosas ha sido ampliamente debatido como posible tratamiento adyuvante de la sepsis, tanto en adultos como en niños, con resultados controvertidos. En la actualidad, a pesar de que diversos estudios pequeños han sugerido un posible efecto beneficioso y que las últimas guías de la Surviving Sepsis Campaign, aún recomiendan considerar su uso en niños con sepsis grave<sup>108</sup>, dos recientes ensayos clínicos fase III multicéntricos en neonatos y adultos no han demostrado una mejoría en la supervivencia de pacientes con sepsis tratados con inmunoglobulinas endovenosas policlonales<sup>118-119</sup>.
- **Agentes antiendotoxina:** Dos agentes antiendotoxina han sido evaluados en ensayos clínicos aleatorizados y controlados en niños con sepsis meningocócica:
  - *Análogo recombinante de la proteína bactericida permeabilizante (rBPI<sub>21</sub>):* La endotoxina bacteriana es el principal desencadenante de la respuesta inflamatoria que conduce al shock, fallo multiorgánico y púrpura fulminante en la meningococemia. La proteína bactericida permeabilizante (BPI), liberada por los polimorfonucleares tras su activación, se une y neutraliza los efectos de la endotoxina bacteriana soluble y unida a membrana. Además, es un agente citotóxico potente frente a organismos Gram negativos, aumentando la

permeabilidad de la membrana bacteriana y activando enzimas de degradación. La rBPI<sub>21</sub> es un análogo recombinante del fragmento N-terminal de la molécula de 21-kDa, capaz de unirse y neutralizar la endotoxina meningocócica *in vitro*, inhibiendo la expresión de citocinas y la activación de neutrófilos y de la cascada de la coagulación secundarias.

La eficacia de la rBPI<sub>21</sub> ha sido evaluada en un ensayo aleatorizado y controlado por placebo en una cohorte de niños con sepsis meningocócica grave. Este estudio mostró en niños tratados con rBPI<sub>21</sub> (2 mg/kg en 30 minutos seguido de 2 mg/kg en 24 horas) una mejoría de diferentes parámetros pronósticos, incluyendo una menor incidencia de complicaciones vasculares (amputaciones), menor requerimiento de hemoderivados y un mejor pronóstico funcional según la Pediatric Overall Performance Category Scale comparados con el grupo control. Sin embargo, desafortunadamente el estudio no tuvo la potencia suficiente para demostrar una reducción significativa en la mortalidad, aunque se observó una tendencia en niños que recibieron una infusión completa de 24 horas del fármaco<sup>120</sup>.

Con los únicos datos clínicos disponibles en la actualidad, no es posible recomendar el uso de rBPI<sub>21</sub> en el manejo rutinario de la sepsis meningocócica.

- **Anticuerpo HA-1A:** El HA-1A es un anticuerpo monoclonal humano IgM que se une específicamente al dominio lipídico A del lipopolisacárido de bacterias Gram negativas, ejerciendo una acción anti-endotoxina. Su papel terapéutico en la sepsis meningocócica pediátrica se evaluó en un ensayo aleatorizado controlado por placebo, el cual no demostró una reducción significativa de la mortalidad<sup>121</sup>. Dos ensayos en adultos con sepsis por Gram negativos habían obtenido resultados similares previamente<sup>122-123</sup>. Así pues, los datos existentes no permiten recomendar su aplicación terapéutica en la EM.
- **Anticuerpos anticitocinas:** Diversos anticuerpos monoclonales contra citocinas proinflamatorias se han usado a nivel experimental en la sepsis meningocócica. Éstos incluyen anticuerpos frente al TNF $\alpha$ , frente a los receptores solubles de TNF (TNFsR), o frente al antagonista del receptor IL-1 $\beta$  (IL-1Ra). Ninguno de estos agentes ha demostrado tener un efecto beneficioso en el tratamiento de la sepsis y por tanto no puede recomendarse su uso clínico<sup>124-125</sup>. Por otro lado, un estudio prospectivo a doble ciego utilizando suero de pacientes inmunizados con *E Coli J5*, tampoco fue capaz de demostrar una reducción significativa en la mortalidad<sup>126</sup>.

- **Otros:** La pentoxifilina, un derivado metilxantina inhibidor no específico de la fosfodiesterasa, ha sido también estudiada como terapia adyuvante en el manejo del shock séptico, principalmente en niños prematuros y adultos. A la pentoxifilina se le han atribuido múltiples efectos sobre el sistema inmunológico, pero el predominante es la modulación de la cascada de citocinas proinflamatorias debido a su efecto inhibitorio en la producción de TNF $\alpha$ . Aunque algunos estudios apuntan a un papel beneficioso<sup>127</sup>, en la actualidad no disponemos de evidencia suficiente para recomendar su uso.

#### **2.1.8.3.2.3. Terapias dirigidas al aclaramiento plasmático de moléculas proinflamatorias: Plasmaféresis y Hemofiltración**

La hipótesis de que el aclaramiento plasmático de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6) podría mejorar la supervivencia de los pacientes con shock séptico ha llevado a evaluar la plasmaféresis y la hemofiltración como posibles terapias adyuvantes en el shock séptico en las últimas décadas<sup>128</sup>.

Teóricamente, la plasmaféresis no sólo aclararía las sustancias proinflamatorias tóxicas del plasma, sino que repondría inmunomoduladores y anticoagulantes plasmáticos como el C1-inhibidor, la antitrombina III, o las proteínas C y S. Algunas series de casos han sugerido un efecto beneficioso de esta técnica, pero en la actualidad no existen datos concluyentes que permitan recomendar su uso rutinario en la clínica<sup>129</sup>. Por otra parte, varios estudios han evaluado el uso de la hemofiltración en el manejo del shock séptico, habiendo apuntado algunos un posible efecto beneficioso<sup>130</sup>. Sin embargo, un reciente ensayo controlado y aleatorizado (ECA) fase III que comparó la hemofiltración (35 ml/kg/hora) con el tratamiento convencional de adultos con shock séptico tuvo que finalizarse prematuramente por observarse mayor mortalidad en el grupo sometido a hemofiltración. Además, este estudio no demostró modificación en los niveles de citocinas plasmáticas en pacientes sometidos a hemofiltración<sup>131</sup>. Así pues, si bien la hemofiltración contribuye al manejo de la hipervolemia y corrección de la acidosis en el paciente séptico, los datos hasta la actualidad no demuestran un beneficio claro en el pronóstico del shock séptico.

En conclusión, a pesar de las esperanzas depositadas en las mismas desde hace varias décadas, las terapias inmunomoduladoras no han podido demostrar un beneficio evidente en el tratamiento de la sepsis. Dado que el shock séptico es una condición dinámica, y que la activación de los mediadores inflamatorios no sucede

simultáneamente ni es uniforme en todos los individuos, es posible que más de una terapia inmunomodulador con diferentes dianas terapéuticas y con acción continua que evite picos de concentraciones de mediadores inflamatorios sean necesarias en diferentes estadios de la EM para resultar en una estrategia eficaz<sup>132</sup>.

#### 2.1.8.3.2.4. Tratamiento de la coagulación vascular diseminada

La coagulación intravascular diseminada (CID) y coagulopatía asociada juegan un papel determinante en la fisiopatología de la EM. Debido a que la trombosis microvascular generalizada es el componente clave de la *purpura fulminans*, la mayoría de opciones terapéuticas se han centrado en la reducción de la activación de la coagulación y en la mejoría de la fibrinólisis.

- **Heparina:** El uso de heparina en la purpura fulminans meningocócica puede resultar no intuitivo, dada la naturaleza hemorrágica de la enfermedad. Sin embargo, la heparina se ha usado durante años en la CID, sugiriendo algunos estudios una reducción en la necrosis distal de las extremidades<sup>133</sup>. A pesar de ello, no se ha demostrado hasta la fecha un efecto positivo en la supervivencia.
- **Antitrombina III:** La sepsis meningocócica se asocia frecuentemente a una reducción marcada de los niveles de antitrombina III (ATIII) consecuencia de la coagulopatía de consumo. ATIII no sólo es un importante inhibidor natural de la coagulación, sino que posee también propiedades antiinflamatorias al inducir la liberación de prostaglandina I<sub>2</sub> en las células endoteliales. Diversos estudios han sugerido un papel beneficioso de la ATIII en revertir la CID y el fallo multiorgánico. Sin embargo, un importante ECA multicéntrico en pacientes con sepsis grave y shock no demostró una reducción significativa de la mortalidad con el tratamiento con ATIII<sup>134</sup>.
- **Proteína C activada:** Es un anticoagulante fisiológico, con un papel modulador de la respuesta inflamatoria y acción profibrinolítica. La depleción de la proteína C durante la EM, secundaria al consumo, inactivación y disminución de la síntesis, es un factor clave en la patogenia de la *purpura fulminans*, correlacionada con la morbimortalidad de la EM<sup>135</sup>.

Diversos estudios han evaluado el papel terapéutico del concentrado de proteína C o de la proteína C activada recombinante (*drotrecogin alfa*, DrotAA) en el manejo del shock séptico. Desde que el ECA PROWESS en 2001<sup>136</sup> mostrara una reducción significativa de la mortalidad en pacientes con shock séptico grave

tratados con DrotAA, otros múltiples estudios han intentado replicar sin éxito estos hallazgos, tanto en niños como adultos<sup>137-139</sup>, apuntando además a un posible aumento del riesgo de sangrado. Ante estos datos, la empresa farmacéutica responsable de su fabricación decidió retirarla del mercado en Octubre de 2011. Debe considerarse que estos estudios incluyeron pacientes con shock séptico de cualquier etiología. En el caso específico de la EM, algunos estudios han apuntado un efecto beneficioso de DrotAA<sup>140-141</sup>. Sin embargo, debido a la retirada del fármaco, no podremos disponer de ensayos clínicos que evalúen su eficacia exclusivamente en pacientes con EM.

- **Factor activador del plasminógeno (t-PA):** El uso precoz de factor activador del plasminógeno se ha propuesto como alternativa para limitar la trombosis vascular diseminada y la gangrena distal asociada a la EM<sup>142</sup>. A pesar de que algunas series de casos mostraron resultados prometedores con una restauración de la perfusión y reducción en la tasa de amputación, un estudio multicéntrico retrospectivo observó una alta incidencia de hemorragia intracerebral en niños con EM tras la administración de t-PA. La ausencia de ECA no permite concluir sobre su indicación o no en la EM, estando su uso limitado como agente de rescate<sup>143</sup>.
- **Otras estrategias:**
  - La administración de *plasma fresco*, rico en factores anticoagulantes e inmunomoduladores, se ha propuesto como terapia adyuvante en la *purpura fulminans*, permitiendo además la reposición de la volemia. La infusión de *crioprecipitado*, *concentrado de fibrinógeno* o *factor VII activado* puede usarse en pacientes con sangrado grave que no respondan a otras intervenciones. La transfusión de *plaquetas* debe minimizarse, pues la trombopenia es secundaria al consumo mantenido y porque aumenta la concentración del PAI-1 con el posible empeoramiento de la isquemia periférica y necrosis.
  - La *hirudina*, sustancia presente en la saliva de las sanguijuelas, inhibe la trombina, lo cual, podría jugar un papel beneficioso en la sepsis meningocócica. Las sanguijuelas de uso medicinal han sido utilizadas recientemente en una niña de 8 meses con sepsis neumocócica y lesiones purpúricas con compromiso vascular periférico con resultado favorable<sup>144</sup>. Del mismo modo se han utilizado en la sepsis meningocócica en una lactante de 5 semanas sin observar un claro efecto beneficioso<sup>145</sup>. Por tanto, si bien las proteínas salivares de las sanguijuelas de uso medicinal tienen un efecto

teóricamente beneficioso son necesarios estudios controlados y amplios antes de considerar su uso<sup>146</sup>.

- La administración de *vitamina K* estará indicada en aquellos casos en los que exista déficit, lo que conseguirá normalizar los niveles de proteína C y S. No obstante, en otras situaciones su beneficio no está aclarado<sup>147</sup>.
- La *ketanserina* es un inhibidor antagonista de la serotonina con efecto alfa bloqueante débil. Si bien ha sido utilizada en la enfermedad de Raynaud como tratamiento de la claudicación intermitente, no se ha demostrado su beneficio en la *purpura fulminans*<sup>148</sup>.
- El *ácido ε-amino caproico*, inhibidor de la fibrinólisis, podría frenar el proceso de necrosis cutánea en la *purpura fulminans*<sup>147</sup>.
- Algunos trabajos aislados han sugerido una mejoría de la perfusión distal de los miembros y un efecto analgésico con agentes *vasodilatadores* como prostaciclina, epoprostenol, nitroprusiato sódico o nitroglicerina tópica.
- La *oxigenación hiperbárica* ha mostrado en algún estudio reducir el área de necrosis distal en niños con *purpura fulminans* asociada a sepsis de distinta etiología.
- Es importante implicar al equipo de cirugía plástica en la monitorización y tratamiento de las lesiones purpúricas. Cuando la necrosis periférica progresa, debe valorarse la *amputación* del miembro. Sin embargo, puesto que la cicatrización de las áreas isquémicas ha demostrado ser sorprendentemente buena en los niños, siempre que sea posible debe realizarse un tratamiento conservador de las lesiones. La *fasciotomía descompresiva* no ha proporcionado resultados convincentes<sup>149</sup>.

En conclusión, ninguna de las terapias adyuvantes descritas han logrado mostrar una reducción de la morbilidad o mortalidad asociada a la *purpura fulminans meningocócica*. En la práctica clínica, muchas de estas terapias se usan de forma conjunta y es difícil interpretar su eficacia<sup>150</sup>.

#### 2.1.8.4. Tratamiento de la meningitis

El tratamiento de la meningitis en ausencia de shock e hipertensión intracraneal se basa en el uso de antibióticos intravenosos y la monitorización estrecha de posibles complicaciones. La restricción de líquidos no está indicada en ausencia de signos de hipertensión endocraneal o secreción inadecuada de hormona antidiurética (ADH).

Ante la sospecha de meningitis o EM, debe realizarse una punción lumbar para la confirmación microbiológica, a menos que exista alguna contraindicación.

El objetivo principal del tratamiento en la meningitis es alcanzar rápidamente niveles terapéuticos de antibiótico en el líquido cefalorraquídeo. Los antibióticos de elección en el contexto epidemiológico español son las cefalosporinas de 3ª generación (cefotaxima a 80 mg/kg/dosis, tres dosis al día; ceftriaxona a 50-80 mg/kg/dosis, una dosis al día) y deben administrarse sin demora. La duración del tratamiento será de entre 5 a 7 días.

Por otro lado, el uso de corticoides ha sido objeto de gran debate en la literatura. Si bien administrados con o antes de la primera dosis de antibiótico, parecen reducir la incidencia de secuelas neurológicas en la meningitis por *H. Influenzae* tipo b y *S. pneumoniae*<sup>151</sup>, los beneficios no están tan claros en el caso de la sepsis meningocócica. Sin embargo, por extrapolación, la mayoría de guías clínicas de meningitis meningocócica recomiendan el uso de dexametasona (0.15 mg/kg cada 6 horas) con, o en las primeras 12-24 horas de, la primera dosis de antibiótico y continuarla por 4 días si la punción lumbar sugiere la etiología bacteriana<sup>102</sup>. Los corticoides no deben usarse en países en vías de desarrollo<sup>152</sup>.

Debe realizarse una tomografía computerizada craneal si existe depresión del nivel de conciencia o focalidad neurológica que pueda hacer sospechar la coexistencia de una emergencia neuroquirúrgica. Sin embargo, la realización de pruebas complementarias no debe retrasar en ningún caso el inicio del tratamiento. En general, una segunda punción lumbar de control no está indicada sistemáticamente salvo que se observe un empeoramiento de la situación clínica a pesar de tratamiento antibiótico empírico.

Antes del alta hospitalaria debe realizarse una evaluación de posibles morbilidades sensoriales, neurológicas o psicosociales. Ésta debe incluir siempre un test de audición temprano (antes de que hayan transcurrido 4 semanas tras la recuperación clínica). En caso de demostrarse sordera grave, se recomienda ofrecer de forma precoz una evaluación para colocar un implante coclear.

### **2.1.9. Prevención**

La enfermedad meningocócica es de declaración nacional obligatoria, individualizada y urgente. Dado que todos los casos requieren hospitalización el mejor lugar para realizar la vigilancia es el hospital, concretamente el servicio de Medicina Preventiva,

mediante la búsqueda activa de casos en los servicios de Urgencias, Pediatría, Medicina Interna y Microbiología<sup>54</sup>.

La declaración de los casos permite, además de conocer la incidencia de la enfermedad, establecer la vigilancia de los convivientes y contactos, y administrarles, cuando esté indicado, quimioprofilaxis y vacuna.

### 2.1.9.1. Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis tiene como objetivo reducir el riesgo de adquirir la enfermedad invasiva erradicando el estado de portador en el grupo de contactos. Reduce el riesgo de enfermar en los contactos en más de un 80%. Los antibióticos administrados como quimioprofilaxis tienen el objetivo de eliminar el estado de portador nasofaríngeo y deben administrarse lo antes posible, ya que si han pasado más de 14 días desde el inicio de la enfermedad en el caso índice, es posible que tenga poco o ningún efecto beneficioso<sup>1,153</sup>. Entre los antibióticos recomendados y más utilizados en la práctica clínica destacan la rifampicina y el ciprofloxacino. También han mostrado eficacia el ofloxacino, la azitromicina (aunque está en discusión su utilidad por las resistencias observadas) y la ceftriaxona<sup>153</sup>.

Para evitar casos secundarios, se deberá actuar eliminando el estado de portador en aquellos sujetos susceptibles de estar colonizados en su tracto respiratorio superior, como los compañeros de guardería, colegio o domicilio de un afectado<sup>154</sup>. El riesgo de contraer la enfermedad a partir de los contactos con un paciente es más alto durante los primeros días de la enfermedad (desde una semana antes del inicio de los síntomas hasta 24 horas después de que el afectado haya iniciado el tratamiento antibiótico adecuado)<sup>1,153</sup>. La tasa de ataque de la enfermedad meningocócica en las personas en contacto estrecho con pacientes se ha calculado entre 400 a 800 veces mayor que la de la población general. En estos casos, el cultivo faríngeo no es útil para decidir quién debe recibir quimioprofilaxis, por lo que no se recomienda<sup>155</sup>.

Dado que los casos secundarios pueden aparecer varias semanas después del contacto con el caso índice, la vacunación antimeningocócica puede ser un gran apoyo a la quimioprofilaxis cuando un brote es causado por un serogrupo del que se dispone de vacuna<sup>155</sup>. Sin embargo, no se recomiendan los programas de quimioprofilaxis masiva para el control de grandes brotes de la enfermedad. Diversos factores hacen esta medida poco viable y con pocas probabilidades de éxito, como

son las múltiples fuentes de exposición, el prolongado riesgo de exposición, los problemas logísticos y su elevado coste<sup>1</sup>.

### 2.1.9.2. Vacunación

La estrategia de prevención más efectiva para el control de la enfermedad meningocócica es la vacunación<sup>1</sup>. Para conseguir un óptimo impacto en la prevención de esta enfermedad se requiere incorporar estas vacunas de forma temprana a los calendarios de vacunación infantil<sup>2</sup>.

#### 2.1.9.2.1. Tipos de vacunas meningocócicas

- **Vacunas polisacarídicas no conjugadas:** Las primeras vacunas meningocócicas efectivas basadas en el polisacárido capsular purificado de la bacteria se desarrollaron en los años sesenta frente a los serogrupos A y C, seguidas por vacunas similares para los serogrupos Y y W135 en los años ochenta. Estas vacunas han desempeñado un papel destacado en la prevención de la enfermedad durante décadas, pero tienen limitaciones importantes:<sup>156</sup> no son inmunógenas en lactantes, no inducen memoria inmunológica y no generan protección de mucosas ni, por tanto, inmunidad de grupo. El desarrollo de vacunas conjugadas frente a estos serogrupos ha representado un paso fundamental para consolidar la protección a largo plazo. Sin embargo, disponer de una vacuna protectora para el serotipo B no ha sido posible siguiendo las estrategias basadas en su polisacárido capsular.
- **Vacunas conjugadas:** En los años noventa se desarrollaron vacunas glucoconjugadas contra el serogrupo C y a partir de 1999 se introdujeron en muchos países europeos (primero Inglaterra y España, y luego progresivamente en el resto), Australia, EE. UU. y Canadá. La conjugación permitió superar las limitaciones de las vacunas polisacarídicas. Las formulaciones glucoconjugadas multivalentes siguieron a las monovalentes del serogrupo C, y en 2005 se aprobó en EE. UU. la primera vacuna glucoconjugada contra los serogrupos A, C, Y y W135. Actualmente, existen tres vacunas conjugadas tetravalentes para los serogrupos A, C, Y y W135, que se diferencian en la proteína transportadora, si bien en España, por el momento sólo dos de ellas están disponibles, como de prescripción médica y uso hospitalario. Desde diciembre de 2010 se dispone de una

vacuna glucoconjugada monovalente para el serogrupo A, desarrollada para controlar la enfermedad por este serogrupo, que tiene una elevada incidencia en el “cinturón africano de la meningitis”<sup>157-158</sup>. Esta vacuna surge de una experiencia novedosa que ha sabido aunar el esfuerzo de organismos internacionales, como la Organización Mundial de la Salud, y la empresa privada, dando como fruto una vacuna que ayudaría a controlar esta enfermedad en una zona donde la escasez y la limitación de recursos dificultan, en gran medida, la solución de grandes problemas de salud, como es el caso de la meningitis por meningococo A.

#### **2.1.9.2.2. Efectividad de las vacunas**

A mediados de los noventa, en Europa hubo un incremento de la incidencia de enfermedad invasiva por el serogrupo C. Tras la introducción de las vacunas conjugadas para este subgrupo en los programas de inmunización sistemática de muchos países europeos, la enfermedad por el serogrupo C se redujo drásticamente y se demostró además su capacidad para producir una inmunidad de grupo. Esta reducción postvacunal del serogrupo C ha sido la principal causa del predominio actual del serogrupo B.

En el año 2000 se introdujo la vacuna conjugada frente a meningococo C en los calendarios vacunales de España a los 2, 4 y 6 meses de edad, juntamente con un programa de *catch-up* en menores de 6 años, ampliado posteriormente a los 18 años, aunque de manera muy heterogénea según las comunidades autónomas y el año de introducción. En lactantes y niños de hasta 9 años de edad, la incidencia de la enfermedad se redujo de 7,04 por cada 100.000 habitantes (1999-2000) a 1,08 por cada 100.000. La efectividad del programa ha sido del 95,2% para lactantes y de un 97,8% para el de *catch-up* de los menores de 6 años<sup>159</sup>. La protección de la población ha sido menos pronunciada que en otros países, puesto que la campaña de *catch-up* se dirigió inicialmente a niños menores de 6 años, no incluyendo a los adolescentes, el grupo de edad en el que las tasas de portadores son más altas<sup>159</sup>. A los cuatro años de la introducción de la vacuna conjugada en España en el calendario vacunal, si bien se observó una efectividad del 94%, se detectó también una pérdida de efectividad de la vacuna en aquellos niños vacunados pero que no recibieron una dosis de refuerzo a los 12 meses de vida<sup>159</sup>. Este hecho llevó a la modificación de la pauta vacunal inicial, retrasando la administración de la tercera dosis a partir del segundo año de vida.

Tras la introducción de esta vacuna conjugada en el año 2000 se observa que la infección por el serogrupo C ha disminuido significativamente; se ha producido un descenso del 88% en la tasa de incidencia de la meningitis C (temporada 1999-2000 respecto a 2009-2010). Sin embargo la producida por el serogrupo B no se ha modificado y es actualmente la más frecuente<sup>160</sup> (Figuras 9 y 10, y Tabla 3).

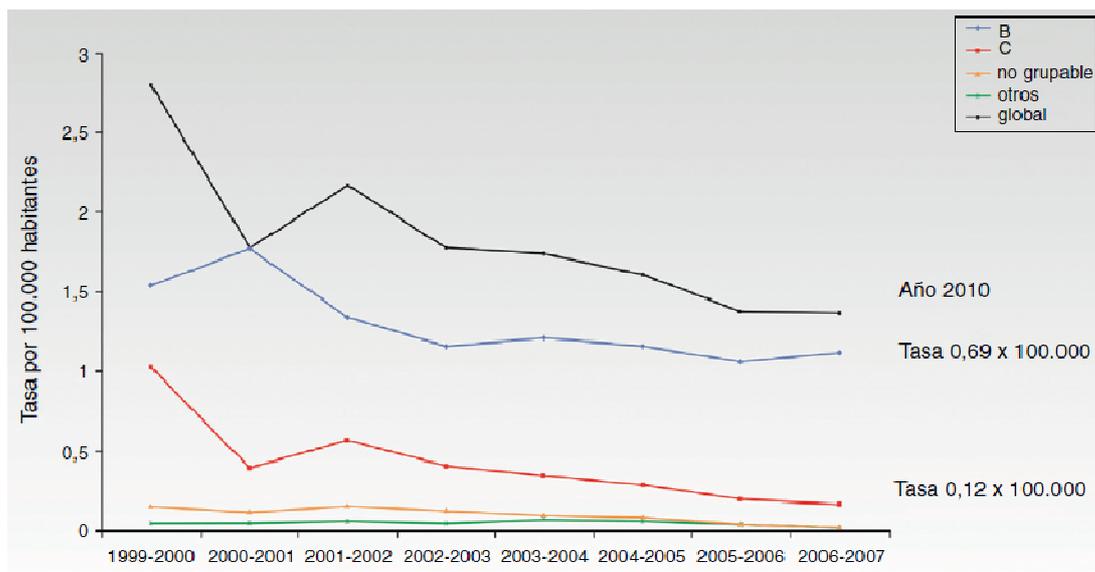


Fig. 9. Evolución de los casos de meningitis B y C en España. Adaptado de *Cano et al*<sup>161</sup>.

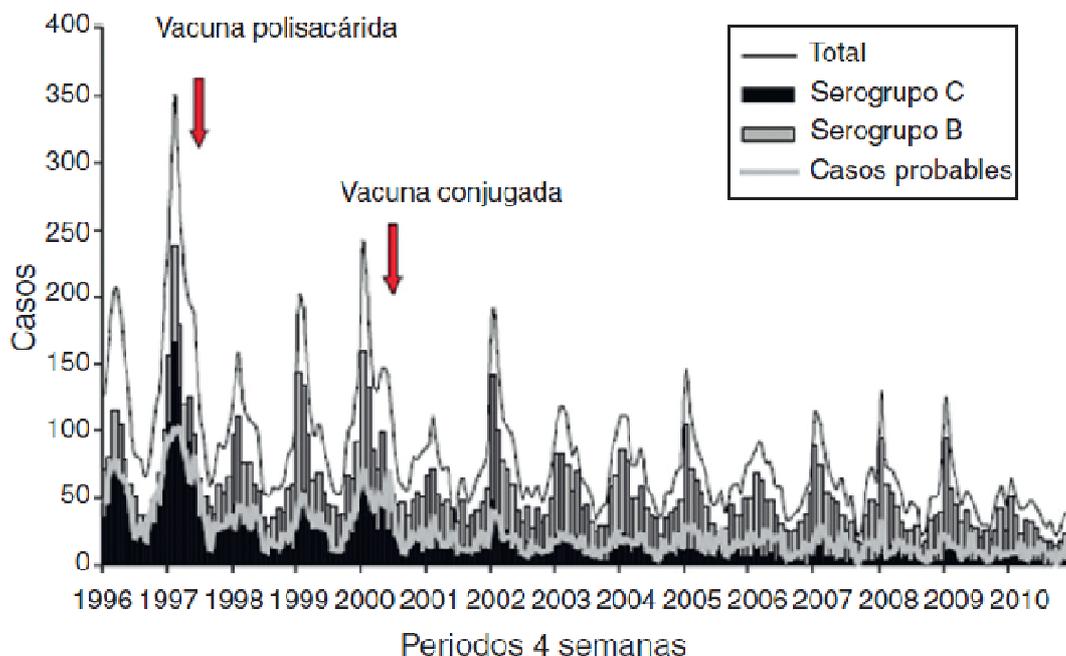


Fig. 10. Enfermedad meningocócica. Casos totales y principales serogrupos. Temporadas 1996-1997 a 2008-2010. Tomada de Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III<sup>162</sup>.

### 2.1.9.2.3. Vacunas contra el meningococo B

El gran reto de la lucha frente a la enfermedad meningocócica en los últimos años se ha centrado principalmente en conseguir una vacuna efectiva frente al serogrupo B. El polisacárido capsular de este serogrupo tiene una elevada similitud antigénica con sacáridos del tejido neuronal humano y es poco inmunógeno en humanos. Es por ello que las estrategias para desarrollar vacunas frente el serogrupo B se han centrado principalmente en antígenos no capsulares<sup>1,163</sup>.

- **Vacunas de vesículas de membrana externa (tipo outermembrane vesicle):** Los primeros intentos de fabricación de una vacuna frente al serogrupo B se han basado en la utilización de vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vehicle*, OMV), que contienen varios antígenos inmunogénicos, incluido un lipooligosacárido y la porina A (PorA). El lipooligosacárido es una endotoxina para el huésped y, aunque se ha tratado de eliminar mediante detergentes, no se consigue del todo, lo que genera mayor reactividad. Es por ello que el principal antígeno de este tipo de vacunas es la PorA<sup>164</sup>. Aunque las vacunas basadas en OMV evocan una respuesta inmunológica robusta, la PorA es altamente variable en las diferentes cepas del serogrupo B45, lo que condiciona que estas vacunas produzcan una respuesta inmunológica específica de la cepa. Además, en el lactante no es suficientemente inmunógena.<sup>157,164-165</sup> Es por ello que estas vacunas sólo son efectivas en epidemias debidas a una cepa que exprese específicamente la PorA contenida en la vacuna. Se han desarrollado y utilizado vacunas OMV contra meningococo B en Cuba (de forma sistemática durante 20 años), en Noruega (en ensayos clínicos controlados), en Nueva Zelanda (en una epidemia)<sup>166</sup>, recientemente en Normandía (Francia)<sup>167</sup> y hace años en Brasil<sup>168</sup>. En Norteamérica o Europa la enfermedad por el serogrupo B se debe a una amplia variedad de serosubtipos, lo que limita la utilización de este tipo de vacunas<sup>164,169-173</sup>.
- **Vacuna rLP2086 (Pfizer):** En la actualidad, se están estudiando vacunas basadas en la proteína de unión al Factor H (*Factor H binding protein* [fHbp]), de la que hay 2 familias: A y B. Por tanto, según la composición de las vacunas (conteniendo una o las dos familias de la proteína), éstas podrán ser mono o bivalentes. Se ha observado que la vacuna bivalente (en desarrollo por laboratorios Pfizer)<sup>174</sup>, compuesta por los dos tipos de fHbp, generó mayor actividad bactericida contra las

cepas de meningococo B que expresaban estos tipos de fHbp que las vacunas monovalentes. El suero inmune de esta vacuna bivalente obtenido de conejos fue testado mediante el ensayo de la actividad bactericida del suero, o *serum bactericidal activity* (SBA), frente a diversas cepas de meningococo B, y se neutralizaron 87 de las 100 cepas testadas. El ensayo realizado con suero inmune humano neutralizó 36 de los 45 aislados. El mejor factor predictivo para la neutralización mediante el test de SBA fue el nivel de expresión de fHbp en la superficie *in vitro*.<sup>157,175</sup> Esta vacuna bivalente se encuentra en fase II/III en escolares, adolescentes y adultos, en estudios que se están desarrollando en Australia y España, entre otros. Hasta la fecha, la vacuna ha demostrado que desencadena la producción de una potente respuesta de anticuerpos capaces de lisar las bacterias procedentes de muestras invasoras de las dos subfamilias, con un aceptable perfil de seguridad.

**Vacuna 4 CMenB (Novartis):** El meningococo del serogrupo B representa el primer ejemplo de un desarrollo de vacunas exitoso mediante la **vacunología inversa**<sup>176-177</sup>. Tradicionalmente las vacunas se han basado en el cultivo de un microorganismo en el laboratorio y en el aislamiento y posible manipulación de sus componentes, analizando la capacidad que tiene cada antígeno para inducir una respuesta inmunológica. La vacunología inversa parte de la secuencia genómica del microorganismo, analizando, a través de un software bioinformático específico (*Open Reading Frames* [ORF]), genes y fragmentos de ADN que potencialmente pueden codificar diferentes tipos de proteínas de expresión de la superficie de la bacteria. De esta forma se pueden predecir los antígenos que tienen más probabilidades de ser candidatos para la vacuna. Con esto se requiere mucho menos tiempo que con el método tradicional, y supone una forma alternativa para desarrollar vacunas en aquellos casos en que se carece de antígenos inmunodominantes, como los capsulares o las toxinas.

En el caso concreto de meningococo B, primero se realizó un cribado inicial del genoma de una cepa de meningococo B, que identificó alrededor de 600 ORF. Todos los ORF se amplificaron por PCR y se clonaron en *Escherichia coli*. En total, se expresaron un total de 350 proteínas recombinantes, que se purificaron y se usaron para inmunizar ratones<sup>157,178-180</sup>. Tras la inmunización de ratones con estas proteínas, se obtuvo suero que fue analizado mediante diferentes ensayos como el *Western blot*, para la confirmación de la expresión de las proteínas *in vivo* y su localización en la membrana externa, y las técnicas *enzyme-linked immunosorbent*

*assay* (ELISA) y *fluorescence-activated cell sorter*, para verificar su localización en la superficie. Posteriormente, se analizó la actividad bactericida del suero, para conocer la correlación con la protección en humanos. El análisis de inmunogenicidad identificó 28 antígenos proteicos con capacidad de producir anticuerpos bactericidas en suero<sup>157,178-180</sup>. De estos 28 antígenos, algunos estaban muy conservados en un grupo de cepas de meningococo B y eran reconocidos por el suero de pacientes convalecientes de enfermedad meningocócica. Para priorizar entre los antígenos seleccionados se consideró la capacidad de inducir una amplia protección a través del SBA o la observada por protección pasiva en los ensayos realizados con crías de ratas y ratones. Los 3 antígenos que cumplieron estos criterios fueron antígeno de *Neisseria* de unión a heparina (*Neisserial heparin-binding antigen* [NHBA]), o *genome-derived neisserial antigens* (GNA2132), GNA1870 o fHbp (proteína de unión al FactorH, *Factor H binding protein*) y GNA1994 o adhesina A de *Neisseria* (*Neisserial adhesin A* [NadA]). Además, también se incluyeron los antígenos GNA1030 y GNA2091 porque indujeron inmunidad protectora en algunos ensayos y se fusionaron con NHBA y fHbp, respectivamente. Sin embargo, ninguno de ellos produjo suficiente respuesta protectora para cubrir todas las cepas probadas. Debido a que la combinación de varios antígenos en una vacuna confiere mejor protección, se combinaron los antígenos principales en una vacuna multicomponente (Figura 11).

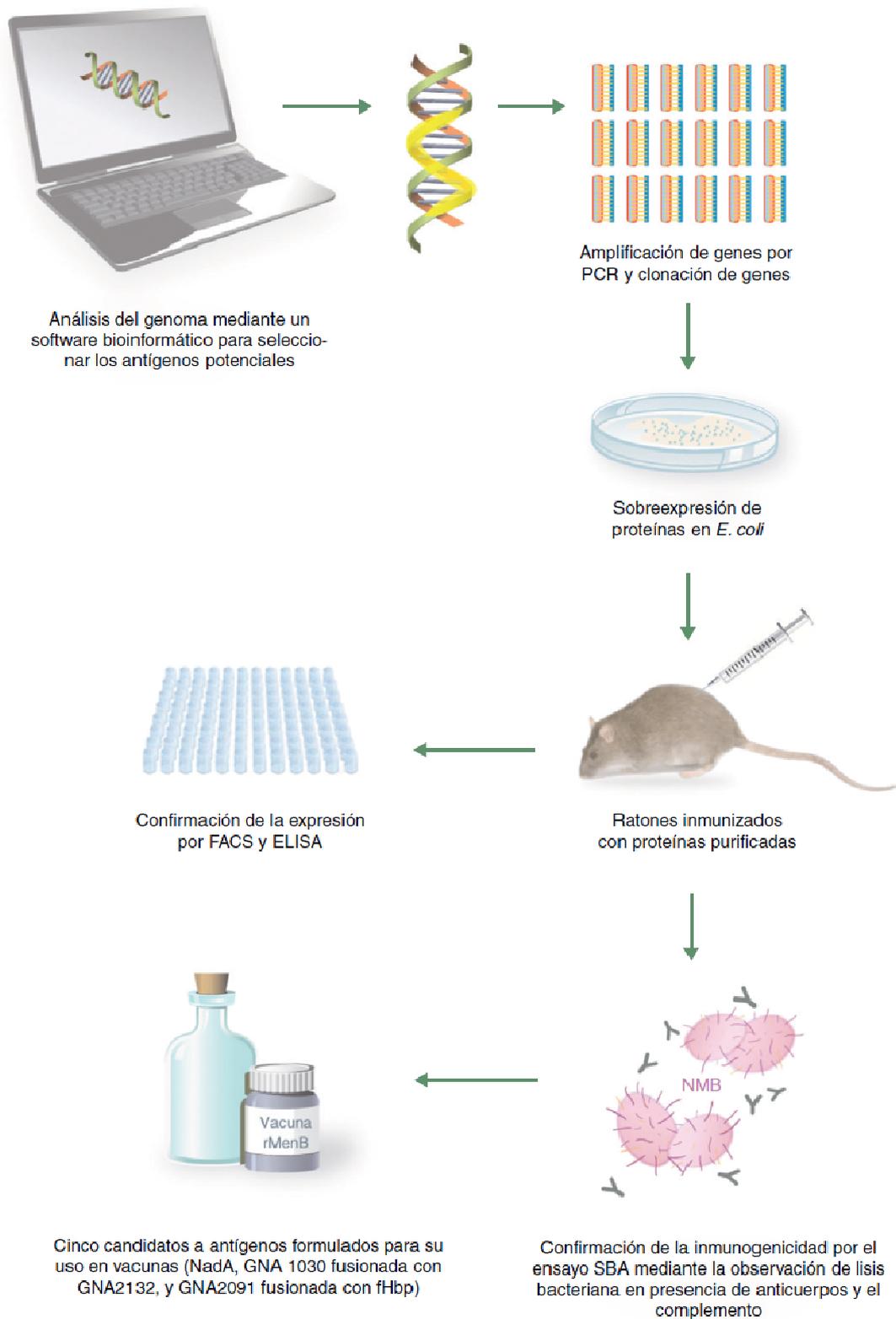


Fig. 11. Proceso de obtención de la vacuna 4 CMenB mediante vacunología inversa. Adaptado de Tan et al<sup>181</sup>.

Inicialmente, la vacuna se formuló con 3 componentes y se llamó vacuna recombinante (rMenB), e incluía los antígenos fHbp, NadA y NHBA. Posteriormente, se añadió la OMV de una cepa de Noruega (OMVnw) y se realizaron algunos ensayos con esta combinación (rMenB + OMVnw). Finalmente, se sustituyó la OMVnw por la cepa de Nueva Zelanda, que proporciona más cobertura, dando lugar a la rMenB + OMVnz, o también 4 CMenB, por sus cuatro componentes<sup>157</sup>.

La vacuna se administra por vía intramuscular con una dosis de 0,5 ml. Los ensayos realizados hasta el momento han demostrado que es una vacuna inmunógena y segura en lactantes, niños, adolescentes y adultos, e induce memoria inmunológica. Se estima que su cobertura potencial en Europa sería de un 70-80% de las cepas circulantes. En enero de 2013 la Comisión Europea autorizó la vacuna frente a la enfermedad invasora por meningococo B, Bexsero®, de la Compañía Farmacéutica Novartis and Diagnostics S.L.<sup>182</sup>. Esta vacuna está indicada para la protección activa frente a enfermedad invasora por meningococo de serogrupo B en personas  $\geq 2$  meses de edad. En Alemania y Reino Unido ya está disponible y se espera que Irlanda, Francia y Portugal se sumen próximamente, al igual que el resto de países europeos. También ha sido aprobada por la agencia australiana y la canadiense. Adicionalmente se ha importado y se está empleando en el control de brotes de enfermedad en Nueva Jersey y California, en los Estados Unidos, donde todavía no ha sido sometida a la evaluación por la FDA.

La situación en España es diferente: El 5 de abril de 2013 la Agencia Española del Medicamento (AEM), en el Informe de utilidad terapéutica de la vacuna meningocócica del grupo B, Bexsero®, la restringe a su Uso Hospitalario. La justificación para tal decisión radica en la ausencia de datos de eficacia clínica con la vacuna, en la incidencia contenida de enfermedad meningocócica por serogrupo B, y en que permanecen a la espera de obtener datos de efectividad post-autorización.

La Ponencia de Programas y Registro de Vacunaciones reconoce el importante avance que supone disponer de una vacuna frente a enfermedad meningocócica por serogrupo B y la ventaja que en términos de salud pública podría suponer su utilización en un programa poblacional si así se considerara<sup>182-185</sup>. De hecho afirman que con la vacunación sistemática podrían prevenirse 631 casos en menores de 5 años de edad y 4.784,3 años de vida perdidos ajustados por discapacidad en los próximos 5 años. Sin embargo, teniendo en cuenta la información disponible y la situación epidemiológica, en el momento actual las autoridades sanitarias

españolas no consideran justificada la inclusión de esta vacuna en el calendario sistemático de vacunaciones. Según esta entidad, se recomienda proseguir con la evaluación de la vacuna una vez que se disponga de lo siguiente:

- Datos acerca de la protección clínica en regiones geográficas o países de nuestro entorno.
- Un sistema centralizado de seguimiento por laboratorio, que permita conocer la efectividad de la vacunación y, por consiguiente, los fallos de vacunación, así como el seguimiento de la evolución de las poblaciones meningocócicas.
- Datos de compatibilidad con las vacunas antimeningocócicas conjugadas y con las antineumocócicas de amplio espectro, a menos que se decidiera, en su caso, la administración no concomitante con las vacunas de uso rutinario.

En el supuesto de brotes o casos aislados de enfermedad meningocócica por serogrupo B, las autoridades sanitarias valorarán la utilización temporal de la vacuna en uno o en varios grupos de edad, o en los contactos, en su caso. Esto se hará, preferiblemente y cuando las circunstancias lo permitan, con una caracterización microbiológica previa de la cepa causante, y siempre garantizando el seguimiento microbiológico de la situación. En ningún caso la vacunación sustituirá a la quimioprofilaxis en las personas en las que esté indicada. Recientemente ha habido brotes de enfermedad meningocócica por serogrupo B en las Universidades de Princeton y de California, que han desencadenado la aprobación del uso de esta vacuna por parte de la FDA en EEUU.

La decisión de la AEM ha contado con la desaprobación y crítica unánimes por parte de la comunidad científica<sup>183</sup>. Si bien es cierto que -al igual que en otros países europeos- la incidencia de la enfermedad meningocócica B en España se encuentra en su nivel más bajo en las últimas décadas, no es menos cierto que esa incidencia es casi la misma que la registrada para la enfermedad meningocócica causada por el serogrupo C en 2001, cuando se introdujo en el programa de inmunización nacional la vacuna conjugada antineumocócica frente a este serogrupo. Además, la mortalidad y la morbilidad asociada permanecen en tasas estables e inaceptablemente elevadas, más aún cuando se dispone de una herramienta preventiva. Si el mismo criterio se hubiera adoptado en su día respecto a la vacunación frente a meningococo C, todavía estarían falleciendo niños y adolescentes como consecuencia de esta enfermedad. La decisión de “esperar y

ver” no creemos, al igual que las sociedades científicas y expertos más representativos de nuestro país, que sea el planteamiento correcto en el caso de una enfermedad impredecible, dinámica y agresiva como es la enfermedad meningocócica.

## 2.2. GENÉTICA Y ENFERMEDAD MENINGOCÓCICA

### 2.2.1. Genética y genómica: conceptos generales

#### 2.2.1.1. Variación genética: mutación y polimorfismo

Una **mutación** es un cambio en la información contenida en el ADN de las células, que ocurre de forma espontánea o inducida, y puede consistir en adiciones, deleciones o sustituciones de pares de bases. La gran mayoría de las mutaciones son neutrales, es decir, no conllevan ningún cambio (al menos conocido) en la función en el mecanismo de expresión del genoma. Sin embargo, algunos de estos cambios en la secuencia codificadora de un gen o en algún elemento regulador del mismo podrían conducir a la formación de una proteína estructuralmente diferente, lo que podría condicionar una alteración en su función.

Un **polimorfismo genético** hace referencia a los múltiples alelos de un gen que pudieran existir en un locus concreto del genoma; cuando ocurren sobre un gen, éstos pueden derivar en patrones de expresión diferentes (p.ej. sobre el color de la piel). Para que una variante en un gen sea polimórfica, el alelo con frecuencia mínima tiene que estar presente en al menos un 1% de la población.

Existen muchos tipos de polimorfismos en el genoma humano. El más frecuente es el conocido como **polimorfismo de un único nucleótido**, comunmente conocido como **SNP (*single nucleotide polymorphism*)**. Un SNP es una variación en la secuencia de ADN que afecta a un único par de bases (A, T, C ó G), y constituye la principal fuente de variabilidad genética interindividual (Figura 12).

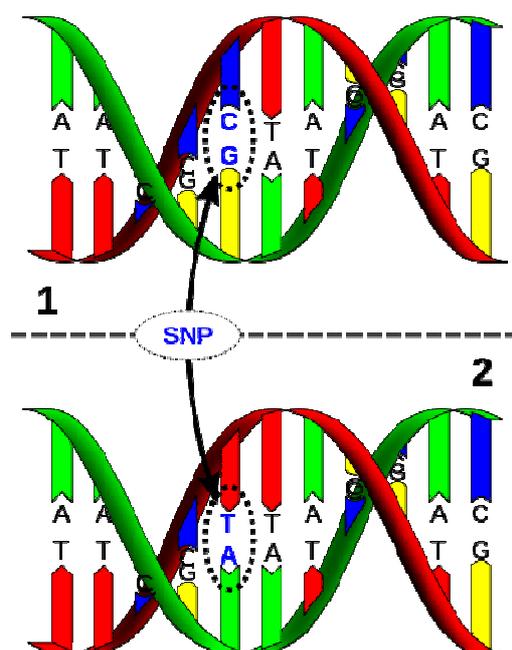


Fig. 12. Representación esquemática de un SNP: estas dos cadenas de ADN difieren entre sí, únicamente, en un par de bases. Fuente: <http://www.wikipedia.org>

Los SNPs son los tipos de polimorfismos que generalmente se genotipan en los estudios genómicos, ampliamente conocidos como *Genome-wide Association Studies* (GWAS). En este tipo de estudios se analizan desde unos cuantos miles hasta varios millones de ellos (usando los *chips* de SNPs más actuales). Existen alteraciones en estos SNPs que pueden implicar alteraciones en los cambios de expresión de un gen, o un cambio conformacional en la proteína que codifican. A menudo son responsables de los pequeños cambios que forman parte del componente genético que predispone a la enfermedad compleja y multifactorial. No obstante, en ocasiones los SNPs que estamos analizando (SNPs marcadores) no son los verdaderos causantes de una enfermedad, sino que se encuentran cercanos en el genoma a los verdaderos SNPs que directamente causan o predisponen a presentar la enfermedad (SNPs causales)<sup>186</sup>. En estos casos, el investigador tiene cierta capacidad para detectar la asociación a través de un SNP marcador simplemente porque existe una relación de asociación entre este SNP y el SNP causal, relación que técnicamente se conoce como **desequilibrio de ligamiento**. El **desequilibrio de ligamiento** hace referencia a la segregación dependiente de variantes alélicas de dos locus. Generalmente, existe una relación fuerte entre el desequilibrio de ligamiento y el hecho de que los dos loci en cuestión estén localizados próximos en el cromosoma, pero no necesariamente. Podría suceder incluso que dos loci estuvieran en desequilibrio de ligamiento estando en cromosomas diferentes.

En resumen, el estudio de estas pequeñas variaciones genéticas existentes entre individuos, ha supuesto un gran avance en el conocimiento de las causas genéticas de algunas enfermedades. La gran ventaja de los SNPs frente a otros marcadores es que son abundantes (están presentes, al menos, en el 1% de la población), están uniformemente distribuidos a lo largo de todo el genoma, y pueden ser analizados mediante métodos automatizables a gran escala, como los *microarrays* o *chips* de ADN.

### **2.2.1.2. Estudios de asociación y enfermedad multifactorial**

Las enfermedades "complejas" o de causa multifactorial son aquellas en cuyo origen interaccionan factores ambientales y genéticos. Enfermedades como la diabetes, la enfermedad celíaca, la obesidad... o infecciones como las de origen neumocócico o meningocócico, son algunos ejemplos de este tipo de entidades.

En las últimas décadas la genética y los estudios de asociación han contribuido significativamente al avance del conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades multifactoriales. Este tipo de estudios tratan de descubrir el papel que desempeña el componente genético de los individuos en el desarrollo, la forma de presentación y el pronóstico de las enfermedades.

### **2.2.1.3. Estudios de casos y controles**

Los estudios de asociación de casos-controles son conceptualmente sencillos: las variantes genéticas de riesgo tenderán a presentarse con mayor frecuencia en una muestra de casos (individuos afectados) que en una muestra de controles (individuos sanos). Lo contrario ocurriría para una variante genética protectora. Existen varios pasos que se deben seguir a la hora de diseñar un estudio de asociación caso-control (Figura 13):

- Recogida de un número suficiente de casos y controles que permita detectar la presunta asociación de la variante genética que estamos analizando con la enfermedad;
- Selección de las variantes genéticas (SNPs) que van a ser analizadas;
- Genotipado de los SNPs;
- Análisis estadístico de los resultados con el fin de valorar si las variantes genéticas estudiadas están o no relacionadas con la enfermedad o algún aspecto de su evolución.

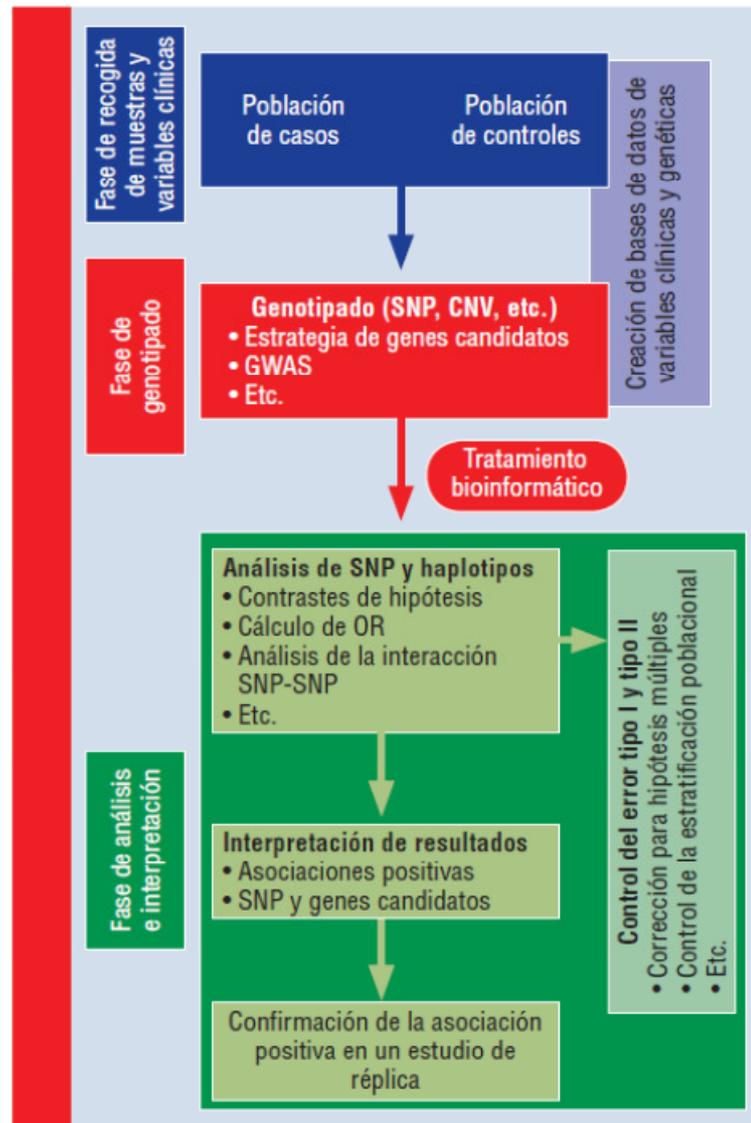


Fig. 13. Fases de un estudio de asociación genética para el estudio de las enfermedades complejas. Adaptado de Salas y cols<sup>186</sup>.

#### **2.2.1.4. Selección de SNPs**

Existen varias maneras de abordar el estudio genético de una enfermedad. En el caso más sencillo, el investigador, usando sus casos y controles, puede desear replicar una asociación previamente descrita en la literatura de un SNP concreto.

El investigador podría plantearse la hipótesis de que algún grupo de genes podría estar relacionado con una determinada patología (genes candidatos). Para estudiar la presunta asociación de estos genes con la enfermedad, se deberán seleccionar las variantes genéticas (SNPs) dentro de estos genes para posteriormente ser genotipadas en su muestra de casos y controles. Además de HapMap, existen otras muchas fuentes de información (bases de datos públicas accesibles por cualquier investigador en internet), así como, herramientas bioinformáticas para seleccionar los SNPs de interés.

Por otro lado, un proyecto de asociación mínimamente ambicioso requiere un gran esfuerzo de genotipado. Por ejemplo, genotipar tan sólo 100 SNPs en 400 casos y 400 controles, son en total 80.000 genotipos. Afortunadamente, hoy en día existen métodos y 'plataformas' de genotipado que permiten obtener miles de genotipos en pocos días a un precio razonable que lo hace cada vez más accesible a un mayor número de investigadores y laboratorios. Dependiendo del número total de genotipos y muestras a genotipar uno puede determinar cuál es la plataforma más adecuada<sup>186</sup>.

#### **2.2.1.5. *Genome-wide association studies* (GWAS)**

En el estudio genético de la enfermedad compleja, existe otra alternativa cada vez más demandada en la comunidad científica. Se trata del 'barrido genómico', técnica hoy en día más conocida como *genome-wide association studies* (GWAS). En este tipo de estudio no existe una hipótesis preconcebida (como es el caso del 'gen candidato'), sino que se trata de estudiar muchos miles de SNPs distribuidos a lo largo de todo el genoma en búsqueda de algún gen que pudiera estar asociado con la patología. Actualmente, existe un gran número de compañías que comercializan este tipo de análisis de genotipado lo cual facilita la labor del investigador. La gran desventaja de estos estudios es su alto coste; además, el análisis de los datos de un GWAS presenta importantes retos desde el punto de vista estadístico y de interpretación de resultados.

### 2.2.1.6. Tratamiento estadístico e interpretación de los resultados en los estudios de asociación

- **La estratificación poblacional** es, probablemente, el mayor problema al que se enfrentan los estudios de asociación. Los casos y controles deben ser recogidos en el mismo grupo poblacional, ya que, de no ser así, es posible que determinadas variantes genéticas aparezcan como factores de riesgo de enfermedad cuando en realidad tienen que ver con las características propias de la población.
- **Correcciones estadísticas para hipótesis múltiples:** Cuando se estudian varios SNPs, la probabilidad de que alguno de ellos aparezca como "estadísticamente" asociado al azar se incrementa; como promedio, uno de cada 20 SNPs estudiados aparecerá como estadísticamente asociado solamente por azar, con un valor de  $\alpha = 0,05$ . Existen varios métodos para ajustar los umbrales de significación y corregir el efecto de las hipótesis múltiples, como la corrección de Bonferroni, o el de Benjamini y Hochberg.
- La asociación observada debe **replicarse** de manera consistente en otra muestra recogida de manera independiente, de cara a validar los hallazgos encontrados en el estudio realizado.

### 2.2.2. Bases genéticas de la enfermedad meningocócica

Se cree que los factores genéticos pueden influir en cualquier punto de la interacción entre el meningococo y el huésped: la colonización de la nasofaringe, la invasión del torrente sanguíneo o el grado de activación de la respuesta inflamatoria o de la coagulación, modulando el desenlace final de la enfermedad meningocócica<sup>99</sup> (Figura 14).

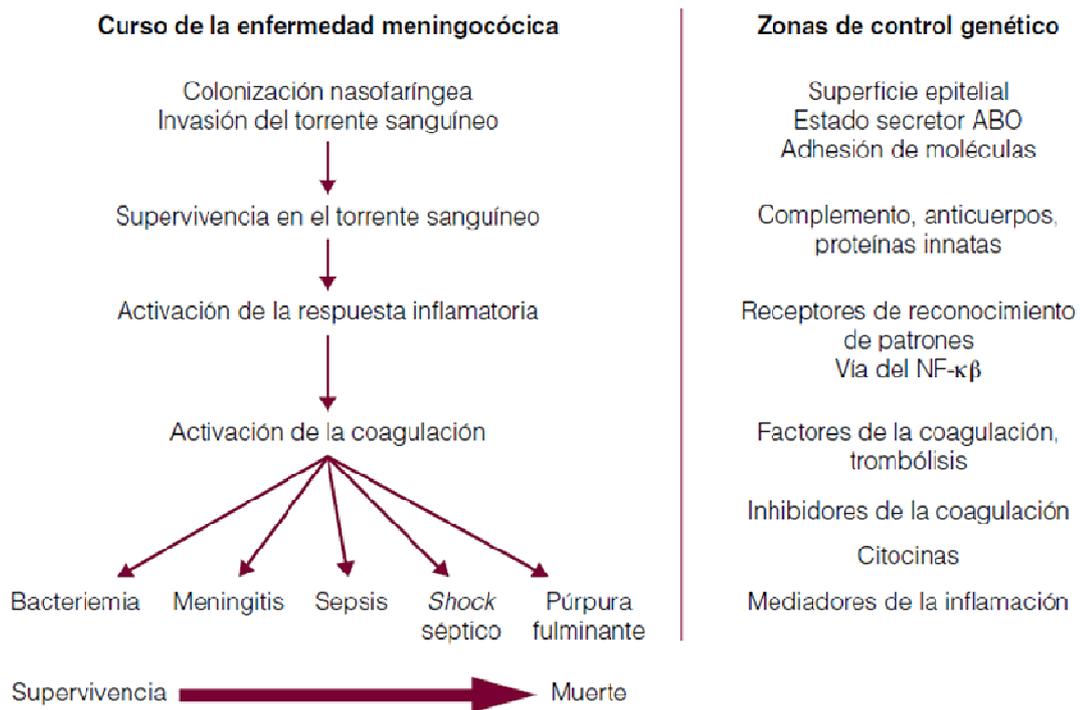


Fig. 14. Zonas de control genético en relación al curso de la enfermedad meningocócica. Adaptado de Wright et al.

### 2.2.2.1. Factores de la mucosa del huésped

#### 2.2.2.1.1. Estado de secretor asociado a los antígenos del sistema ABO

Dos de los primeros estudios genéticos en pacientes con EM<sup>187-188</sup> apuntaron el papel del 'estado secretor' de los antígenos de los grupos sanguíneos ABO, rasgo sujeto a control genético. Aproximadamente el 15% de la población no secreta en su saliva las formas hidrosolubles de los antígenos de su grupo sanguíneo, lo cual puede facilitar la colonización de la mucosa nasofaríngea por el meningococo. Estos estudios describieron una asociación entre el estado de no secretor ABO y el riesgo de presentar EM. No obstante, el escaso número de pacientes incluidos obliga a la validación de este hallazgo en nuevos estudios, que establezcan a su vez cuál es su mecanismo fisiopatológico.

#### 2.2.2.1.2. Moléculas de adhesión

Para poder invadir el torrente circulatorio y causar enfermedad, el meningococo debe primero colonizar el epitelio respiratorio de la nasofaringe del huésped. Esta colonización depende, entre otros factores, de la interacción de diversas adhesinas de la superficie bacteriana con receptores específicos epiteliales del huésped. Entre ellas,

las proteínas meningocócicas asociadas a opacidad (Opa) se unen a la molécula de adhesión celular del antígeno carcinoembrionario (CEACAM) epitelial. *Callaghan et al*<sup>89</sup>. evaluaron recientemente el papel de la diversidad genética de CEACAM en la susceptibilidad a la EM. Este estudio con diseño caso-control observó varios polimorfismos informativos localizados en cuatro genes CEACAM (1,3, 5 y 6), pero no consiguieron demostrar una asociación con la EM. No obstante, estos autores identificaron diversos haplotipos frecuentes en cada gen CEACAM, observando una asociación dosis-dependiente entre tres haplotipos en CEACAMs 3 y 6 y la EM, dos con efecto protector y otro asociado a mayor susceptibilidad a la EM. Así pues, estos hallazgos sugieren que CEACAM puede ser un determinante de la susceptibilidad humana a EM, pero se precisan más estudios que confirmen esta asociación y establezcan el mecanismo exacto de la misma.

#### **2.2.2.2. Variabilidad genética en la respuesta inmunológica innata del huésped**

Desde los estudios de Goldschneider en los años 1960s<sup>49</sup>, la producción de anticuerpos bactericidas se ha considerado el mayor mecanismo protector contra la EM. Estos anticuerpos se adquieren durante el estado de portador del meningococo, y a través de reactividad cruzada con otras especies comensales nasofaríngeas como *N. lactamica*. La colonización nasofaríngea incentiva la producción de anticuerpos de los tres principales tipos de inmunoglobulinas en un periodo de 7-10 días, sin embargo la mayoría de casos de EM ocurren en la primera semana tras la adquisición nasofaríngea de una nueva cepa de *N. meningitidis*, y por tanto antes de la producción de anticuerpos. El hecho de que la mayoría de individuos no desarrollen EM invasiva tras la adquisición nasofaríngea del meningococo (a pesar de no disponer previamente de anticuerpos bactericidas) sugiere que son los mecanismos de la inmunidad innata (más que la respuesta inmunológica adquirida) los que juegan un papel importante en el desarrollo de EM en los individuos susceptibles.

Se entiende que la respuesta inmunológica innata es ontogénicamente más antigua que la adquirida, y comprende un sistema de proteínas y receptores celulares constitutivos que reconocen microorganismos e inician respuestas bactericidas y opsono-fagocíticas no específicas. Los defectos en la inmunidad innata del huésped se han asociado tanto a aumento de la susceptibilidad, como de la gravedad de la EM.

### 2.2.2.2.1. Receptores de tipo Toll

La respuesta inmunológica innata frente a los distintos patógenos se desencadena tras el reconocimiento de elementos estructurales comunes presentes en bacterias y virus por una serie de receptores de reconocimiento de patrones llamados *receptores tipo Toll* (TLR). El LOS del meningococo es el componente de membrana más potente en la activación de la respuesta innata vía TLR-4. Esta interacción activa una vía de señalización intracelular que resulta en la liberación de citocinas proinflamatorias y en la respuesta inflamatoria sistémica del huésped frente a la infección.

En modelos animales iniciales se demostró un aumento de la susceptibilidad a infecciones por microorganismos Gram-negativos en ratones portadores de una mutación en el gen del TLR4 que imposibilitaba el reconocimiento al lipopolisacárido bacteriano<sup>190</sup>. Este hallazgo inspiró la hipótesis de que mutaciones similares en humanos pudieran aumentar la susceptibilidad a infecciones por Gram-negativos. *Smirnova et al.* estudiaron el gen TLR4 sin hallar asociación entre polimorfismos comunes y la susceptibilidad a la EM. No obstante, tras secuenciar completamente el gen, los autores sí identificaron un exceso de variantes poco comunes en pacientes con EM<sup>7</sup>. Esto sugirió a los autores que mutaciones poco comunes pero altamente nocivas podrían jugar un papel más importante en el desarrollo de la EM que polimorfismos más comunes y menos deletéreos, apuntando además a un papel crítico del TLR4 en el riesgo de EM. Posteriormente, *Faber et al.*<sup>191</sup> describieron una asociación del polimorfismo Asp299Gln en el gen *TLR4* asociado a una mayor susceptibilidad a padecer EM pero sólo en pacientes por debajo de 12 meses de edad. Este polimorfismo se traduce en una hipo-respuesta del huésped al LOS en las células epiteliales respiratorias, sugiriendo por tanto un papel modulador en la gravedad de la EM. Un análisis ulterior de esta cohorte demostró un incremento de mortalidad en los niños de cualquier edad heterocigotos para este genotipo, siendo máxima en pacientes menores de 2 años, en los que la mutación también se asoció a necesidad de ventilación mecánica<sup>192</sup>. Sin embargo, otros estudios no han podido replicar estos hallazgos<sup>193-194</sup>, tal vez debido a diferencias en la edad y tipo de población estudiada.

Además de la proteína que codifica el gen *TLR4*, existen otras proteínas involucradas en la detección de estructuras bacterianas, tales como las codificadas por los genes *TLR2* y *TLR9*. El producto del gen *TLR2* se une a la porina de la membrana externa meningocócica PorB, mientras que el gen *TLR9* codifica una proteína que reconoce motivos Citosina-fosfato-Guanina (CpG) no metilados del ADN microbiano, desencadenando una cascada de señalización intracelular que resulta en la

producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas. Recientemente, un estudio realizado en niños con meningitis meningocócica ha mostrado el papel protector contra la meningococemia de las variantes localizadas en el gen *TLR9* SNP +2848 y -1237, prerrequisito esencial para la invasión meníngea, y una asociación con una mayor respuesta inflamatoria local en el sistema nervioso central (SNC). Así pues, según los autores, los portadores de estas mutaciones presentan un menor riesgo de desarrollar meningitis cuando son colonizados por el meningococo, y aquellos que la desarrollan presentan una mejor respuesta bactericida en el SNC, con mayor riesgo potencial de desarrollo de secuelas neurológicas<sup>195</sup>. En este sentido, este mismo grupo de investigadores acaban de referir un mayor riesgo de sordera post-meningitis meningocócica asociado al polimorfismo TLR4+896 (*P*-valor = 0.0004, OR 6.2), y a la combinación del genotipo salvaje TLR2+2477 con la mutación TLR4+896 (*P*-valor = 0.0001, OR 7.6).<sup>95</sup>

Tras la unión de los TLRs a sus dianas, se activan una serie de genes reguladores de la activación celular. Variaciones genéticas en estos genes podrían estar implicadas en la regulación del reconocimiento del microorganismo por parte del huésped y la activación de la respuesta inflamatoria. En este sentido, se ha descrito en la literatura un caso de déficit completo de IRAK-4 (normalmente asociado con infecciones por Gram-positivos) y la EM<sup>197</sup>. En conjunto, todos estos estudios sugieren que los TLR, y muy en especial el TLR4 y su vía de señalización, son componentes esenciales en el control de la respuesta inmunológica a la EM.

#### **2.2.2.2.2. Sistema del complemento**

El sistema del complemento es esencial en la respuesta inmunológica innata frente a la infección. Existen tres vías de activación diferentes del sistema del complemento que convergen en la formación de un complejo de ataque de membrana cuyo fin es la lisis y muerte de la bacteria (Figura 7).

- La *vía clásica* se activa por los complejos antígeno-anticuerpo;
- La *vía ligada a la lectina de unión a la manosa (MBL)*, homóloga a la vía clásica, se inicia tras la unión de MBL a carbohidratos de la pared microbiana, lo cual activa a las serín-proteasas asociadas a MBL (MASP-1 y MASP-2);
- La *vía alternativa del complemento* se puede activar por la interacción del componente C3 del complemento con el patógeno, o actuar como un asa de amplificación de las otras dos vías del complemento.

Todas las vías convergen en la formación del enzima C3 convertasa, la cual produce C3a y C3b. C3b puede actuar como opsonina uniéndose a patógenos y facilitando la fagocitosis, o unirse a la C3 convertasa, formar C5 convertasa y generar C5a y C5b. Estos últimos inducen la formación del complejo de ataque de membrana (MAC) en el patógeno (componentes C5-C9), que produce poros en las membranas bacterianas resultando en la muerte del patógeno.

- **Componentes del complemento dependientes de anticuerpos:** Los déficits congénitos del complemento han sido los primeros y más estudiados defectos genéticos descritos capaces de predisponer a EM. Los primeros estudios de EM en adultos identificaron un defecto del complemento en 10-20% de los casos<sup>198</sup>, los cuales se han identificado sólo raramente en niños con EM esporádica. Defectos tanto en componentes tempranos del complemento (C1, C2, C3, C3b), como en componentes terminales (C5-C9) han sido descritos en pacientes con EM. Los defectos terminales, además, se asocian a riesgo de EM recurrente<sup>199</sup> a pesar de la presencia de anticuerpos, lo cual apunta al papel crítico del complemento en la respuesta a *N. meningitidis*. Además, en estos casos parece que la gravedad de la EM puede ser menor que en individuos sin déficits de complemento, sugiriendo que los componentes terminales del complemento pueden estar involucrados también en la patofisiología de la EM grave.
- **Lectina de unión a la manosa (MBL):** Se han descrito hasta la fecha tres polimorfismos en el gen *MBL2*, que resultan en tres variantes alélicas estructurales (conocidas como B, C y D) y concentraciones plasmáticas menores de MBL. Estas variantes se asociaron a mayor susceptibilidad a la EM en dos pequeños estudios realizados en niños con EM<sup>8,200</sup>. No obstante, ninguno de estos estudios ni su metaanálisis<sup>201</sup>, pudieron demostrar una asociación con mortalidad. El déficit de MBL también se describió en tres miembros de una misma familia con antecedente de EM<sup>202</sup>, así como asociado a otras infecciones, como la infección neumocócica. Estos datos iniciales apuntaron a un papel potencial del gen *MBL* en la susceptibilidad a EM, especialmente teniendo en cuenta su relativa alta prevalencia en la población general (frecuencia estimada en Europa de 0,23 (IC al 95% 0,226-0,234). Sin embargo, un estudio caso-control reciente en donde se analizan 296 casos confirmados de EM y 5.196 controles europeos no ha podido identificar asociación alguna entre los polimorfismos del gen *MBL2* y la EM, tanto en la cohorte general como analizando la muestra según subgrupos de edad<sup>203</sup>. Estos autores atribuyen los hallazgos previos a errores sistemáticos en los estudios,

cuyos individuos control presentaban frecuencias alélicas de polimorfismos *MBL* significativamente inferiores a las descritas en la población general.

- **Reguladores de la activación del complemento:** A pesar de que la activación del complemento es un componente fundamental de la respuesta innata del huésped frente a la infección meningocócica, la activación descontrolada del mismo en el transcurso de la EM puede resultar nociva para el huésped y contribuir al daño tisular asociado. Así pues, la activación del complemento se encuentra en condiciones normales estrechamente regulada a través de una serie de inhibidores y reguladores positivos que actúan en cada paso de la cascada enzimática de activación del complemento. La importancia de estos reguladores se pone de manifiesto en el hecho de que algunos son al mismo tiempo diana de patógenos (*N. meningitidis* entre ellos), quienes logran evadir así la acción bactericida del complemento.
- **Properdina:** La properdina es un regulador positivo de la vía alternativa del complemento, que se une y estabiliza las convertasas C3 y C5, C3bBb y C3bBbC3b. Pacientes con déficit congénito de properdina (herencia ligada al cromosoma X) pueden desarrollar una meningococemia fulminante, con tasas de mortalidad entre 33 y 75%<sup>204</sup>. Los individuos que sobreviven, sin embargo, no tienden a presentar infecciones recurrentes<sup>205</sup>. El déficit de properdina se asocia también a una mayor susceptibilidad a EM causada por serotipos poco habituales de *N. meningitidis*, lo cual sugiere que la properdina es un mecanismo de protección fundamental frente a la *Neisseria sp.* Además, se han identificado variantes genéticas en otros genes asociadas al déficit de properdina, tales como déficits de proteína C<sup>206</sup>, el alotipo IgG G2m(n)<sup>205</sup>, o MBL<sup>207</sup>. Esto sustenta la hipótesis de que los individuos con mayor susceptibilidad a EM son aquellos portadores de múltiples mutaciones deletéreas.
- **Factor D:** Los polimorfismos en el Factor D, otro miembro de la vía alternativa del complemento, se han visto también asociados a la susceptibilidad a EM en dos pequeños estudios familiares, cuyo valor es limitado mientras no sean replicados.
- **Factor H:** El factor H del complemento (CFH) es una proteína cuya principal función es regular la activación de la vía alternativa del complemento, compitiendo con la interacción del factor B de la vía alternativa y la convertasa C3 para producir C3b inactivo. Tras la descripción de varios casos de EM asociada a déficit de CFH<sup>208-209</sup>, *Haralambous et al*<sup>10</sup>. exploraron la hipótesis de que variantes alélicas del gen *CFH* resultantes en concentraciones plasmáticas de CFH diferentes modularían la

susceptibilidad a EM. Estos autores mostraron que el polimorfismo común C496T localizado en el promotor del gen *CFH* resulta en una concentración plasmática elevada de CFH y mayor susceptibilidad a EM (OR 2, IC al 95% 1.3 - 3.2, *P*-valor = 0.001), particularmente la causada por el serogrupo C. Según este estudio, el riesgo atribuido a este polimorfismo, junto con su alta frecuencia en la población general, supone un efecto estimado de esta variante en la población (medido a través de la fracción atribuible en la población) de hasta el 30%<sup>9</sup>. Estudios funcionales *in vitro* han obtenido resultados parecidos.

Curiosamente, los datos iniciales muestran que el riesgo de padecer EM es superior tanto en individuos carentes de CFH, como en aquellos con la variante C496T y niveles circulantes altos de la proteína. La explicación más probable es que individuos con déficit total de CFH presenten una activación excesiva de la vía alternativa del complemento que resulte en una depleción por consumo de los componentes del complemento necesarios para la defensa contra el meningococo; mientras que en individuos con altos niveles de CFH, la interacción de la proteína de unión al factor H del complemento (fHbp) permita al meningococo evadir la lisis mediada por complemento. En este sentido, es importante destacar que la nueva generación de vacunas anti-meningocócicas frente al serogrupo B, incluye precisamente en su composición el fHbp.

#### 2.2.2.2.3. Proteínas del surfactante

Las proteínas del surfactante SP-A y SP-D son moléculas de reconocimiento de patrón expresadas en la nasofaringe y el tracto respiratorio del huésped. Se unen a azúcares microbianos y activan la respuesta inflamatoria y fagocitosis. El hecho de que estas proteínas se expresen en el mismo lugar que generalmente usa *N. meningitidis* para colonizar al individuo, sugiere la posibilidad de que existan variaciones genéticas en los genes que codifican estas proteínas que pudieran estar relacionados con una expresión y/o función diferencial en la susceptibilidad a EM.

Así pues, *Jack et al*<sup>10</sup>. en un estudio caso-control con 330 pacientes, estudiaron varios polimorfismos en los genes *SP*. Uno de ellos, el denominado alelo 1A<sup>1</sup> localizado en el gen *SP-A2*, se asoció con un aumento tanto de la susceptibilidad a EM (OR, 6,7; IC al 95% 1,4-31,5), como de la mortalidad asociada (OR ajustada por edad, 2,9; IC al 95% 1,1-7,7). Además, se observó un efecto protector frente a EM asociado al alelo 1A<sup>5</sup> y dos asociaciones (una protectora y otra de riesgo) relacionadas

con dos haplotipos distintos, *SP-A1/SP-A2*. De nuevo, estos resultados deben interpretarse como preliminares, ya que aún no han sido confirmados en otras cohortes.

### **2.2.2.3. Variabilidad genética en la respuesta inmunológica adquirida del huésped**

Un proceso de fagocitosis efectivo precisa de los receptores de la fracción Fc de las inmunoglobulinas (FcRs) situados en la superficie de los fagocitos. Existen tres clases de FcRs para las IgG (FcγR): FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Todas ellas forman doce subclases, tres de las cuales son importantes en la defensa del huésped contra el meningococo (FcγRIIIa, FcγRIIIa y FcγRIIIb). FcγRIIIa se expresa constitutivamente en los neutrófilos y es crucial para la unión con IgG2. Existen dos alotipos de FcγRIIIa, en función de la presencia de un residuo arginina (R) o histidina (H) en la posición 131, lo cual modifica la eficiencia de su unión a IgG2 e IgG3. Así, los neutrófilos con el alotipo FcγRIIIa-H/H131 fagocitan más efectivamente que aquellos con el alotipo FcγRIIIa-R/R131. El FcγRIIIa, expresado en monocitos/macrófagos y células NK, tiene una fenilalanina o una valina en la posición 158, lo cual también determina su unión a IgG1, IgG3 e IgG4. Finalmente, el FcγRIIIb de los neutrófilos tiene un polimorfismo que causa la sustitución de cuatro aminoácidos y altera la glicosilación del receptor. Esta variante FcγRIIIb del antígeno neutrófilo 1 (FcγRIIIb-Na1) se une más eficientemente a IgG3 que la variante FcγRIIIb-Na2.

Diversos estudios han investigado la hipótesis de que la variabilidad de alotipos en los FcRs juegue un papel en la susceptibilidad y gravedad de la EM, tanto en pacientes con un complemento normo-funcionante, como en aquellos con déficits de las fracciones terminales del mismo (C5-C9). Así, se postuló que los individuos con alotipo FcγRIIIa-R/R131 serían más susceptibles a EM que aquellos con alotipos RIIIIa-R/H131 y RIIIIa-H/H131. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha han ofrecido resultados confusos e inconsistentes<sup>211-213</sup>, probablemente en relación a los pequeños tamaños muestrales, y a diferencias fenotípicas en la población estudiada y en la metodología utilizada. Las especulaciones resultantes de estos estudios, no obstante, pueden resumirse en dos puntos: los variantes de FcγRIIIa, que podrían modificar la susceptibilidad a EM en pacientes mayores de cinco años (con o sin déficits asociados del complemento), y las variantes de las subclases FcγRIIIa y FcγRIIIb, que lo harían únicamente en individuos con déficits terminales de

complemento. Por otro lado, disponemos de un mayor grado de evidencia para la asociación entre FcγRIIIa-R/R131 y gravedad de la EM. Así, un estudio de asociación español con 130 casos de EM, demostró una prevalencia significativamente mayor en individuos con sepsis meningocócica fulminante (OR 3,6, IC al 95% 1,1-13,2, *P*-valor = 0,03) y con meningococemia sin meningitis (OR 3,3, IC al 95% 1,5-7,4, *P*-valor = 0,002). Además, los pacientes portadores del alotipo FcγRIIIa-R/R131 presentaron una incidencia significativamente mayor de complicaciones y secuelas que sus controles sanos<sup>214</sup>. No se han hallado asociaciones significativas entre polimorfismos de FcγRIIIa o FcγRIIIb y EM<sup>211</sup>.

En resumen, a pesar de que las variantes FcγRIIIa parecen influir en la susceptibilidad y gravedad de la EM, con los datos disponibles hoy por hoy es difícil concluir que estas asociaciones sean reales. Estudios de mayor tamaño con definiciones uniformes de los casos y controles son necesarios para poder obtener respuestas definitivas.

#### **2.2.2.4. Control genético de la coagulación y *purpura fulminans***

Una de las características clínicas más relevantes de la EM es la ocurrencia de púrpura y coagulación intravascular diseminada. Mientras que la mayoría de pacientes con EM presentan un cierto grado de activación de la coagulación, sólo un 5-10 % de los niños desarrollan *purpura fulminans*, la complicación más devastadora de la EM con una mortalidad asociada del 30-60% y que puede resultar en gangrena periférica y necesidad de injertos cutáneos o amputaciones en los supervivientes<sup>215</sup>.

Durante la última década, diversos estudios han demostrado que la fisiopatología de la coagulopatía en la EM resulta de un desequilibrio altamente complejo entre vías procoagulantes y anticoagulantes, que deriva en la formación diseminada de trombos en la microcirculación, la alteración de la fibrinólisis y una coagulopatía y trombopenia de consumo. Así, en la sepsis meningocócica con *purpura fulminans* las concentraciones plasmáticas de los inhibidores de la coagulación antitrombina III, proteína C y proteína S, y la expresión endotelial de glicosaminoglicanos (GAGs) están muy disminuidas. Los niveles de GAGs en plasma y orina se elevan y se altera la producción de prostaciclina inhibidora de plaquetas. Además, mientras que la exposición de monocitos y células endoteliales al meningococo incrementa la expresión del factor tisular, los niveles plasmáticos del inhibidor de la vía del factor tisular descienden significativamente. Por otro lado, existe una depleción marcada del receptor endotelial de la proteína C (PC) y la

trombomodulina, ambos elementos necesarios para la activación de la PC. Todos estos factores contribuyentes a la CID ocurren concomitantemente con una disfunción de la fibrinólisis, inhibida por los altos niveles circulantes del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1).

Dada la proporción relativamente pequeña de casos de EM con esta complicación, es posible que existan diferencias individuales, genéticamente determinadas, en la concentración y función de cualquiera de los componentes implicados en la cascada de la coagulación y fibrinólisis, que modifiquen la gravedad de la EM y la incidencia de complicaciones trombóticas.

#### **2.2.2.4.1. Factor V**

Uno de los factores de riesgo más frecuentes de trombosis es la aparición de una mutación no sinónima en el exón 10 del gen *Factor V de Leiden (FVL)* localizado en el brazo corto del cromosoma 1. Este trastorno se hereda de forma autosómica dominante y tiene penetrancia. La mutación aumenta el riesgo de trombosis venosa y tromboembolismo pulmonar al impedir que la proteína C inactive el factor V (y factor VIII) y regule así la cascada procoagulante. Así por ejemplo, la mutación en homocigosis se asoció al desarrollo de *purpura fulminans* en una niña de cuatro años con EM<sup>216</sup>. En un estudio de 259 niños con EM, si bien no se halló asociación entre FVL y susceptibilidad a la infección, sí se mostraron formas de *purpura fulminans* más graves en niños con la mutación<sup>217</sup>.

#### **2.2.2.4.2. Activador tisular del plasminógeno (t-PA) e inhibidor del activador del plasminógeno (PAI)**

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA) activan la fibrinólisis al convertir el plasminógeno en plasmina, su forma activa. La plasmina promueve entonces la degradación de los coágulos de fibrina. Hasta la fecha, no se han demostrado polimorfismos asociados con la EM en el gen que codifica t-PA, y no existen estudios que hayan evaluado el gen de u-PA. Sin embargo, el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) se ha estudiado exhaustivamente, habiéndose descrito un polimorfismo funcional en la región promotora del gen que lo codifica (*SERPINE1*) asociado a la gravedad y el pronóstico de la EM en muchos estudios.

Varios estudios han demostrado una asociación entre el polimorfismo de inserción/delección 4G/5G en la región promotora *SERPINE1* con los niveles

plasmáticos de PAI-1 y el pronóstico de la EM. Esta asociación ha sido consistente en un metaanálisis reciente<sup>201</sup>. Diversos estudios posteriores han demostrado además que los pacientes con sepsis meningocócica y homocigosis 4G/4G son los que presentan mayor concentración de PAI-1 y riesgo de mortalidad en relación al desarrollo de fallo multiorgánico y CID. Además, los supervivientes con dicho genotipo sufren mayor incidencia de complicaciones vasculares.

En conjunto, estos estudios indican un efecto genuino de los polimorfismos de PAI-1 en la gravedad de la EM y sugieren que la vía fibrinolítica es un componente clave de la respuesta inflamatoria a la EM.

#### **2.2.2.4.3. Proteína C (PC)**

La PC, anticoagulante natural, se activa gracias a la acción combinada de la trombina, trombomodulina y receptor endotelial de PC. Una vez activada, inhibe al PAI-1, inactiva el factor V y VIII y controla la respuesta inflamatoria. En la sepsis meningocócica, niveles bajos de PC están asociados a un incremento en la gravedad. Se han descrito dos polimorfismos en la región promotora del gen de la PC (C-1654T, A-1641G) capaces de alterar sus niveles plasmáticos. Un estudio de *Binder et al*<sup>81</sup> encontró una frecuencia significativamente mayor del haplotipo CG en niños menores de un año de edad con sepsis meningocócica, asociada en pacientes homocigóticos con mayor riesgo de precisar soporte inotrópico. Curiosamente, el genotipo TA-TA resultó aparentemente protector<sup>81</sup>.

#### **2.2.2.4.4. Inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina (TAFI)**

El inhibidor de la fibrinólisis activable por la trombina es otro inhibidor natural de la fibrinólisis. Éste contiene tres SNPs en la región codificante de su gen *CPB2*, uno de los cuales (Thr325Ile) conduce a un mayor potencial antifibrinolítico. Este SNP se estudió en padres de niños con antecedente de EM (vivos o no) y en pacientes supervivientes. A pesar de no hallarse asociación entre el SNP y susceptibilidad a EM en los pacientes, sí se observó esta asociación en los padres de los niños fallecidos por EM, sugiriendo una vinculación de este polimorfismo con el pronóstico de la EM<sup>218</sup>. En otro pequeño estudio en niños con EM, los niveles de marcadores de activación de TAFI se correlacionaron intensamente con otros marcadores analíticos de gravedad de sepsis meningocócica, siendo la frecuencia de Thr325Thr significativamente superior en pacientes con CID<sup>219</sup>.

### 2.2.2.5. Importancia de la variabilidad genética en las citocinas

Muchos autores sugieren que los pacientes con EM fulminante y fatal sufren una respuesta inflamatoria excesiva e incontrolada. La producción de citocinas proinflamatorias no está regulada exclusivamente por sus genes promotores, sino por una compleja serie de eventos que empieza con la activación del CD14 y TLR4 por el LOS meningocócico, seguido de una cascada de señalización intracelular que conduce a la liberación de factores de transcripción nucleares y finalmente a la síntesis de citocinas. Las variaciones genéticas en cualquiera de las moléculas involucradas en esta vía podrían teóricamente modificar la susceptibilidad o gravedad de la respuesta inflamatoria en la EM.

El TNF es un elemento clave en la activación macrofágica y respuesta inflamatoria a la EM. Aproximadamente el 60% de la variación de la producción de TNF está determinada genéticamente, y los niveles de TNF se correlacionan con la gravedad de la EM. Se han identificado dos polimorfismos en las posiciones -308 y -238 del gen promotor de *TNF*, pero ninguno se ha asociado definitivamente a susceptibilidad o mortalidad en la EM<sup>6</sup>.

Las citocinas IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son también esenciales en la respuesta inflamatoria a la infección meningocócica, participando en un amplio espectro de actividades biológicas tales como la inducción de la fiebre y la liberación de proteínas de fase aguda. Su acción está regulada por el antagonista del receptor de IL-1 (IL-1Ra), que se une competitivamente al receptor de IL1. Varios estudios han buscado la asociación entre variantes alélicas en los genes de la familia IL1 y la EM, sin aportar resultados concluyentes<sup>220-221</sup>. La IL-6 es otra citocina proinflamatoria importante en la respuesta innata al meningococo, correlacionándose sus niveles plasmáticos con mortalidad. Además, IL-6 parece responsable de la disfunción miocárdica asociada a la sepsis meningocócica. Hasta la fecha, un solo estudio ha investigado y mostrado una asociación entre el genotipo GG del polimorfismo del promotor de *IL6* en la posición -174 y mortalidad por la EM<sup>222</sup>. Por último, el 75% de la variación en la producción de IL10, citocina supresora de la respuesta inflamatoria, está genéticamente determinado. Un polimorfismo (A1082G) en el gen IL-10 se ha asociado con mayor gravedad de la EM solo, y en combinación con los genotipos de Fc $\gamma$ R1a en familiares de pacientes con EM<sup>211</sup>.

#### 2.2.2.6. Otros determinantes genéticos de la enfermedad meningocócica

- **Enzima convertidor de angiotensina (ECA):** Forma parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona y potencia la respuesta inflamatoria. Su actividad plasmática y tisular se altera por la presencia del llamado alelo D en un polimorfismo del gen de la ECA. Esta variante en homocigosis (DD) se ha asociado a mayor gravedad y morbilidad de la EM en un solo estudio con 113 pacientes<sup>223</sup>, pero no en otro pequeño estudio posterior.
- **ADN mitocondrial:** Un estudio reciente realizado por nuestro grupo<sup>11</sup> evaluó el posible papel de la variación genética del ADN mitocondrial humano y la susceptibilidad o curso clínico de la EM. El estudio analizó 307 casos pediátricos de EM en niños españoles y dos grupos independientes de controles de 917 y 616 individuos respectivamente. A pesar del tamaño muestral relativamente grande, no se pudo identificar una asociación significativa entre SNPs mitocondriales o haplogrupos de DNA mitocondrial y la EM<sup>11</sup>, excluyéndose con rotundidad su implicación e incluso poniendo en duda su papel en otras formas de sepsis o shock séptico.



### **3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

*N. meningitidis* es una de las principales causas de meningitis bacteriana, sepsis grave y shock séptico en todo el mundo, y constituye la primera causa de muerte por infección en países desarrollados. El mejor conocimiento de la enfermedad meningocócica (EM), podría contribuir al desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas eficaces, que ayudasen a modular el curso y pronóstico de esta enfermedad, hasta el momento tan impredecible y potencialmente devastadora.

Una de las características más llamativas de la infección meningocócica es, sin duda, el alto grado de variabilidad interindividual existente, tanto en la susceptibilidad a adquirir la infección, como en la presentación clínica, espectro de gravedad y pronóstico. Sabemos que el riesgo relativo de EM entre hermanos, comparado con el de la población general, es similar al de otras enfermedades poligénicas importantes (tales como la artritis reumatoide, diabetes, etc.) en las que el papel de la genética ya ha sido claramente establecido. Sin embargo la mayoría de los estudios genéticos realizados en EM hasta la fecha presentan importantes limitaciones.

La disponibilidad de nuevas tecnologías y en concreto los estudios de asociación de base poblacional como los basados en el *barrido genómico* (ampliamente conocidos en la jerga genómica como *Genome-Wide Association Studies*, GWAS) están permitiendo identificar variantes comunes de baja penetrancia, capaces también de modular la susceptibilidad y pronóstico de muchas enfermedades. Este abordaje no se ha realizado antes en el contexto de la enfermedad meningocócica.

La identificación de factores genéticos que pudiesen influenciar el patrón de respuesta individual a la infección meningocócica nos permitiría modificar la evolución y el pronóstico de nuestros niños, y sentaría las bases necesarias para el desarrollo farmacogenético y farmacogenómico de la enfermedad, tanto de su profilaxis como de su tratamiento.

- El **objetivo general** de este estudio es determinar si existe algún tipo de **condicionamiento genético que explique la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica**.
- Para lograrlo, los **objetivos específicos** serán desarrollados en dos fases diferentes, de la manera que sigue:
  - **Primera fase:**
    - o La realización del primer GWAS de susceptibilidad a enfermedad meningocócica comunicado hasta el momento, en una muestra de casos de enfermedad meningocócica y controles de Reino Unido;
    - o Los polimorfismos (SNPs) que alcancen mayor significación en este GWAS inicial serán replicados en otras dos cohortes europeas independientes de casos y controles;
    - o Mediante "mapeo fino" se identificarán los polimorfismos asociados con susceptibilidad a enfermedad meningocócica en estas tres cohortes.
  - **Segunda fase:**
    - o Con el fin de aumentar el poder de detectar otras regiones genéticas asociadas con la enfermedad meningocócica, se realizará otro segundo GWAS de susceptibilidad a enfermedad meningocócica en una cohorte de casos y controles españoles;
    - o Se llevará a cabo un metaanálisis incluyendo ambos GWAS (el de la primera y el de la segunda fase);
    - o Los SNPs seleccionados en este metaanálisis serán replicados en una tercera cohorte europea de casos y controles;

Finalmente se llevará a cabo un metaanálisis conjunto de las tres cohortes, con el fin de encontrar los polimorfismos más consistentes en todos los grupos.

## **4. HIPÓTESIS**

---



## 4. HIPÓTESIS

---

La expresión clínica de la enfermedad meningocócica es amplia e incluye desde la bacteriemia y la meningitis hasta la púrpura fulminante, pasando por el shock séptico y el fracaso multiorgánico refractarios. Se estima que alrededor del 10% de la población en circunstancias no epidémicas es portadora de este microorganismo. Las razones que explican que un paciente sea o no portador asintomático de *N. meningitidis*, y desarrolle una u otra forma clínica de la enfermedad meningocócica, pueden ser múltiples.

Creemos que la variación en la carga genética de cada individuo podría ser uno de los factores determinantes principales, y que esta carga podría identificarse a través de técnicas de genotipado de alto rendimiento basadas en SNPs y sustentadas en la hipótesis de variante común-enfermedad común.



## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 5.1. METODOLOGÍA DE LABORATORIO

A continuación se describe la metodología de laboratorio aplicada en las muestras sanguíneas de las cohortes de casos y controles de España, tanto en la primera como en la segunda fase del estudio. Para la extracción de ADN a partir de sangre periférica se utilizó un protocolo basado en fenol/cloroformo-alcohol isoamílico especialmente diseñado para manchas de fluidos biológicos, tal y como se describe a continuación:

- Cortar 1 cm<sup>2</sup> de tejido y resuspenderlo 500 µl de tampón DLB (Tris-ClH 1M, ClNa 5M, EDTA 0.5M pH 8.0).
- Añadir 50 µl de SDS al 10% y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml).
- Incubar toda la noche a 56 °C con agitación suave.
- Añadir 20 µl de NaCl 5M y 575 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Mezclar por inversión.
- Centrifugar 3 minutos a 12000 r.p.m. y pasar la fase acuosa a otro tubo.
- Añadir 575 µl de cloroformo: alcohol isoamílico y mezclar por inversión.
- Centrifugar 3 minutos a 12000 r.p.m.
- Pasar la fase acuosa a otro tubo y añadir 1 ml de etanol absoluto frío.
- Mantener durante 15 minutos a -80 °C y centrifugar 15 minutos a 12000 r.p.m.
- Vaciar el contenido de los tubos y dejar secar el precipitado al aire.
- Resuspender el precipitado en 50 -100 µl agua bidestilada estéril e incubar a 56 °C con agitación suave entre 2 y 16 horas.
- El rendimiento final es de aproximadamente 35 ng/µl.

## 5.2. PRIMERA FASE DEL ESTUDIO: UK-GWAS

### 5.2.1. Diseño del estudio

Esta primera fase del estudio (UK-GWAS) consistió en la realización del primer GWAS de susceptibilidad a enfermedad meningocócica publicado hasta el momento. Se procedió de la forma que sigue (Figura 15):

- 1º) **GWAS de descubrimiento en Reino Unido:** El GWAS se llevó a cabo en una cohorte de 547 casos de enfermedad meningocócica y 4,703 controles de Reino Unido.
- 2º) **Replicación en dos cohortes adicionales:** Los SNPs que mostraron mayor significación en este GWAS inicial fueron replicados en otras dos cohortes europeas de casos y controles: una del Oeste (cohorte centroeuropea) y otra del Sur de Europa (cohorte ESIGEM-España).
- 3º) **"Mapeo fino" e identificación de alelos de susceptibilidad:** Finalmente, mediante mapeo fino, se identificaron los polimorfismos asociados con susceptibilidad a enfermedad meningocócica en las tres cohortes.

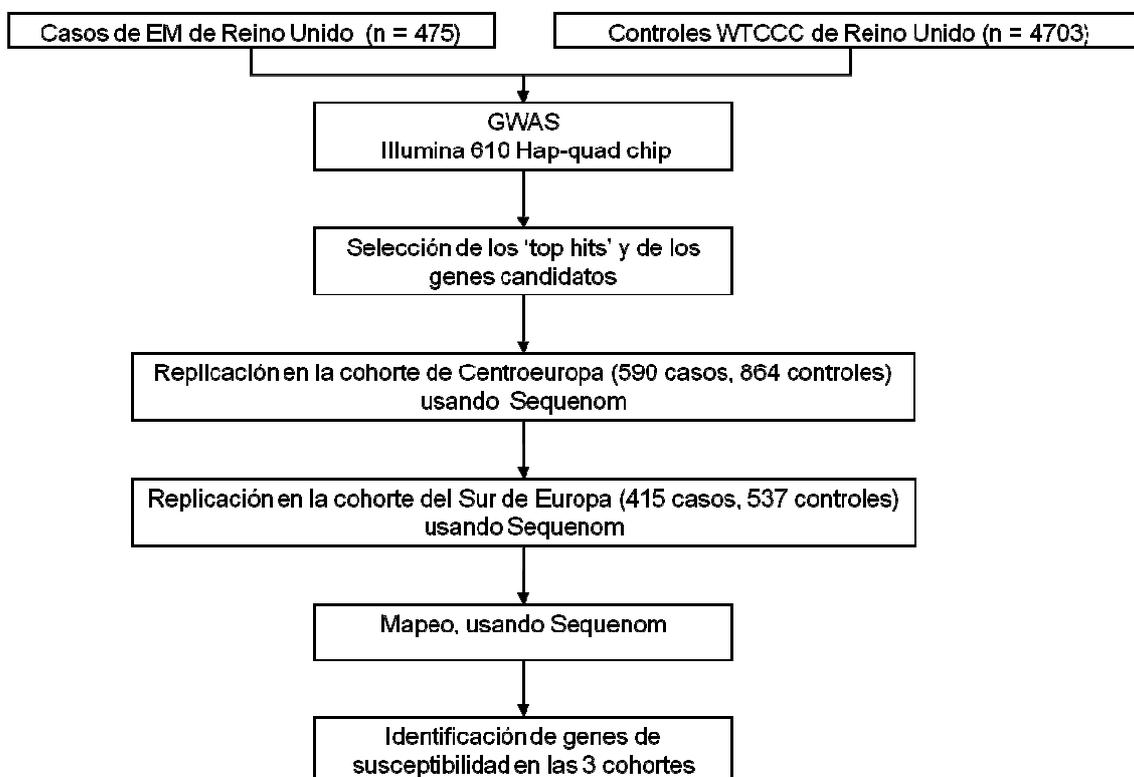


Fig. 15. Diseño esquemático de la primera fase del estudio.

### 5.2.2. Participantes en el estudio

Los criterios de inclusión y exclusión fueron uniformes a lo largo del estudio en sus diferentes fases.

Se consideraron candidatos a participar en él a pacientes diagnosticados de enfermedad meningocócica invasiva (sepsis y/o meningitis meningocócica), de acuerdo con una serie de criterios comunes. Todos los pacientes presentaban un rash petequeal o purpúrico característico, y evidencia clínica de sepsis y/o meningitis<sup>6,8,9</sup>. El diagnóstico fue confirmado microbiológicamente mediante el cultivo de *N. meningitidis* o la detección de PCR de antígeno de meningococo en líquidos normalmente estériles (sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR)). Aquellos pacientes en quienes los estudios microbiológicos fueron negativos o incompletos fueron incluidos si cumplían características clínicas de shock, rash purpúrico o meningitis, siempre y cuando hubiesen sido excluidas otras posibles bacterias patógenas (estafilococo o neumococo) o virus.

Todos los pacientes incluidos, tanto en la primera como en la segunda fase del estudio, fueron reclutados con el consentimiento informado de los padres o tutores legales correspondientes. Asimismo se contó con la aprobación de los comités de ética de todas las instituciones participantes.

#### 5.2.2.1. Casos

Las características clínicas y demográficas de cada cohorte de pacientes, después de haber sido aplicados los filtros de control de calidad, se muestran en la Tabla 8. Los detalles clínicos y demográficos de los pacientes con enfermedad meningocócica de Reino Unido y del Oeste de Europa fueron introducidos en una misma base de datos, con criterios comunes de gravedad y pronóstico. Los datos relativos a los pacientes reclutados en España se mantuvieron aparte por haberse aplicado diferentes criterios y definiciones de gravedad clínica y evolutiva.

**Tabla 8. Características clínicas y demográficas de los grupos genotipados con éxito en el UK-GWAS y en las cohortes de replicación.** MM: meningitis meningocócica. SM: sepsis meningocócica. IQR: rango intercuartil. <sup>a</sup>Total de casos de los que se dispone de información. <sup>b</sup>GMSPS: Glasgow meningococcal prognostic score; en la cohorte de ESIGEM-Spain se aplicó el MSSS: the meningococcal septic shock score. <sup>c</sup>En la cohorte de ESIGEM-Spain, la ventilación mecánica se refiere a cualquier tipo de soporte respiratorio (incluida la ventilación no invasiva).

Características	n <sup>a</sup>	UK-GWAS	n <sup>a</sup>	Oeste de Europa	n <sup>a</sup>	ESIGEM-Spain
Nº de varones (%)	442	237 (53.6)	553	293 (52.98)	415	253 (60.9)
Casos de MM (%)	439	59 (13.44)	507	135 (26.63)	377	45 (11.93)
Casos de SM (%)	439	280 (63.78)	507	160 (31.56)	377	189 (50.13)
Casos de SM y MM (%)	439	100 (22.78)	507	212 (41.81)	377	143 (37.93)
Mediana de edad al ingreso (IQR)	442	3.3 (1.36-8.24)	533	3.87 (1.47-10.78)	415	2.1 (0.94-5.1)
Mediana GMSPS (IQR) <sup>b</sup>	394	9 (6-12)	381	2 (0-5)	320	0 (0-2)
Ionotrópicos (%)	441	268 (60.77)	524	190 (36.26)	377	181 (48.01)
Ventilación mecánica (%) <sup>c</sup>	442	321 (72.62)	519	158 (30.44)	377	181 (48.01)
Injertos cutáneos (%)	442	16 (3.62)	445	9 (2.02)	377	8 (2.12)
Amputaciones (%)	442	4 (0.90)	445	11 (2.47)	377	9 (2.38)
Muertes (%)	442	18 (4.07)	534	29 (5.43)	377	16 (3.85)

### 5.2.2.1.1. Cohorte del UK-GWAS

Para la cohorte del GWAS de descubrimiento, los pacientes con ascendencia europea con enfermedad meningocócica fueron captados desde el Hospital St. Mary's de Londres (SMH), la Fundación de Investigación en Meningitis (MRF) y el Hospital Alder Hey Children's, en Liverpool. El serogrupo de las cepas causales fue establecido en 209 pacientes: 4 pacientes con serogrupo A, 112 con serogrupo B, 85 con serogrupo C, 2 con serogrupo W135 y 11 con serogrupo ACWY.

- Los pacientes del SMH fueron 328 niños ingresados de forma consecutiva en la Unidad de Cuidados Intensivos de dicho hospital, entre 1992 y 2003, con un rango de edad para el debut de la enfermedad de 0.02 a 19.71 años decimales, y una mediana de 3.13 años decimales (n=309). Todos los detalles de los métodos de reclutamiento y de las características de esta cohorte han sido descritos previamente<sup>6,8-9,224</sup>. El diagnóstico de cada uno de estos participantes fue confirmado por el médico de familia o el médico que lo atendió en el hospital.
- Los pacientes del MRF fueron 59 supervivientes de una enfermedad meningocócica procedentes de Reino Unido, reclutados entre 1995 y 2002, con un rango de edad al debut de la enfermedad de 0.16 a 64.41 años decimales y una mediana de edad

de 11.29 años decimales (n=45). Los detalles de los métodos de reclutamiento y las características de esta cohorte han sido previamente comunicadas<sup>6,9,224</sup>.

- Los pacientes del Alder Hey fueron 88 pacientes con enfermedad meningocócica reclutados de forma consecutiva entre 1997 y 1999, con un rango de edad al debut de la enfermedad de 0.07 a 15.94 años decimales, y una mediana de 3.02 años decimales (n=88).

#### **5.2.2.1.2. Cohorte de replicación del Oeste de Europa**

Los individuos con enfermedad meningocócica fueron captados de los siguientes centros:

- Erasmus MC-Sophia Children's Hospital, University Medical Centre, Rotterdam, The Netherlands. Fueron reclutados entre 1988 y 2005, con un rango de edad al debut de la enfermedad de 0.33 a 16.50 años decimales y una mediana de 3.201 años decimales, (n=154)
- Emma Children's Hospital, Academic Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands. Fueron reclutados entre 1995 y 2001, con un rango de edad al debut de la enfermedad de 0.077 a 17.88 años decimales, y una mediana de 3.62 años decimales, (n=58)
- The Medical University of Graz, Austria. Fueron reclutados entre marzo de 2000 y junio de 2007, con un rango de edad al debut de la enfermedad de 0.01 a 27.83 años decimales, y una mediana de 4.07 años decimales (n=380).

Todos los detalles de esta cohorte han sido ya descritos previamente<sup>29,225</sup>. Para eliminar la estratificación poblacional en esta cohorte, llevamos a cabo un test Cochran-Mantel-Haenszel (CMH), estratificando las muestras de origen austriaco (379 casos y 496 controles) y holandés (171 casos y 134 controles), y excluyendo las muestras procedentes de Reino Unido.

#### **5.2.2.1.3. Cohorte de replicación ESIGEM-Spain**

Se reclutaron entre enero de 2006 y julio de 2009, prospectivamente, 415 pacientes con enfermedad meningocócica. Estos pacientes procedieron de una red nacional de investigación en enfermedad meningocócica llamada ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en Enfermedad Meningocócica, [www.esigem.org](http://www.esigem.org)) que incluye más de 40 unidades de cuidados intensivos pediátricos españolas coordinadas desde el

Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela (Anexo I). Los pacientes tenían un rango de edad al inicio de la enfermedad de 0.2 a 19.0 años decimales y una mediana de 2.1 años decimales (n=415). En el 91.6% de todas las muestras en las que se estableció el serogrupo, éste fue el serogrupo B.

### 5.2.2.2. Controles

Para el UK-GWAS se utilizaron los datos genotípicos de 5,069 controles sanos de Reino Unido contenidos en la cohorte WTCCC2 (*The Wellcome Trust Case Control Consortium Phase 2*). Estos controles habían sido previamente usados en GWAS de 13 enfermedades desarrolladas por el WTCCC2 y están compuestos por 2,482 miembros de la *1958 Birth Cohort* (58BC) y 2,587 donantes de sangre sanos del Servicio Nacional de Sangre (NBS).

El acceso a este conjunto de datos, genotipados con Illumina HumanHap 1.2M por WTCCC2, fue concedido por The Wellcome Trust Consortium Data Access Committee para nuestro estudio.

Los controles para la cohorte de replicación del Oeste de Europa consistieron en 500 niños sanos de Austria que dieron muestra de sangre de cordón, y 134 donantes de sangre procedentes de Amsterdam (en Holanda), que han sido previamente publicados en un GWAS de enfermedad de Kawasaki<sup>226</sup>. Asimismo se contó con 235 controles de Reino Unido, contactos de la misma etnia, no emparentados, de pacientes con ascendencia europea afectados al tiempo del debut de la enfermedad meningocócica. Esta población de control ha sido previamente descrita y ha demostrado ser similar a otras poblaciones de ascendencia europea<sup>9,79</sup>.

Los pacientes control para la cohorte de replicación de ESIGEM-Spain fueron 537 controles españoles no emparentados, captados al mismo tiempo que el debut de la enfermedad meningocócica. Este grupo de control fue previamente descrito como CG2<sup>11</sup>.

### 5.2.3. Análisis de genotipado y control de calidad

El ADN genómico de casos y controles fue genotipado con Illumina Human 610K Quad beadchips siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó una inspección visual de los agrupamientos (clusters) de SNPs con  $P$ -valores  $< 10^{-4}$ , es decir, aquellos seleccionados para el seguimiento en las cohortes

de replicación y confirmación. Los polimorfismos seleccionados para el estudio de seguimiento fueron genotipados con el sistema MassArray de Sequenom y se les aplicaron diversos controles de calidad, basados fundamentalmente en la aplicación de los siguientes criterios de filtro:

- Muestras y tasas de genotipado de SNPs (call rates) mayor al 95%;
- Frecuencia del alelo minoritario (MAF) mayor al 1%;
- Exclusion de las muestras con discrepancia entre el género reportado y el identificado genéticamente;
- Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en controles con  $P$ -valor  $< 10^{-7}$  (para un test de chi-cuadrado).

Todos los casos incluidos en el GWAS fueron re-genotipados con la plataforma Sequenom para los 34 SNPs incluidos en el seguimiento, mostrando una tasa de concordancia del 98.2% entre ambos métodos de genotipado.

#### 5.2.4. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron hechos con el software PLINK 1.02, si no se especifica de otro modo.

La detección de individuos emparentados de primer grado (padres-hijos, hermanos) y la duplicación de muestras fue evaluada haciendo comparaciones apareadas de los valores de IBD (*identity by descent*) de los perfiles genéticos. En el caso de identificarse un pariente, la muestra con menor tasa de genotipado fue desechada.

Aquellos individuos con perfiles genéticos que difieren de los esperados de acuerdo al grupo poblacional al que supuestamente pertenecen (population outliers) fueron inicialmente identificados frente a poblaciones de referencia de Hapmap. Esto se hizo para cada grupo por separado (casos de enfermedad meningocócica, controles 58BC y controles NBS) y en el grupo combinado (los casos y todos los controles).

La asociación genética en el GWAS y en las cohortes de seguimiento se realizó usando un test de asociación alélica (y sus OR's derivadas por alelo). Los valores combinados de  $P$  entre ambas fases fueron calculados por el test Cochran-Mantel-Haenszel (CMH). El test Breslow-Day fue llevado a cabo para investigar la homogeneidad de la OR a través de las tres cohortes generadas por el test CMH.

La imputación de los genotipos fue llevada a cabo en los casos de enfermedad meningocócica usando el software IMPUTE v0.5.0<sup>227-228</sup>, y cogiendo los datos de un panel de referencia (población europea CEU del Hapmap). Para cada genotipado individual, se calcula, usando modelos conocidos como Hidden Markov Models (MCMC), la probabilidad de cada genotipo (ej. aa, Aa o AA) en cada uno de los genotipos faltantes y cada individuo, usando para ello la información contenida en los genotipos observados y los haplotipos inferidos de las poblaciones de referencia. Los genotipos imputados se filtraron usando una MAF mayor al 1% y una tasa de genotipado superior al 95%.

## 5.3. SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO: ESIGEM-Spain GWAS

### 5.3.1. Diseño del estudio

A raíz de los resultados hallados en la primera fase, en el UK-GWAS, y con el fin de aumentar el poder de detectar otras regiones genéticas asociadas con la enfermedad meningocócica, se amplió el estudio de la siguiente manera (Figura 16).

- 1º) **ESIGEM-Spain GWAS:** Se llevó a cabo un segundo GWAS en una cohorte de 419 pacientes españoles con enfermedad meningocócica, y 967 controles.
- 2º) **Metaanálisis del UK-GWAS y del ESIGEM-Spain GWAS:** A continuación se realizó un metaanálisis incluyendo el GWAS español y el GWAS de Reino Unido referido en la primera parte del estudio.
- 3º) **Replicación en el Oeste de Europa:** Los SNPs seleccionados en este metaanálisis fueron replicados en una tercera cohorte europea compuesta por 565 casos de enfermedad meningocócica y 2,329 controles.
- 4º) **Metaanálisis conjunto de las tres cohortes:** Se concluyó el estudio realizando un metaanálisis de los SNPs seleccionados de las tres poblaciones europeas, tratando de buscar la variante causal por mapeo fino e imputación de la región asociada.

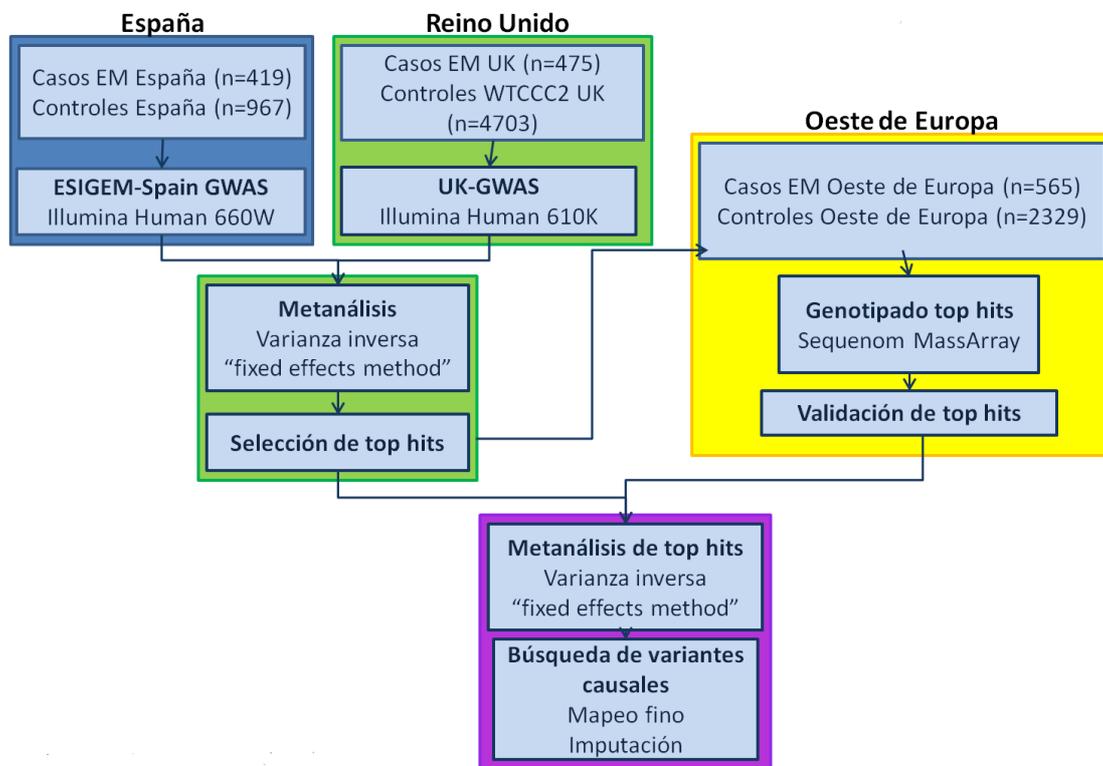


Fig. 16. Diseño esquemático de la segunda fase del estudio.

### 5.3.2. Participantes en el estudio

Los criterios de inclusión y exclusión fueron uniformes a lo largo del estudio en sus diferentes fases.

Se consideraron candidatos a participar en él a pacientes diagnosticados de enfermedad meningocócica invasiva (sepsis y/o meningitis meningocócica), de acuerdo con una serie de criterios comunes. Todos los pacientes presentaban un rash petequeal o purpúrico característico, y evidencia clínica de sepsis y/o meningitis.<sup>6,8,9</sup> El diagnóstico fue confirmado microbiológicamente mediante el cultivo de *N. meningitidis* o la detección de PCR de antígeno de meningococo en líquidos normalmente estériles (sangre o LCR). Aquellos pacientes en quienes los estudios microbiológicos fueron negativos o incompletos fueron incluidos si cumplían características clínicas de shock, rash purpúrico o meningitis, siempre y cuando hubiesen sido excluidas otras posibles bacterias patógenas (estafilococo o neumococo) o virus.

Todos los pacientes incluidos, tanto en la primera como en la segunda fase del estudio, fueron reclutados con el consentimiento informado de los padres o tutores legales correspondientes. Asimismo se contó con la aprobación de los comités de ética de todas las instituciones participantes.

### 5.3.2.1. Casos

Los datos clínicos y demográficos de las cohortes de Reino Unido, del Sur de Europa (España) y del Oeste de Europa (Holandeses/Austriacos) están resumidos en la Tabla 9.

**Tabla 9. Datos clínicos y demográficos de los pacientes genotipados con éxito en el GWAS y en las cohortes de replicación.** MM: meningitis meningocócica. SM: sepsis meningocócica.

Características	UK	España	Austria / Alemania	Holanda
<b>Casos</b>				
Total	475	419	379	186
Varones (%)	-	56.5	53.8	54.3
Casos confirmados microbiológicamente	439	397	363	155
Casos de MM (%)	59 (13.44)	56 (14.1)	118 (32.5)	14 (9.0)
Casos de SM (%)	280 (63.78)	185 (46.6)	71 (19.6)	112 (72.3)
Casos de SM y MM (%)	100 (22.78)	156 (39.3)	174 (47.9)	29 (18.7)
Cultivos negativos, pero cuadro característico	36	22	16	31
<b>Controles</b>	4703	967	2196	134
Varones (%)	50.7	26.6	49.9	58.9

Para la cohorte de ESIGEM-Spain GWAS se reclutaron 496 casos de enfermedad meningocócica diagnosticados entre 2006-2009 en los hospitales incluidos en la red española de investigación en enfermedad meningocócica ESIGEM [www.esigem.org](http://www.esigem.org), previamente descrita. (Anexo I).

La cohorte del UK-GWAS corresponde a 547 pacientes de ascendencia europea captados entre 1995 y 2007 en hospitales de Reino Unido, utilizados como cohorte de casos para el GWAS de la primera fase de este estudio. Las características de este grupo de pacientes ya han sido descritas en el apartado correspondiente.

Para la replicación en el Oeste de Europa se reclutaron 553 pacientes holandeses y austríacos, entre 1998 y 2000, cuyos detalles clínicos ya han sido previamente comunicados<sup>80,225,229</sup>.

### 5.3.2.2. Controles

La cohorte de pacientes con enfermedad meningocócica del ESIGEM-Spain GWAS fue acompañada de 993 controles sanos ligados geográficamente, étnicamente relacionados con los casos, que fueron reclutados simultáneamente a éstos. Un subgrupo de esta muestra fue utilizada en la primera fase de este estudio, como grupo de control en la replicación del Sur de Europa<sup>11</sup>.

El grupo de controles para el UK-GWAS estaba constituido por 5,069 individuos de *The Wellcome Trust Case-Control Consortium 2* (WTCCC2), y fue el utilizado en el GWAS de Reino Unido llevado a cabo en la primera fase del estudio.

Los controles para la cohorte de replicación del Oeste de Europa consistieron en 497 austríacos, y 1,699 alemanes étnicamente ligados a 379 casos de enfermedad meningocócica austríacos, y 134 donantes de sangre holandeses de Amsterdam étnicamente ligados a 186 casos de holandeses. Los controles alemanes procedieron del estudio basado en la población Heinz Nixdorf RECALL (*Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle*)<sup>230</sup>.

### 5.3.3. Análisis de genotipado y control de calidad

El ADN fue extraído de las muestras sanguíneas usando técnicas de laboratorio establecidas.

Los casos de enfermedad meningocócica fueron genotipados usando Illumina Human 660W Quad Bead Chips para la muestra de España, e Illumina Human 610K Quad Bead Chips para la muestra de Reino Unido, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los controles de España fueron genotipados usando Illumina 660W Quad BeadChip, y los de Reino Unido (procedentes de *the Wellcome Trust Case-Control Consortium 2*; WTCCC2) fueron genotipados usando Illumina HumanHap 1.2M chip. El acceso a los datos para el control de la base de datos fue garantizado por The Wellcome Trust Consortium Data Access Committee para nuestro estudio.

Los tres SNPs *ABCA4* seleccionados para la fase de replicación fueron genotipados con la plataforma Sequenom MassArray.

Se aplicaron los siguientes criterios de filtro:

- Muestras y tasas de genotipado de SNPs (call rates) mayor al 95%;
- Frecuencia del alelo minoritario (MAF) mayor al 1%;
- Exclusion de las muestras con discrepancia entre el género reportado y el identificado genéticamente;
- Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en controles con  $P$ -valor  $< 10^{-7}$  (para un test de chi-cuadrado).

#### 5.3.4. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un metaanálisis con los datos del estudio GWAS de España y de Reino Unido. Después se utilizó una cohorte del Oeste de Europa para replicar los principales hallazgos de asociación.

Los análisis estadísticos de asociación fueron llevados a cabo usando PLINK v1.07.

La detección de individuos emparentados de primer grado (padres-hijos, hermanos) y la duplicación de muestras fue evaluada haciendo comparaciones apareadas de los valores de IBD (*identity by descent*) de los perfiles genéticos. En el caso de identificarse un pariente, la muestra con menor tasa de genotipado fue desechada.

El análisis de componentes principales (PCA) fue llevado a cabo para tener en cuenta asociaciones genéticas espúreas resultantes de las diferencias ancestrales de SNPs individuales. Los dos primeros componentes (PC1 y PC2) fueron representados en *PC plots* usando el paquete estadístico R ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)).

Para los datos del GWAS de España y Reino Unido, el análisis de asociación con enfermedad meningocócica fue llevado a cabo usando un 'score-based test' con 1 grado de libertad, que modela los efectos de la tendencia del genotipo incorporando variables adicionales continuas que representen los principales componentes de estratificación de poblaciones, con el fin de corregir cualquier subestructura poblacional residual. Este test modula un efecto aditivo y el riesgo a la enfermedad atribuible a una copia del alelo minoritario en cada SNP. El metaanálisis fue hecho usando varianza inversa (*'inverse-variance, fixed effects method'*). El análisis de desequilibrio de ligamiento fue llevado a cabo usando Haploview<sup>231</sup>.



## **6. RESULTADOS**

---



## 6. RESULTADOS

---

### 6.1. PRIMERA FASE DEL ESTUDIO: UK-GWAS

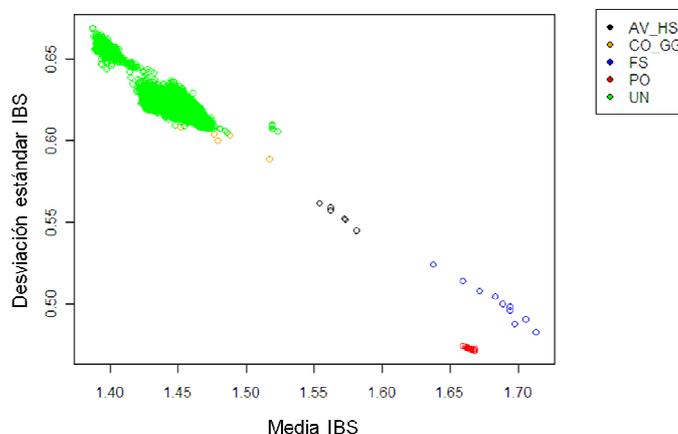
#### 6.1.1. GWAS de Reino Unido

Para el GWAS inicial, genotipamos 547 casos de enfermedad meningocócica de Reino Unido y cerca de 5.000 controles obtenidos de *The Wellcome Trust Case Control Consortium (WTCCC) Phase 2* (2,482 de la *1958 Birth Cohort* y 2,587 del Servicio Nacional de Sangre). El uso de controles procedentes de una población con características étnicamente similares a la población de casos en el estudio (controles no emparejados), ha funcionado con éxito en trabajos anteriores, cuando la enfermedad estudiada no es frecuente entre la población control seleccionada<sup>232</sup>. Sabiendo que el riesgo acumulativo de ser hospitalizado por enfermedad meningocócica en la población de Reino Unido es menor del 0.1%<sup>233</sup>, esperaríamos encontrar menos de cinco falsos negativos entre nuestros controles.

De los 547 casos iniciales genotipados para el GWAS, setenta y dos fueron excluidos del estudio porque no reunían los criterios de calidad requeridos: fallo en el genotipado (n=6), discrepancia de género entre la muestra y el sujeto (n=4), tasa de genotipado menor al 95% (n=17), muestras monocigotas (n=2) y perfiles genéticos diferentes a los esperados de acuerdo al grupo poblacional al que supuestamente pertenecían (*population outliers*) (n=43).

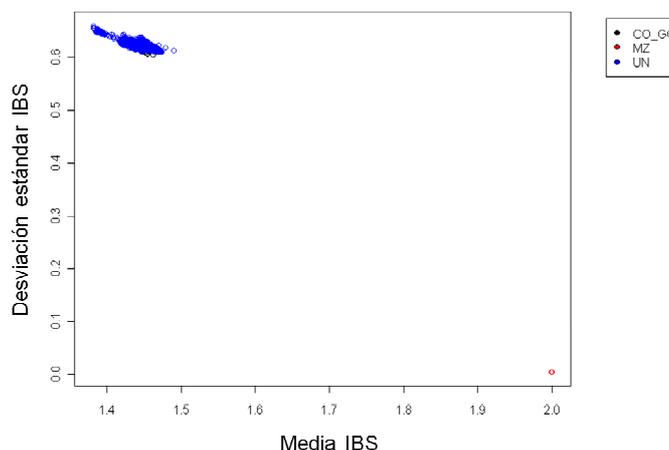
El número de parientes detectados en cada conjunto de datos fue el que sigue:

- Controles del Servicio Nacional de Sangre (NBS): 10 hermanos y 33 pares de padres-hijos (Figura 17).



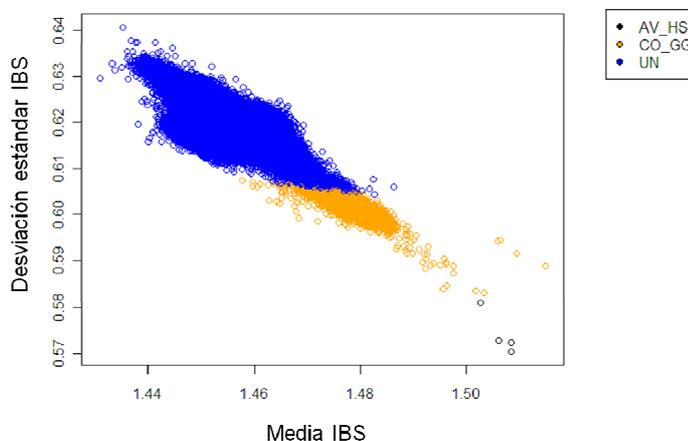
**Fig. 17. Detección de parentesco mediante análisis IBD / IBS (*identity by descent* / *identity by state*) en el grupo del Servicio Nacional de Sangre.** AV\_HS: parentesco avuncular (tío-sobrino). CO\_GS: primo, abuelo. FS: hermano. PO: padre-hijo. UN: sin relación de parentesco. MZ: gemelos monocigotos (normalmente corresponden a muestras duplicadas).

- Controles de la 1958 Birth Cohort (58BC): no se detectó ningún familiar de primer grado (Figura 18).



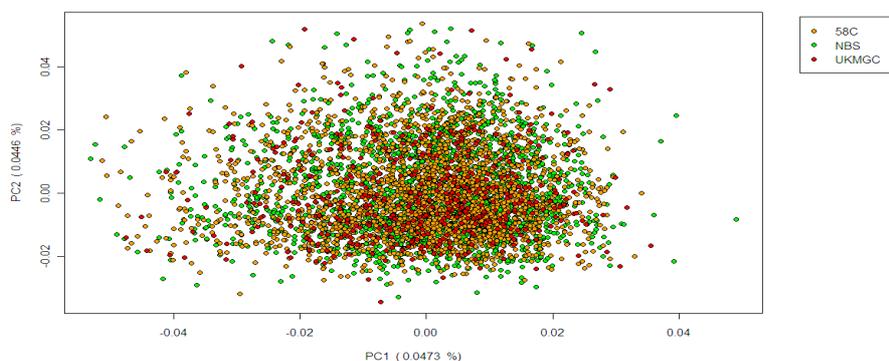
**Fig. 18. Detección de parentesco mediante análisis IBD / IBS (*identity by descent* / *identity by state*) en la 1958 Birth Cohort.** AV\_HS: parentesco avuncular (tío-sobrino). CO\_GS: primo, abuelo. FS: hermano. PO: padre-hijo. UN: sin relación de parentesco. MZ: gemelos monocigotos (normalmente corresponden a muestras duplicadas).

- Casos de enfermedad meningocócica: dos pares de gemelos aparentemente monócigotos que podrían ser incluso duplicaciones de muestras (Figura 19).



**Fig. 19. Detección de parentesco mediante análisis IBD / IBS (*identity by descent* / *identity by state*) en el grupo de casos de enfermedad meningocócica.** AV\_HS: parentesco avuncular (tío-sobrino). CO\_GG: primo, abuelo. FS: hermano. PO: padre-hijo. UN: sin relación de parentesco. MZ: gemelos monócigotos (normalmente corresponden a muestras duplicadas).

El análisis de componentes principales no mostró evidencia de estratificación entre casos y controles (Figura 20).



**Fig. 20. El análisis de componentes principales de todos los casos y controles muestra una ausencia de estratificación entre las 5,178 muestras.** 58C: cohorte Birth 1958. NBS: Sistema Nacional de Sangre. UKMGC: casos de enfermedad meningocócica de Reino Unido.

Después de aplicar filtros de control de calidad estandarizados, se incluyeron para el análisis en el GWAS 475 casos y 4,703 controles. La ausencia de estratificación

poblacional en nuestro grupo de estudio fue confirmada tras valorar la existencia de un factor de inflación genómica no significativo para el *trend test* ( $\lambda_{GC} = 1.02$ ).

Los casos y controles fueron genotipados usando la plataforma Illumina™: los casos fueron tipados con el chip HumanHap 610K Quad, mientras que los controles fueron genotipados como parte del estudio WTCCC con el chip 1.2M. Los SNPs comunes tipados en ambos grupos fueron identificados filtrando los controles frente al chip HumanHap 610K Quad. Cerca de medio millón de SNPs comunes ( $n = 518,920$ ) pasaron el control de calidad con una tasa de genotipado mayor al 95% y todos ellos en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE), y fueron, por tanto, incorporados en el análisis de asociación. El gráfico cuantil-cuantil (gráfico Q-Q) mostró un exceso significativo de los valores de  $P$  superior al de la distribución nula, sugiriendo que algunos de esos valores de  $P$  podrían representar asociaciones estadísticas verdaderas (Figura 21).

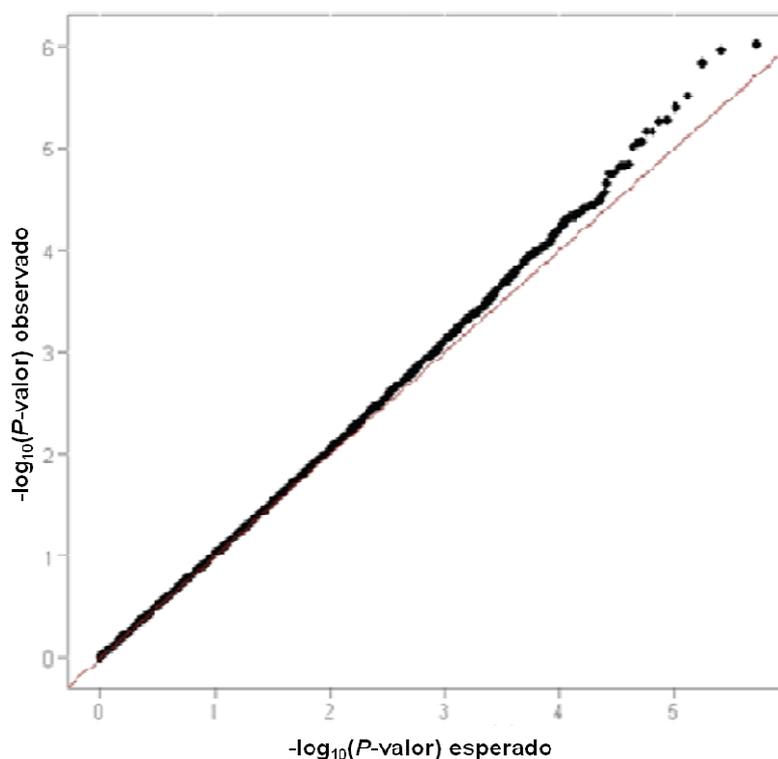


Fig. 21. Gráfico cuantil-cuantil (gráfico Q-Q). Los  $P$ -valores esperados de 5,178 muestras y 518,920 SNPs son representados frente a los  $P$ -valores observados. Al final de la distribución el número de  $P$ -valores observados menores al  $P$ -valor esperado es superior que el esperado por azar, indicativo de asociación.

El *Manhattan plot* mostró varios agrupamientos (*clusters*) de asociación a lo largo del genoma (Figura 22).

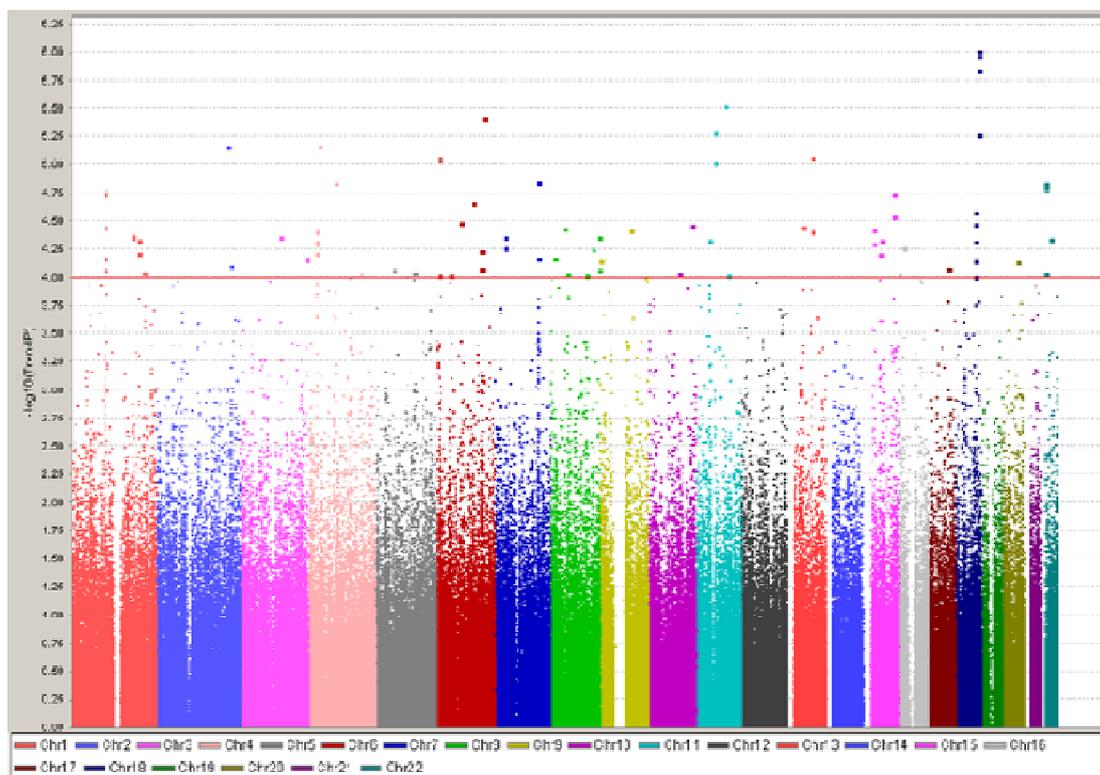


Fig. 22. *Manhattan plot* del UK-GWAS. Cada cromosoma aparece representado por un color diferente. El  $-\log(P\text{-valor})$  de cada SNP es trazado frente a su localización en el cromosoma. La línea superior indica el nivel de significación estadística genómica ( $P\text{-valor} = 10^{-7}$ ). La línea más baja indica un valor arbitrario sugestivo de asociación ( $P\text{-valor} = 10^{-5}$ ).

En la primera fase del GWAS, 103 polimorfismos mostraron significancia, con un  $P\text{-valor} < 1 \times 10^{-4}$ . Después de una inspección visual de los agrupamientos (*clusters*) de SNPs, 24 SNPs fueron desechados en el seguimiento por presentar un agrupamiento (*clustering*) ambiguo. De este modo, se seleccionaron 79 SNPs para el estudio de seguimiento (Tabla 10).

**Tabla 10. SNPs más significativos del UK-GWAS genotipados en la cohorte del Oeste de Europa.**

Cr: cromosoma. LC: localización cromosómica. MAF<sub>CA</sub>: MAF en los casos. MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles. FG: fallo de genotipado. FD: fallo de diseño.

SNP	Cr	LC	Alelos	P-valor	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	Genes	Localización	Datos Sequenom
rs3789399	1	94284305	C/G	8,67E-05	0,39	0,46	<i>ABCA4</i>	Intronic	FG
rs544830	1	94285481	A/G	3,60E-05	0,44	0,49	<i>ABCA4</i>	Intronic	Sí
rs1191231	1	94289573	A/C	6,89E-05	0,43	0,50	<i>ABCA4</i>	Intronic	Sí
rs497511	1	94295701	A/G	1,76E-05	0,47	0,45	<i>ABCA4</i>	Intronic	Sí
rs550060	1	94297372	A/G	1,84E-05	0,47	0,45	<i>ABCA4</i>	Intronic	Sí
rs2297765	1	163888831	A/G	6,84E-05	0,31	0,38	<i>MGST3</i>	Intronic	Sí
rs16853243	1	176927964	A/G	4,32E-05	0,06	0,04	-	-	Sí
rs16853302	1	176952954	A/C	4,39E-05	0,06	0,03	-	-	Sí
rs634899	1	192302571	A/G	1,80E-05	0,28	0,35	-	-	Sí
rs1065489	1	194976397	A/C	4,74E-05	0,12	0,17	<i>CFH</i>	<i>E936D</i>	Sí
rs11582939	1	194976780	A/G	6,13E-05	0,12	0,17	<i>CFH</i>	Intronic	Sí
rs880782	1	207846576	A/G	9,11E-05	0,11	0,16	<i>CAMK1G</i>	Intronic	Sí
rs2420864	2	124933856	A/G	2,77E-08	0,09	0,05	<i>CNTNAP5</i>	Intronic	Sí
rs4972431	2	174707434	A/G	1,38E-07	0,38	0,47	<i>OLA1</i>	Intronic	FD
rs3821170	2	207161555	A/G	7,01E-06	0,05	0,10	<i>ADAM23</i>	Intronic	Sí
rs10204986	2	215498246	A/C	8,07E-05	0,08	0,12	-	-	Sí
rs13070790	3	106618677	A/G	5,00E-08	0,15	0,23	<i>ALCAM</i>	Intronic	Sí
rs2927279	3	118683624	A/G	4,44E-05	0,21	0,27	-	-	Sí
rs779506	3	192895291	A/G	7,01E-05	0,34	0,41	-	-	Sí
rs10938932	4	22875826	A/G	6,17E-05	0,26	0,21	-	-	Sí
rs6835555	4	22883723	A/G	3,98E-05	0,26	0,20	-	-	Sí
rs12502492	4	22918933	A/C	5,00E-05	0,26	0,20	-	-	FG
rs740834	4	23092428	A/G	4,82E-05	0,43	0,37	-	-	Sí
rs11730273	4	31369957	A/C	6,88E-06	0,50	0,43	-	-	Sí
rs11728925	4	41408422	A/C	2,37E-08	0,08	0,15	-	-	Sí
rs10491463	4	78411342	A/G	1,49E-05	0,26	0,33	-	-	Sí
rs6535611	4	149598987	A/G	9,59E-05	0,49	0,44	-	-	Sí
rs12697148	5	55914728	A/C	8,76E-05	0,02	0,05	<i>ENSG00000205695</i>	Intronic	Sí
rs6870913	5	117971158	A/G	9,20E-05	0,30	0,24	-	-	Sí
rs2842362	6	7211054	A/C	4,15E-05	0,27	0,33	-	-	Sí
rs6597271	6	7545468	A/G	9,69E-05	0,14	0,10	<i>C6orf151</i>	Intronic	Sí
rs17398289	6	7546435	A/G	9,04E-06	0,12	0,08	<i>C6orf151</i>	Intronic	Sí
rs9369226	6	40778694	A/G	9,63E-05	0,14	0,19	-	-	Sí
rs12209098	6	58448431	A/C	5,14E-06	0,23	0,30	-	-	FD
rs2040055	6	72660385	A/G	3,34E-05	0,03	0,07	<i>RIMS1</i>	Intronic	Sí
rs13196925	6	105657922	A/C	2,25E-05	0,10	0,07	<i>BVES</i>	Intronic	Sí
rs4897509	6	131714763	A/G	8,45E-05	0,13	0,19	-	-	Sí
rs9483254	6	131716894	A/G	5,87E-05	0,14	0,19	-	-	Sí
rs9376268	6	137574444	A/G	4,00E-06	0,29	0,23	<i>IFNGR1</i>	Intronic	Sí

rs7797836	7	29395285	A/G	5,52E-05	0,11	0,07	<i>CHN2</i>	Intronic	FD
rs2391757	7	29398077	A/G	4,41E-05	0,11	0,07	<i>CHN2</i>	Intronic	Sí
rs6962882	7	126969544	A/G	6,82E-05	0,45	0,49	-	-	Sí
rs10447854	7	127583040	A/G	1,44E-05	0,31	0,25	-	-	Sí
rs10089628	8	13440033	A/G	6,87E-05	0,43	0,36	-	-	Sí
rs7830326	8	39187333	A/G	2,70E-26	0,30	0,49	<i>ADAM32</i>	Intronic	Sí
rs11780780	8	41742759	A/G	3,67E-05	0,09	0,13	<i>ANK1</i>	Intronic	Sí
rs7839067	8	51500298	A/C	9,52E-05	0,17	0,12	<i>SNTG1</i>	Intronic	FD
rs2880074	8	105710749	A/G	9,75E-05	0,10	0,07	-	-	Sí
rs3829038	8	125630936	A/G	5,62E-05	0,07	0,04	<i>NDUFB9</i>	Intronic	Sí
rs4897668	8	135099797	A/G	8,30E-26	0,29	0,47	-	-	Sí
rs7818687	8	142392371	A/G	4,41E-05	0,07	0,04	-	-	Sí
rs11167150	8	143678459	A/G	8,70E-05	0,31	0,26	-	-	Sí
rs4741821	9	333981	A/G	7,21E-05	0,16	0,12	<i>DOCK8</i>	Intronic	Sí
rs7048294	9	88609667	A/G	3,89E-05	0,31	0,25	-	-	Sí
rs1749824	10	80593868	A/C	6,50E-13	0,45	0,42	<i>ZMIZ1</i>	Intronic	Sí
rs10886114	10	85062244	A/G	9,22E-05	0,35	0,41	-	-	Sí
rs10749071	10	113084027	A/G	1,23E-16	0,10	0,21	-	-	Sí
rs17103138	10	123903320	A/G	3,44E-05	0,11	0,07	<i>TACC2</i>	Intronic	Sí
rs11035693	11	40091818	A/G	4,74E-05	0,10	0,07	<i>LRRC4C</i>	Downstream	FD
rs11604506	11	42606114	A/G	4,75E-05	0,14	0,10	-	-	Sí
rs10838427	11	45138258	A/G	1,46E-10	0,25	0,35	<i>PRDM11</i>	Intronic	Sí
rs10769599	11	49629519	A/G	4,10E-05	0,23	0,30	-	-	Sí
rs1892964	11	56797296	A/C	9,71E-06	0,24	0,31	-	-	Sí
rs12792781	11	56817138	A/G	5,30E-06	0,25	0,33	-	-	Sí
rs10431169	11	85785760	A/G	3,03E-06	0,08	0,05	<i>CCDC81</i>	Intronic	Sí
rs655683	11	88316502	A/C	2,15E-08	0,28	0,37	<i>GRM5</i>	Intronic	Sí
rs1792624	11	93561458	A/G	9,64E-266	0,37	0,04	-	-	Sí
rs1371352	11	96033229	A/G	9,63E-05	0,07	0,04	-	-	Sí
rs2026692	13	46426546	A/G	3,63E-05	0,44	0,37	-	-	Sí
rs9570428	13	60516854	A/G	4,52E-06	0,16	0,22	-	-	FD
rs9573320	13	73347180	A/G	3,93E-05	0,25	0,20	<i>KLF12</i>	Intronic	Sí
rs9573322	13	73355690	A/C	8,73E-06	0,29	0,23	<i>KLF12</i>	Intronic	Sí
rs9547465	13	85449372	A/G	3,95E-06	0,28	0,21	-	-	Sí
rs4976846	13	108619212	A/G	1,72E-17	0,07	0,18	<i>MYO16</i>	Intronic	FG
rs17817048	15	31339059	A/C	3,75E-05	0,11	0,07	-	-	Sí
rs8035094	15	31351774	A/G	5,00E-05	0,11	0,07	-	-	Sí
rs2899423	15	46889329	A/G	6,25E-05	0,49	0,44	<i>CEP152</i>	Intronic	Sí
rs2616917	15	52075850	A/G	4,74E-05	0,15	0,10	-	-	Sí
rs10162967	15	87797878	A/G	2,94E-05	0,24	0,19	-	-	Sí
rs1020145	15	87801875	A/C	1,83E-05	0,30	0,24	-	-	Sí
rs10974	16	4344621	A/G	9,53E-05	0,09	0,05	<i>CORO7</i>	<i>3PRIME_UTR</i>	Sí
rs1023441	16	19238959	A/G	5,56E-05	0,06	0,04	-	-	Sí
rs2244614	16	54402118	A/G	9,51E-07	0,46	0,38	<i>CES1</i>	Intronic	Sí

rs2301775	17	34594761	A/G	3,08E-06	0,20	0,15	<i>CACNB1</i>	Intronic	FG
rs4790911	17	61841377	A/G	8,27E-05	0,14	0,10	<i>PRKCA</i>	Intronic	Sí
rs2168312	18	59432628	A/G	2,67E-05	0,31	0,25	-	-	Sí
rs1011947	18	59494992	A/G	3,41E-05	0,31	0,25	-	-	Sí
rs1243056	18	59659443	A/G	9,94E-05	0,08	0,05	-	-	Sí
rs1243059	18	59660266	A/G	4,84E-05	0,34	0,28	-	-	Sí
rs1243062	18	59663346	A/G	7,08E-05	0,46	0,47	-	-	Sí
rs4556879	18	69956483	A/G	9,75E-07	0,06	0,03	<i>FBXO15</i>	Intronic	Sí
rs9952197	18	69962215	A/G	1,47E-06	0,06	0,03	<i>FBXO15</i>	Intronic	Sí
rs3737512	18	69967258	A/G	1,11E-06	0,06	0,03	<i>C18orf55</i>	<i>G79S</i>	Sí
rs17088883	18	69979904	A/G	5,48E-06	0,06	0,03	<i>C18orf55</i>	Downstream	Sí
rs1299491	19	55111211	A/C	8,70E-08	0,41	0,32	<i>IL4I1,NUP62</i>	Intronic	Sí
rs6031318	20	42105825	A/G	7,35E-05	0,02	0,04	<i>TOX2</i>	Intronic	Sí
rs4809944	20	51935369	A/G	5,51E-08	0,19	0,13	-	-	Sí
rs2406176	21	18641297	A/C	8,86E-12	0,13	0,23	<i>PRSS7</i>	Intronic	Sí
rs4819849	22	15532611	A/G	1,47E-05	0,40	0,33	<i>ENSG00000189295</i>	Downstream	FG
rs175139	22	15684246	A/G	9,26E-05	0,48	0,41	<i>XKR3</i>	Upstream	FG
rs175149	22	15690741	A/G	1,60E-05	0,45	0,37	-	-	Sí
rs9625679	22	27786699	A/G	4,61E-05	0,05	0,03	<i>C22orf31</i>	<i>C22orf31</i>	Sí

### 6.1.2. Primera replicación: replicación en la cohorte del Oeste de Europa

Para el primer estudio de replicación, 553 casos de enfermedad meningocócica del Oeste de Europa y 839 controles de la misma población fueron genotipados usando la plataforma Sequenom. De los 79 SNPs genotipados, tres de ellos fallaron durante el proceso de diseño de Sequenom, y dos tuvieron tasas de genotipado por debajo del 95%, resultando en 74 SNPs para análisis (Tabla 10). Se detectaron dos SNPs en desequilibrio Hardy-Weinberg (usando la corrección de Bonferroni, con un umbral de  $P$ -valor  $< 0.05 / \text{número de SNPs analizados, } n = 74$ ) en el seguimiento de controles, y por tanto fueron excluidos del análisis de asociación.

Sesenta y cuatro muestras fueron excluidas debido a bajas tasas de genotipado (39 casos y 25 controles). Nueve de los 72 SNPs tenían un  $P$ -valor  $< 0.05$  en este primer grupo de replicación.

El análisis combinado del GWAS y de la replicación en el Oeste de Europa concluyó con que dos de estos polimorfismos alcanzaron significación estadística a nivel de todo el genoma ( $P$ -valor  $< 1 \times 10^{-7}$ ), y otro SNP mostró evidencia que sugiere asociación. Dos variantes en el gen del factor H del complemento (*CFH*) fueron altamente significativas (rs1065489,  $P$ -valor =  $1.2 \times 10^{-9}$ ; rs11582939,  $P$ -valor =  $3.5 \times$

$10^{-9}$ ). Un test de heterogenicidad mostró valores no significativos, indicando que la asociación fue en la misma dirección en ambas cohortes (Tabla 11).

**Tabla 11. SNPs que mostraron asociación combinada en el GWAS y en el grupo del Oeste de Europa.** <sup>1</sup>El gen más cercano, dentro de las 10 kilobases colindantes en sentido 3' ó 5' del SNP referido. <sup>2</sup>P-valores combinados que alcanzaron significación en todo el genoma, destacados en negrita. Cr: cromosoma. MAF<sub>CA</sub>: MAF en casos; MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles.

SNP	Cr	Gen <sup>1</sup>	Alelo riesgo	Alelo menor	UK-GWAS			Oeste de Europa			Análisis combinado		P-valor Breslow-Day
					MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	P-valor <sup>2</sup>	OR (IC 95%)	
rs544830	1	ABCA4	G	A	0,56	0,49	$3.6 \times 10^{-5}$	0,56	0,49	0,027	$5.1 \times 10^{-6}$	0.79 (0.71-0.87)	0,36
rs1191231	1	ABCA4	A	C	0,43	0,5	$6.9 \times 10^{-5}$	0,44	0,5	0,0092	$3.4 \times 10^{-6}$	0.79 (0.71-0.87)	0,54
rs497511	1	ABCA4	G	G	0,53	0,45	$1.7 \times 10^{-5}$	0,52	0,47	0,0054	$5.2 \times 10^{-7}$	1.29 (1.17- 1.43)	0,52
rs550060	1	ABCA4	A	A	0,53	0,45	$1.8 \times 10^{-5}$	0,52	0,47	0,0074	$7.9 \times 10^{-7}$	1.29 (1.16- 1.42)	0,47
rs1065489	1	CFH	G	T	0,12	0,17	$4.7 \times 10^{-5}$	0,1	0,16	$3.3 \times 10^{-6}$	<b><math>1.2 \times 10^{-9}</math></b>	0.62 (0.53-0.72)	0,39
rs11582939	1	CFH	G	A	0,12	0,17	$6.1 \times 10^{-5}$	0,1	0,16	$8.1 \times 10^{-6}$	<b><math>3.5 \times 10^{-9}</math></b>	0.63 (0.54-0.74)	0,45
rs4897509	6	-	A	G	0,13	0,19	$8.4 \times 10^{-5}$	0,16	0,18	0,047	$1.7 \times 10^{-5}$	0.73 (0.64-0.85)	0,22
rs655683	11	GRM5	C	A	0,28	0,37	$2.1 \times 10^{-8}$	0,28	0,33	0,0094	<b><math>3.8 \times 10^{-9}</math></b>	0.72 (0.64-0.80)	0,08
rs1243059	18	-	G	G	0,34	0,28	$4.8 \times 10^{-5}$	0,31	0,27	0,018	$5.3 \times 10^{-6}$	1.29 (1.15-1.43)	0,42
rs1243062	18	-	A	A	0,54	0,47	$7.1 \times 10^{-5}$	0,52	0,48	0,043	$1.8 \times 10^{-5}$	1.25 (1.13-1.38)	0,29
rs4809944	20	-	G	G	0,19	0,12	$5.5 \times 10^{-9}$	0,17	0,13	0,0071	<b><math>1.7 \times 10^{-9}</math></b>	1.51 (1.32-1.73)	0,16

### 6.1.3. Segunda replicación: replicación en la cohorte de España

Llevamos a cabo un segundo estudio de replicación en 415 pacientes con enfermedad meningocócica y 537 controles de España. Los 11 SNPs que mostraban asociaciones significativas replicadas en la cohorte del Oeste de Europa fueron reevaluadas en la cohorte de España usando la misma tecnología (Sequenom). Ambos polimorfismos dentro de *CFH* también demostraron asociación significativa con enfermedad meningocócica en los pacientes españoles (Tabla 12).

**Tabla 12. P-valores combinados de los SNPs asociados en los tres grupos.** MAF: Frecuencia del alelo minoritario. <sup>a</sup>El gen más cercano, dentro de las 10 kb en sentido 3' (down-stream) o 5' (up-stream) de los SNP asociados. <sup>b</sup>El test Cochran-Mantel-Haenszel (CMH) fue aplicado para calcular el valor combinado de *P* entre la cohorte del descubrimiento y las de replicación. <sup>c</sup>Genotipos imputados en el conjunto de los datos genómicos. MAF<sub>CA</sub>: MAF en casos. MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles.

SNP ID	Gen <sup>a</sup>	UK-GWAS				Replicación Oeste Europa				Replicación España				CMH combinado <sup>b</sup>	
		MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	OR	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	OR	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	OR	P-valor	OR (95% IC)
rs10489456	CFH	0.12	0.17	3.4x10 <sup>-4</sup>	0.69	0.10	0.16	2.1x10 <sup>-5</sup>	0.60	0.15	0.20	7.5x10 <sup>-3</sup>	0.72	1.7x10 <sup>-9</sup>	0.67 (0.59–0.76)
rs11799595	CFH	0.12	0.17	3.0x10 <sup>-4</sup>	0.73	0.10	0.16	1.9x10 <sup>-6</sup>	0.57	0.15	0.20	4.5x10 <sup>-3</sup>	0.70	1.4x10 <sup>-10</sup>	0.66 (0.58–0.75)
rs742855	CFH	0.12	0.17	2.8x10 <sup>-4</sup>	0.72	0.10	0.16	1.7x10 <sup>-5</sup>	0.60	0.14	0.19	5.6x10 <sup>-3</sup>	0.70	2.5x10 <sup>-10</sup>	0.66 (0.58–0.75)
rs1065489	CFH	0.12	0.17	4.7x10 <sup>-5</sup>	0.66	0.10	0.16	3.3x10 <sup>-6</sup>	0.57	0.14	0.19	7.4x10 <sup>-3</sup>	0.70	2.2x10 <sup>-11</sup>	0.64 (0.56–0.73)
rs11582939	CFH	0.12	0.17	6.1x10 <sup>-5</sup>	0.66	0.10	0.16	8.1x10 <sup>-6</sup>	0.59	0.14	0.19	1.0x10 <sup>-2</sup>	0.72	3.7x10 <sup>-10</sup>	0.66 (0.58–0.75)
rs385390c	CFHR3	0.11	0.16	1.2x10 <sup>-5</sup>	0.62	0.12	0.20	3.8x10 <sup>-8</sup>	0.55	0.17	0.22	1.7x10 <sup>-3</sup>	0.74	7.7x10 <sup>-13</sup>	0.63 (0.55–0.71)
rs426736c	CFHR3	0.11	0.16	6.1x10 <sup>-5</sup>	0.65	0.13	0.21	6.5x10 <sup>-8</sup>	0.56	0.19	0.25	1.3x10 <sup>-3</sup>	0.69	4.6x10 <sup>-13</sup>	0.63 (0.55–0.71)
rs371075c	CFHR3	0.11	0.16	1.7x10 <sup>-5</sup>	0.62	0.12	0.20	6.5x10 <sup>-8</sup>	0.56	0.20	0.24	4.9x10 <sup>-3</sup>	0.78	8.2x10 <sup>-12</sup>	0.64 (0.57–0.73)

#### 6.1.4. Mapeo e identificación de alelos de susceptibilidad

La asociación más significativa con enfermedad meningocócica fue localizada dentro del gen *CFH*. Correspondió a una sustitución no-sinónima, potencialmente funcional (rs1065489, p.936D<E) ubicada en el exón 19, y alcanzó un *P*-valor combinado =  $2.2 \times 10^{-11}$  en las tres cohortes. Los portadores del alelo que tiene la frecuencia menor en ese SNP (alelo T) tuvieron menor riesgo de enfermedad meningocócica, (odds ratio (OR) = 0.64; IC del 95%, 0.56-0.73). Esto fue corroborado por un segundo polimorfismo, localizado a una distancia de 397 pares de bases en dirección 5', que estaba en completo desequilibrio de ligamiento ( $r^2 = 1$ ) con D936E (rs11582939; *P*-valor combinado =  $3.7 \times 10^{-10}$ ).

Las frecuencias de p.936D<E varían enormemente entre las diferentes poblaciones de Hapmap<sup>234</sup> con una frecuencia del alelo minoritario para el alelo T en japoneses de Tokyo y chinos Han de Beijing del 49%, comparado con el 12%-14% en individuos con ascendencia europea, y el 2.5% en muestras de Yoruba (Ibadan, Nigeria). Cabe destacar que la incidencia de enfermedad meningocócica varía mucho en los diferentes grupos étnicos, y es inversamente proporcional a la frecuencia del alelo minoritario de este SNP. Así pues las poblaciones subsaharianas tienen las tasas más altas de enfermedad (y la frecuencia más baja de este polimorfismo), comparado con cualquier otra población<sup>3</sup>, sugiriendo que este locus puede contribuir a las diferencias de incidencia de la enfermedad en la población.

Evaluamos el locus *CFH* buscando evidencia de selección positiva, pero no encontramos ninguna (Figura 23).

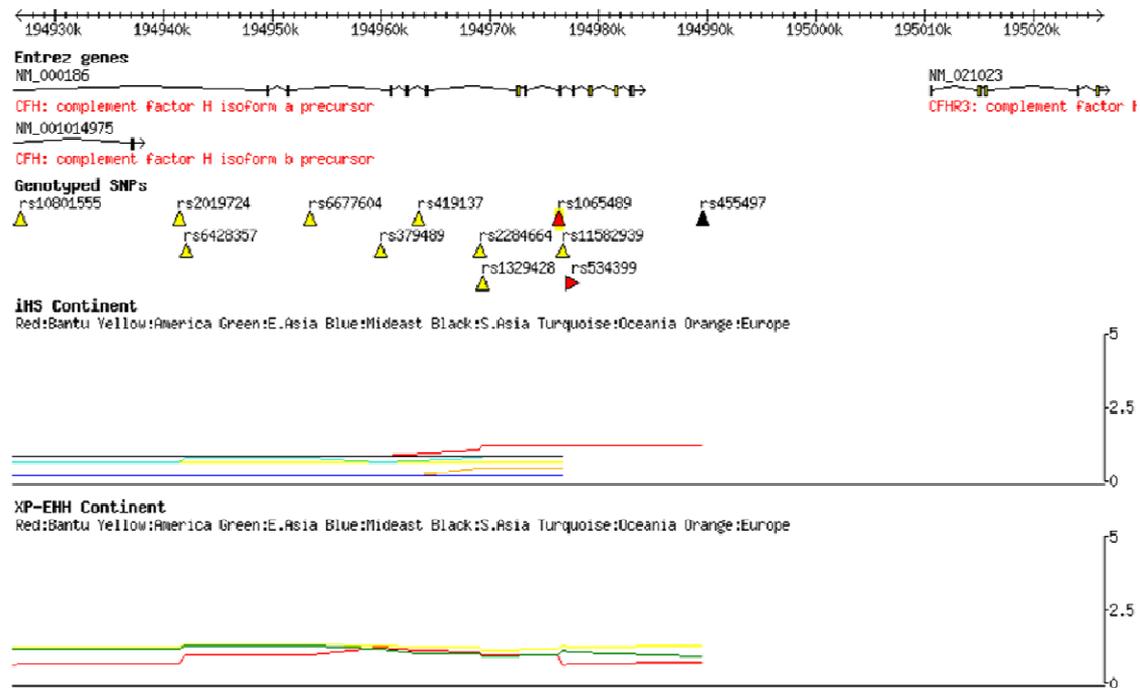


Fig. 23. Medición del *individual haplotype score* (IHS) y del *extended haplotype homozygosity* (EHH) en el locus *CFH*. *CFH* rs1065489 está destacado en rojo.

Utilizamos análisis de imputación para investigar la posible asociación de la región asociada a *CFH* con la susceptibilidad a enfermedad meningocócica. Varios SNPs imputados obtuvieron *P*-valores significativos en *CFH* y en el agrupamiento de SNPs adyacente (*cluster*) que coincide con el gen *CFHR* (que codifica proteínas relacionadas con el factor H del complemento) (Figura 24 y Tabla 13).

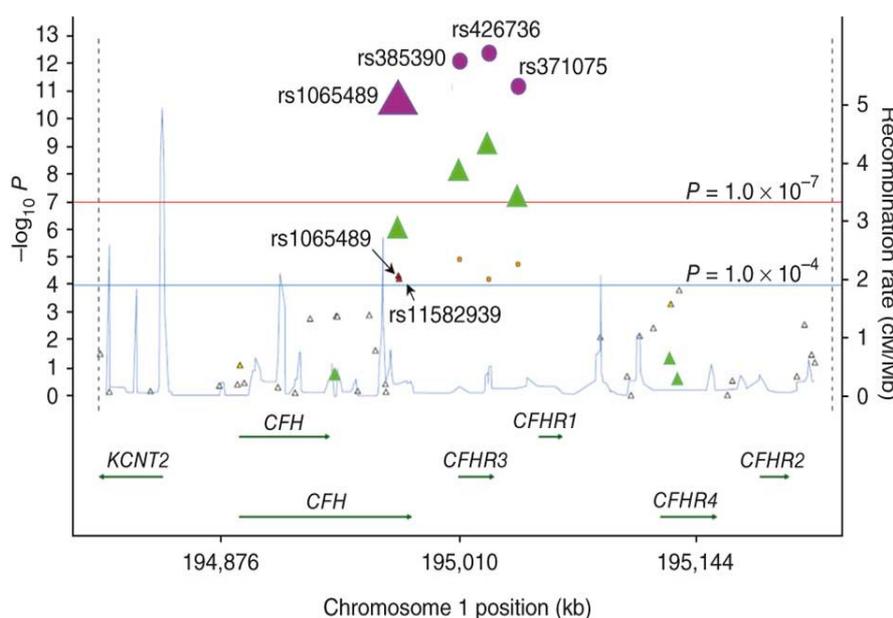


Figura 24. Representación gráfica de la asociación regional del *cluster* de SNPs en el gen *CFH*. El análisis de imputación reveló tres SNPs (rs385390, rs426736 y rs371075) en fuerte desequilibrio de ligamiento con los SNPs tipados directamente (rs1065489 y rs11582939). Los *P*-valores del GWAS están representados como pequeños triángulos, los *P*-valores combinados de la replicación (Oeste de Europa y España) en verde, y los *P*-valores del metaanálisis (Reino Unido, Oeste de Europa y España) en morado. El análisis de imputación está representado en círculos, y el genotipado directo, en triángulos. La línea roja delimita el nivel de significación genómico (*P*-valor =  $1.0 \times 10^{-7}$ ). La línea azul delimita evidencia sugestiva de asociación en el estudio GWAS (*P*-valor =  $1.0 \times 10^{-4}$ ).

Tabla 13. Resultados de asociación de los SNPs imputados y genotipados en *CFH*, haciendo referencia a los SNPs relacionados en estudios previos con degeneración macular senil, y se han ubicado en relación con los dos SNPs de *CFH* comunicados en este estudio. I/G: imputado/genotipado. MAF<sub>CA</sub>: MAF en casos. MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles. DL: desequilibrio de ligamiento. \*Implica SNPs imputados en fuerte DL con *CFH* Y402H (rs1061170).

SNP	I/G	<i>P</i> -valor	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	OR	Comentario
rs3753394	G	0.08377	0.26	0.28	0.87	Variante del promotor -496; Haralambous et al., 2006
rs7524776	G	0.327	0.16	0.17	0.91	
rs6680396	I	0.1578	0.21	0.23	0.89	
rs529825	I	0.1491	0.21	0.23	0.89	
rs800292	G	0.5258	0.22	0.23	0.95	
rs1329424	I	0.00719	0.43	0.38	1.21	
rs572515	I	0.005534	0.43	0.38	1.22	
rs12127759	I	0.8148	0.15	0.15	1.02	
rs16840419	I	0.8366	0.15	0.15	1.02	
rs3766404	G	0.921	0.15	0.15	1.01	

rs16840422	I	0.9794	0.15	0.15	1	
rs1061147	I	0.002122	0.43	0.38	1.24	SNP ARMD, reportado previamente, Edwards et al., 2005
rs1329422	I	0.001853	0.43	0.38	1.24	*
rs2300430	I	0.005464	0.43	0.38	1.21	*
rs10801553	I	0.001775	0.43	0.38	1.24	*
rs1329421	I	0.001853	0.43	0.38	1.24	*
rs10801554	I	0.001853	0.43	0.38	1.24	*
rs7529589	I	0.001783	0.43	0.38	1.24	*
rs482934	I	0.001853	0.43	0.38	1.24	*
rs10801555	G	0.001752	0.43	0.38	1.24	En fuerte DL con CFH Y402H; D' = 1, r2 = 0.774
rs10922094	I	0.001853	0.43	0.38	1.24	SNP ARMD, reportado previamente, Edwards et al., 2005
rs12124794	I	0.4741	0.2	0.21	0.94	
rs10922096	I	0.001919	0.42	0.47	0.81	*
rs10922102	I	0.001952	0.43	0.38	1.24	*
rs2860102	I	0.001952	0.43	0.38	1.24	SNP ARMD, reportado previamente, Edwards et al., 2005
rs12038333	I	0.002438	0.43	0.38	1.24	*
rs12045503	I	0.002359	0.43	0.38	1.24	*
rs9970784	I	0.001232	0.48	0.42	1.25	*
rs1831282	I	0.001232	0.48	0.42	1.25	*
rs203687	I	0.001232	0.48	0.42	1.25	*
rs2019727	I	0.7513	0.2	0.2	1.03	
rs2019724	G	0.001188	0.48	0.42	1.25	SNP ARMD, reportado previamente, Haines et al., 2005
rs1887973	I	0.001232	0.48	0.42	1.25	*
rs6428357	G	0.001257	0.48	0.42	1.25	En fuerte DL con CFH Y402H; D' = 1, r2 = 0.58
rs6695321	I	0.000229	0.32	0.38	0.76	*
rs10733086	I	0.001232	0.48	0.42	1.25	*
rs1410997	I	0.001315	0.48	0.42	1.25	*
rs203685	I	0.002454	0.48	0.43	1.23	*
rs10737680	I	0.8691	0.41	0.41	0.99	
rs1831281	I	0.5534	0.2	0.21	0.95	
rs203674	I	0.00118	0.48	0.42	1.25	*
rs3753395	I	0.8747	0.41	0.41	0.99	SNP ARMD, reportado previamente, Haines et al., 2005
rs6677604	G	0.7506	0.2	0.2	1.03	
rs10922106	I	0.8747	0.41	0.41	0.99	
rs393955	I	0.001211	0.48	0.42	1.25	*
rs381974	I	0.001584	0.48	0.42	1.25	*
rs3753396	I	5.41E-06	0.11	0.17	0.61	
rs403846	I	0.001197	0.48	0.42	1.25	*
rs419137	G	0.02189	0.15	0.13	1.25	
rs1410996	I	0.8892	0.41	0.41	0.99	
rs395544	I	0.001162	0.48	0.42	1.25	*
rs380390	I	0.001216	0.48	0.42	1.25	*SNP ARMD, reportado previamente, Klein et al., 2005
rs7540032	I	0.6752	0.4	0.41	0.97	
rs2284664	G	0.3713	0.2	0.21	0.93	

rs1329428	G	0.6605	0.4	0.41	0.97	SNP ARMD, reportado previamente, Klein et al., 2005
rs70620	I	8.82E-05	0.12	0.17	0.67	
rs11799380	I	6.57E-05	0.12	0.17	0.66	
rs424535	I	0.004296	0.32	0.36	0.81	
rs1065489	G	4.70E-05	0.12	0.17	0.66	Estudio actual
rs11582939	G	6.10E-05	0.12	0.17	0.67	Estudio actual
rs16840522	I	0.8884	0.2	0.2	1.01	
rs10801560	I	0.3737	0.2	0.21	0.93	
rs10801561	I	0.3737	0.2	0.21	0.93	
rs402032	I	6.76E-05	0.27	0.33	0.73	
rs395998	I	0.000303	0.48	0.42	1.29	*
rs385390	I	2.61E-05	0.11	0.17	0.63	
rs426736	I	5.57E-05	0.11	0.16	0.65	
rs371075	I	1.60E-05	0.11	0.16	0.62	
rs436719	I	9.11E-06	0.26	0.33	0.7	
rs432007	I	0.000501	0.53	0.46	1.28	
rs503002	I	1.27E-05	0.26	0.33	0.71	

Un grupo de 13 SNPs contenidos en esta región del cromosoma 1 (en *CFH* y *CFHR*) fueron seleccionados para genotipado en todos los casos de enfermedad meningocócica y controles disponibles (Tabla 14).

**Tabla 14. Polimorfismos del cluster de genes *CFH/CFHR* seleccionados para el genotipado en las tres cohortes, después de los resultados de la imputación.** <sup>a</sup>Fallo de genotipado en la cohorte del Sur de Europa. MAF<sub>CA</sub>: MAF en casos. MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles. Cont I/G: Controles Imputados / Genotipados.

Gen	SNP	UK-GWAS					Oeste de Europa				ESIGEM-España			
		MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	Cont I/G	P-valor	OR	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	OR	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	P-valor	OR
<i>CFH</i>	rs10489456	0,12	0,17	I	3.4 x 10 <sup>-4</sup>	0,69	0,10	0,16	2.1 x 10 <sup>-5</sup>	0,60	0,15	0,20	0,0075	0,72
<i>CFH</i>	rs11799595	0,12	0,17	I	3 x 10 <sup>-4</sup>	0,73	0,10	0,16	1.9 x 10 <sup>-6</sup>	0,57	0,15	0,20	0,0045	0,70
<i>CFH</i>	rs742855	0,12	0,17	T	2.8 x 10 <sup>-4</sup>	0,72	0,10	0,16	1.7 x 10 <sup>-5</sup>	0,60	0,14	0,19	0,0057	0,70
<i>CFH</i>	rs12045503	0,42	0,38	I	0,018	1,18	0,40	0,34	0,006	1,25	0,39	0,37	0,3621	1,10
<i>CFH</i>	rs12144939	0,20	-	-	-	-	0,26	0,20	4.7 x 10 <sup>-4</sup>	1,38	0,23	0,23	1	1,00
<i>CFH</i>	rs35908703	0,03	-	-	-	-	0,03	0,05	0,0376	0,64	0,05	0,08	0,0082	0,59
<i>CFH</i>	rs7513157	0,04	-	-	-	-	0,05	0,02	1.4 x 10 <sup>-4</sup>	2,20	0,03	0,04	0,8032	0,93
<i>CFHR3</i>	rs371075	0,11	0,16	I	1.7 x 10 <sup>-5</sup>	0,62	0,12	0,20	6.5 x 10 <sup>-8</sup>	0,56	0,20	0,25	0,0486	0,79
<i>CFHR3</i>	rs385390	0,11	0,16	T	1.2 x 10 <sup>-5</sup>	0,62	0,12	0,20	3.8 x 10 <sup>-8</sup>	0,55	0,17	0,22	0,0167	0,74
<i>CFHR3</i>	rs426736	0,11	0,16	I	6.1 x 10 <sup>-5</sup>	0,65	0,13	0,21	6.5 x 10 <sup>-8</sup>	0,56	0,19	0,25	0,0013	0,69
<i>CFHR1</i>	rs436719	0,26	0,33	I	8.1 x 10 <sup>-6</sup>	0,70	0,41	0,45	0,0193	0,83	0,45	0,44	0,7329	1,04
<i>CFHR1</i>	rs16840658 <sup>a</sup>	0,06	0,12	T	5.3 x 10 <sup>-7</sup>	0,50	0,07	0,11	1.1 x 10 <sup>-4</sup>	0,58	-	-	-	-
<i>CFHR4</i>	rs1853883	0,52	0,46	I	1.7 x 10 <sup>-4</sup>	1,29	0,43	0,43	0,876	0,99	0,40	0,41	0,6999	0,96

Tres SNPs de *CFH* y otros tres localizados en el gen adyacente *CFHR3* replicaron la asociación de forma independiente en los tres grupos, y alcanzaron significación para todo el genoma en un análisis combinado (Tabla 12). Todos ellos confirieron protección frente a la enfermedad para los portadores del alelo minoritario. Lamentablemente, después de varios intentos de tipificación con diferentes tecnologías (Sequenom y Taqman) uno de los SNPs en *CFHR1*, rs16840658, falló en el genotipado en la cohorte del Sur de Europa, lo que dificultó cualquier análisis combinado con este SNPs.

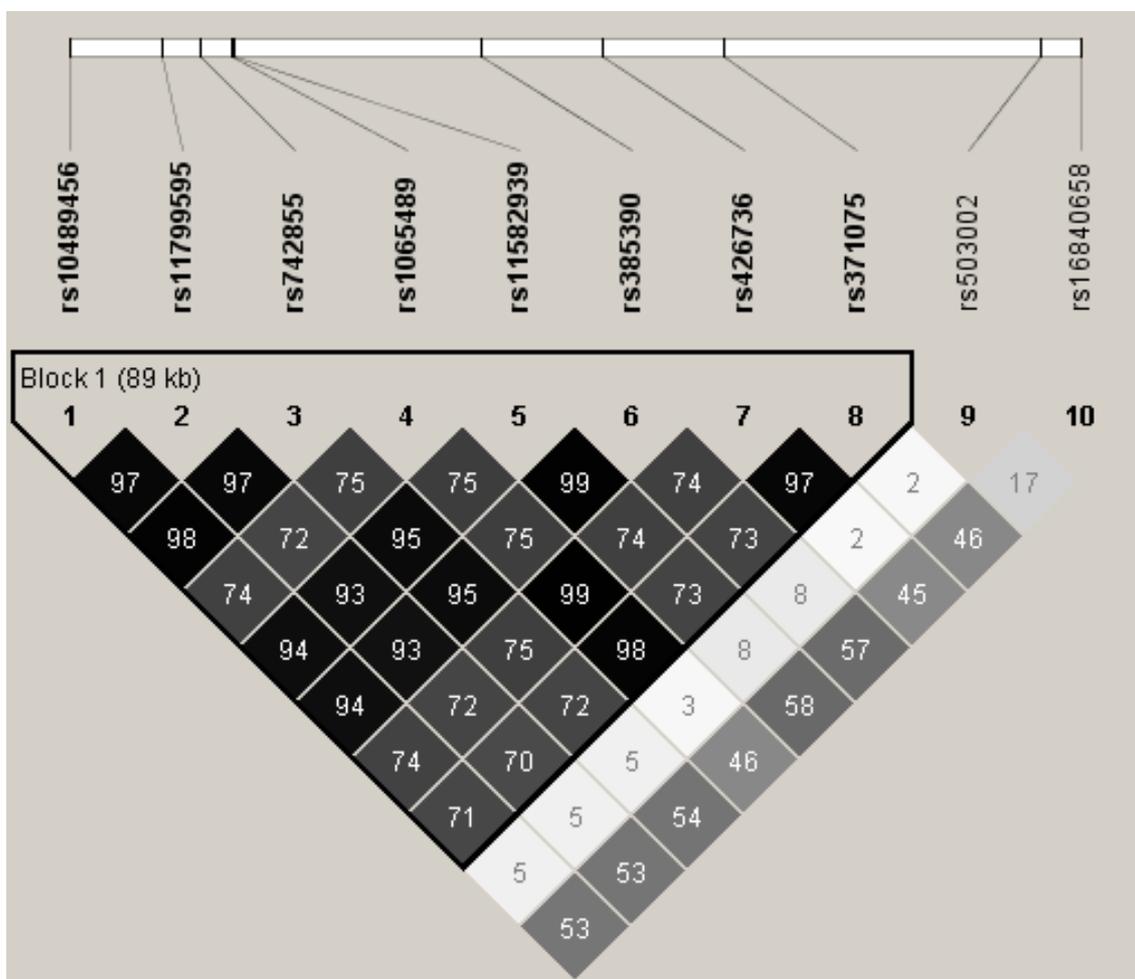
Después de genotipar directamente los tres SNPs dentro de *CFHR3* en los casos de enfermedad meningocócica, detectamos discordancia entre los resultados imputados y genotipados. Esta discrepancia puede ser fácilmente explicada por la existencia de variantes en el número de copias en esta región<sup>235-236</sup>. Los genotipos imputados en los casos y controles obtuvieron el mismo error sistemático en ambos grupos, pero el análisis de los controles imputados y los casos genotipados reveló un sesgo en uno de los grupos. La comparación directa entre polimorfismos imputados y genotipados en los casos corroboró esta inconsistencia (Tabla 15).

**Tabla 15. Comparación entre los alelos imputados y genotipados en los polimorfismos de *CFH* y *CFHR*.** Contaje hace referencia al número de alelos observados en casos con respecto a controles.

	Gen	Imputado		Genotipado		
		Contaje	MAF	Contaje	MAF	P-valor
rs10489456	<i>CFH</i>	825/101	0,11	831/115	0,12	0,4
rs10737680	<i>CFH</i>	550/378	0,41	568/378	0,4	0,73
rs12045503	<i>CFH</i>	535/409	0,43	539/393	0,42	0,61
rs1831282	<i>CFH</i>	495/455	0,48	488/452	0,48	0,93
rs742855	<i>CFH</i>	835/111	0,12	832/114	0,12	0,83
rs11799595	<i>CFH</i>	819/105	0,11	829/115	0,12	0,58
rs503002	<i>CFHR1</i>	676/240	0,26	698/234	0,25	0,59
rs436719	<i>CFHR1</i>	671/237	0,26	600/310	0,34	<b>0,0002</b>
rs16840658	<i>CFHR1</i>	864/56	0,06	868/60	0,06	0,74
rs371075	<i>CFHR3</i>	816/98	0,11	810/134	0,42	<b>0,024</b>
rs385390	<i>CFHR3</i>	822/104	0,11	806/136	0,14	<b>0,038</b>
rs426736	<i>CFHR3</i>	820/102	0,11	776/138	0,15	<b>0,01</b>
rs1853883	<i>CFHR4</i>	452/484	0,52	452/492	0,52	0,86

Por tanto, como no hubo ADN disponible de los controles WTCCC para su genotipado directo, usamos genotipos imputados del conjunto de datos del GWAS para obtener *P*-valores combinados en los SNPs dentro de *CFHR3*.

Los SNPs estadísticamente asociados están localizados en una región que abarca 89 kilobases localizada en el cromosoma 1, que presenta fuertes valores de desequilibrio de ligamiento (LD;  $r^2 > 0.7$ ) (Figura 25).



**Fig. 25. Gráfico de desequilibrio de ligamiento de los SNPs asociados (*CFH* y *CFHR3*).** Los números dentro de los romboides y el gradiente de color indican los  $r^2$ -valores.

El análisis de haplotipo de los marcadores asociados que habían sido genotipados en la primera replicación, identificó dos haplotipos asociados a la enfermedad ( $P$ -valor =  $5.2 \times 10^{-8}$  y  $8 \times 10^{-6}$ , respectivamente) (Tabla 16).

**Tabla 16. Análisis de haplotipo de los SNPs asociados en los genes *CFH* y *CFHR3*, en los grupos del GWAS y del Oeste de Europa.  $\chi^2$ : Chi-cuadrado.**

	Haplotipo	Frecuencia	Ratio Casos	Ratio Controles	$\chi^2$	P-valor
<b>1</b>	CGATGCTA	0.834	959 : 135	1363 : 347	29.624	$5.25 \times 10^{-8}$
<b>2</b>	TCGGTTCG	0.128	104.9 : 989.1	263.9 : 1446.1	19.945	$7.97 \times 10^{-6}$
<b>3</b>	CGAGGCCG	0.031	26 : 1068	64.8 : 1645.2	4.264	$3.9 \times 10^{-3}$

Los *P*-valores para el haplotipo no aumentaron la significación estadística al compararlos con el análisis de alelo único (Tabla 12). Si los SNPs identificados actualmente no fueran las variantes funcionales, sería necesario llevar a cabo un esfuerzo de genotipado o re-secuenciación más intenso en estas regiones para tratar de identificar la o las variantes causales dentro de la región asociada.

## 6.2. SEGUNDA FASE DEL ESTUDIO: ESIGEM-Spain GWAS

### 6.2.1. Análisis preliminar del genotipado de datos GWAS y análisis de ancestralidad

En la primera fase del estudio (UK-GWAS), se encontraron un total de 518,920 SNPs comunes a casos y controles. Estos SNPs pasaron filtros exigentes de control de calidad tales como tasas de genotipado mayores al 95% y equilibrio de Hardy-Weinberg con  $P$ -valor  $> 10^{-7}$  por SNP.

De un número inicial de 547 casos genotipados de enfermedad meningocócica en Reino Unido, 72 fueron excluidos del estudio porque no reunían los criterios de control de calidad requeridos, dejando un total de 475 casos de enfermedad meningocócica para los siguientes análisis de asociación.

Usamos datos del genotipado completo de 5,069 controles sanos de Reino Unido procedentes del proyecto WTCCC2, de los cuales 4,703 pasaron los estrictos filtros de control de calidad y fueron incluidos en el análisis final, donde sus genotipos fueron sistemáticamente contrastados con los de los 475 casos de enfermedad meningocócica.

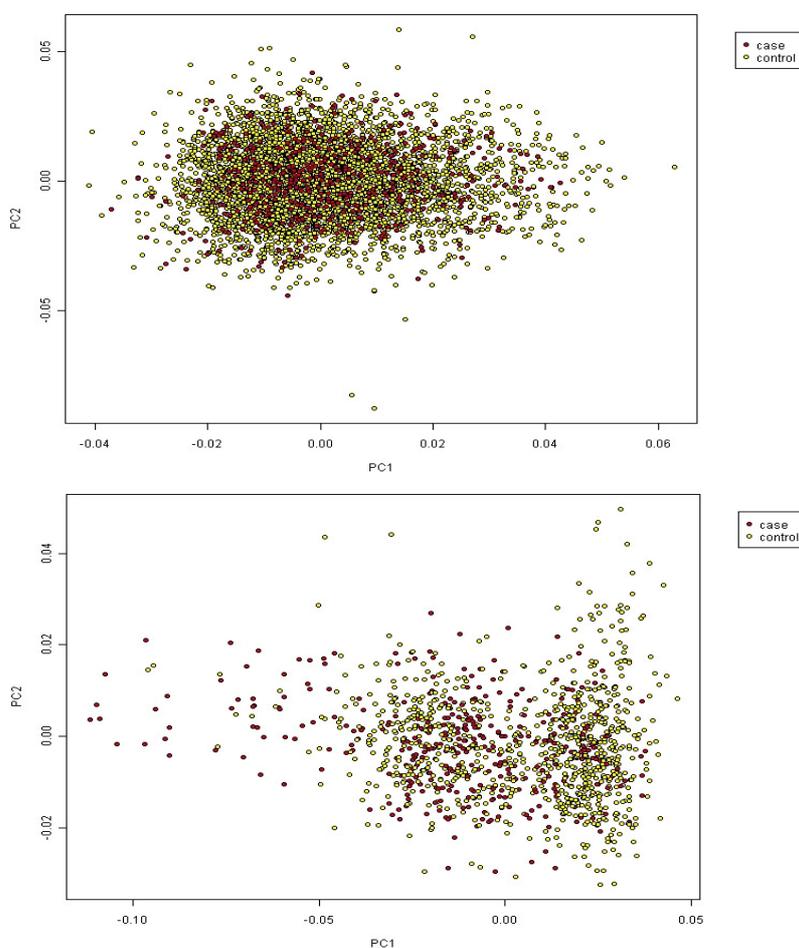
Los análisis de ancestralidad de las muestras de Reino Unido mostraron que los casos de enfermedad meningocócica y los controles estaban bien emparejados (Figura 26). En esta línea, no fue necesario ajustar por ancestralidad el análisis de asociación (con 1 grado de libertad).

Para la cohorte española de enfermedad meningocócica, fuera de los 496 casos y los 993 controles, se detectaron un par de familiares de primer grado. Aunque todas las muestras tenían tasas de genotipado mayores al 95%, un total de 128 muestras (77 casos y 26 controles) presentaron valores extremos/atípicos en los análisis de ancestralidad, y por lo tanto fueron excluidas del análisis, dejando un total de 419 casos de enfermedad meningocócica y 967 controles para los análisis de asociación.

En las muestras de enfermedad meningocócica de España, se observó un leve grado de estratificación genética (Figura 26), por lo que se ajustaron los análisis de

asociación usando los primeros cinco componentes principales del PCA realizado sobre los perfiles genómicos en casos y controles.

Por lo tanto, cuando las muestras de España y de Reino Unido fueron analizadas por separado, observamos una mínima inflación de todo el genoma de los test estadísticos de asociación, y por ello el metaanálisis de ambas colecciones de muestras fue llevado a cabo usando varianza inversa (*inverse-variance, fixed effects method*).



**Fig. 26.** Análisis de ancestralidad genética entre los casos de enfermedad meningocócica de Reino Unido y los controles WTCCC2 (arriba) y entre los casos de enfermedad meningocócica y los controles de España (abajo). El PCA fue llevado a cabo para detectar y corregir asociaciones potencialmente espúreas debidas a diferencias de ancestralidad entre casos y controles. No encontramos evidencia de estratificación genética en las muestras del estudio GWAS de Reino Unido, y sí un leve grado de estratificación en la muestra del estudio GWAS de España. Se muestran los dos primeros componentes principales.

Para la cohorte del Oeste de Europa, nuestros datos sugieren que la estratificación es mínima debido a que no hay inflación de la OR entre el metaanálisis (p. ej. rs544830, OR = 1.30) y la replicación (rs544830, OR = 1.30). Además, viendo el reciente estudio GWAS a gran escala en esclerosis múltiple<sup>237</sup>, puede verse que la estratificación entre individuos con ascendencia del Oeste de Europa (p. ej. Reino Unido, Alemania, Bélgica) es muy baja comparada con individuos con ascendencia del Sur de Europa.

### 6.2.2. Metaanálisis de los GWAS de Reino Unido y España

Los test de asociación de SNPs de los metaanálisis entre los grupos español y de Reino Unido pusieron de relieve un exceso significativo de los valores de  $P$  superior al de la distribución nula (Figuras 27 y 28 para distribuciones específicas, y Figura 29 para el metaanálisis).

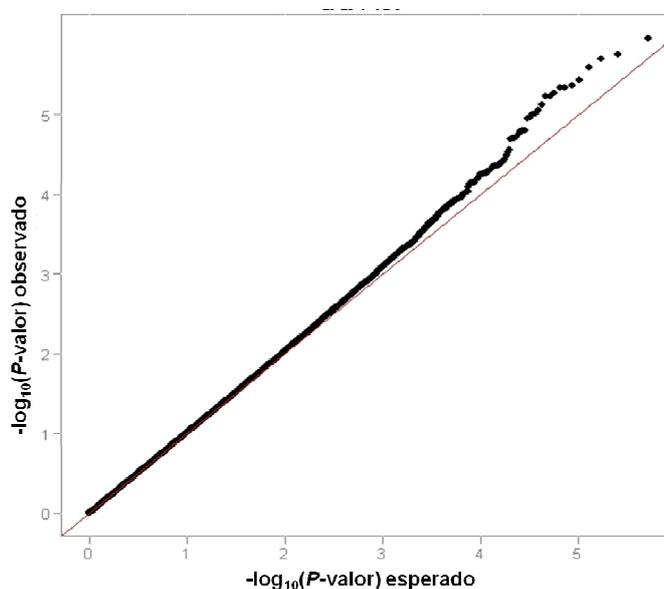


Fig. 27. Gráfico cuantil-cuantil (gráfico Q-Q) mostrando las distribuciones observadas y esperadas de los  $P$ -valores de asociación (expresados como test con un grado de libertad en la regresión logística) para el estudio de GWAS de Reino Unido ( $\lambda_{gc} = 1.019$ ).

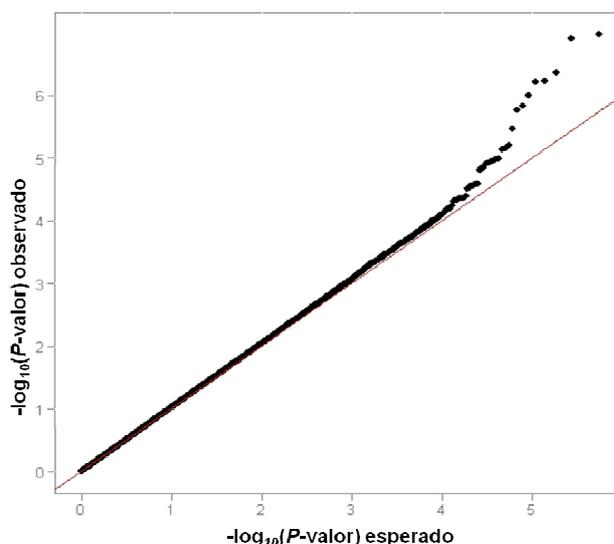


Fig. 28. Gráfico cuantil-cuantil (gráfico Q-Q) mostrando las distribuciones observadas y esperadas de los *P*-valores de asociación (expresados como test con un grado de libertad en la regresión logística) para el estudio de GWAS de España ( $\lambda_{gc} = 1.031$ ).

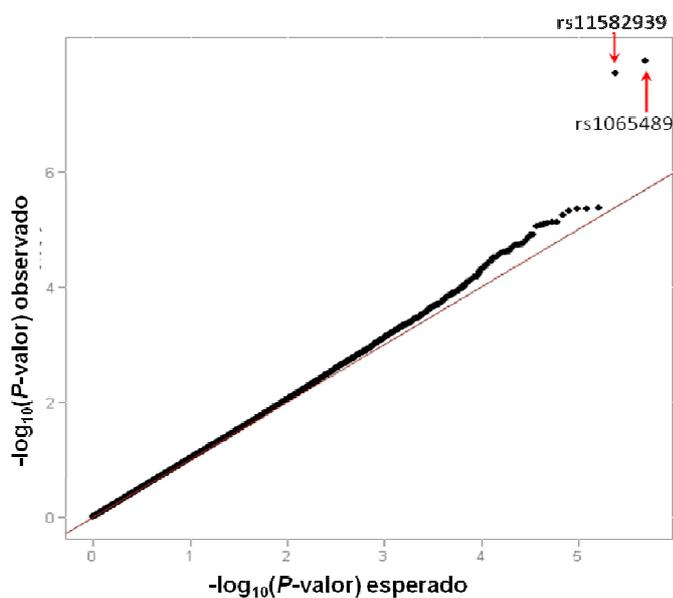


Fig. 29. Gráfico cuantil-cuantil (gráfico Q-Q) mostrando las distribuciones observadas y esperadas de los *P*-valores de asociación (expresados como test con un grado de libertad en la regresión logística) en el metaanálisis de ambos GWAS, el de Reino Unido y el de España ( $\lambda_{gc} = 1.032$ ).

En este contexto de inflación genómica mínima, esto sugiere que al menos algunos de estos *P*-valores  $< 10^{-4}$ , (Tabla 17) podrían representar verdaderas asociaciones con la enfermedad meningocócica.

**Tabla 17. SNPs que alcanzaron un  $P$ -valor  $< 1 \times 10^{-4}$  en el metaanálisis de los GWAS de Reino Unido y España.** Cr: cromosoma. LC: localización cromosómica. A1: alelo afectado. OR: odds ratio por alelo. SE: error estándar para la OR por alelo. Phet:  $P$ -valor por heterogenicidad.

Cr	SNP	LC	ESIGEM-Spain GWAS				UK-GWAS				Metaanálisis		
			A1	OR	SE	$P$ -valor	A1	OR	SE	$P$ -valor	OR	$P$ -valor	$P_{\text{het}}$
1	rs1065489	194976397	A	0.60	0.1262	4.89E-05	A	0.65	0.1054	5.35E-05	0.63	1.18E-08	0.60
1	rs11582939	194976780	A	0.61	0.1257	6.49E-05	A	0.66	0.105	6.86E-05	0.64	1.95E-08	0.61
1	rs544830	94285481	G	1.24	0.09379	0.021	G	1.33	0.07004	3.81E-05	1.30	2.93E-06	0.54
5	rs12188351	168318667	A	1.67	0.1135	6.22E-06	A	1.28	0.1451	0.091	1.51	4.22E-06	0.15
1	rs550060	94297372	A	1.20	0.09467	0.052	A	1.35	0.0695	1.96E-05	1.29	4.48E-06	0.34
1	rs497511	94295701	G	1.20	0.09492	0.056	G	1.35	0.06956	1.88E-05	1.29	4.55E-06	0.32
17	rs4417581	61831270	A	1.41	0.1395	0.014	A	1.41	0.0913	0.00018	1.41	7.5E-06	1.00
1	rs12404243	195129192	C	0.72	0.1143	0.0044	C	0.69	0.1054	0.00053	0.71	7.55E-06	0.80
22	rs175149	15690741	A	1.17	0.09593	0.096	A	1.34	0.06821	1.72E-05	1.28	7.83E-06	0.26
6	rs9385647	133790074	G	0.75	0.09628	0.0032	G	0.78	0.07292	0.00078	0.77	8.25E-06	0.75
2	rs11902634	224305000	G	1.41	0.09733	0.00041	G	1.24	0.07317	0.0036	1.30	8.8E-06	0.28
1	rs497743	239245567	A	0.79	0.0989	0.015	A	0.76	0.07395	0.00020	0.77	9.19E-06	0.79
3	rs6806363	178776775	A	0.78	0.09444	0.0072	A	0.78	0.07117	0.00056	0.78	1.23E-05	0.94
22	rs4824047	47737771	A	1.33	0.1277	0.027	A	1.38	0.08483	0.00016	1.36	1.26E-05	0.80
17	rs4790911	61841377	A	1.34	0.1572	0.064	A	1.49	0.1013	9.26E-05	1.44	1.79E-05	0.57
22	rs175139	15684246	G	1.20	0.0958	0.055	G	1.30	0.06776	9.72E-05	1.27	1.8E-05	0.50
15	rs1913426	31343094	G	1.26	0.09911	0.020	G	1.30	0.07233	0.00032	1.28	1.92E-05	0.81
3	rs9880442	46611124	G	0.70	0.09489	0.00017	G	0.84	0.07113	0.012	0.78	1.92E-05	0.13
1	rs3789399	94284305	C	0.84	0.09498	0.058	C	0.76	0.07121	9.09E-05	0.78	1.96E-05	0.41
22	rs9616622	47733695	A	1.36	0.125	0.014	A	1.34	0.08351	0.00053	1.34	2.07E-05	0.90
16	rs10974	4344621	A	1.33	0.141	0.043	A	1.61	0.1228	0.00011	1.48	2.22E-05	0.31
1	rs1416077	82872674	A	0.76	0.1399	0.053	A	0.67	0.1029	0.00013	0.70	2.41E-05	0.48
1	rs3789412	94308655	A	1.31	0.1063	0.010	A	1.30	0.07736	0.00081	1.30	2.47E-05	0.92
3	rs7620503	178786992	A	0.78	0.09362	0.0089	A	0.79	0.07123	0.00094	0.79	2.49E-05	0.94
19	rs10411434	53002354	A	1.42	0.1523	0.023	A	1.46	0.1062	0.00039	1.44	2.55E-05	0.87
2	rs655783	224307419	A	1.39	0.09275	0.00034	A	1.19	0.06889	0.010	1.26	2.77E-05	0.18
9	rs7856621	78774405	C	1.35	0.1354	0.026	C	1.41	0.09647	0.00040	1.39	3.02E-05	0.81
8	rs7813428	56028448	G	1.21	0.09786	0.055	G	1.31	0.07226	0.00017	1.27	3.06E-05	0.48
8	rs12678874	55994609	A	1.20	0.09852	0.059	A	1.31	0.07223	0.00015	1.27	3.14E-05	0.47
2	rs13013873	229748061	A	1.22	0.09796	0.043	A	1.30	0.07073	0.00025	1.27	3.25E-05	0.61
9	rs3793576	23727408	C	1.33	0.1587	0.073	C	1.55	0.1154	0.00015	1.47	3.8E-05	0.44
16	rs1364063	68146073	G	0.80	0.0934	0.018	G	0.79	0.07024	0.00078	0.79	3.91E-05	0.90
11	rs4755750	33587368	A	0.71	0.09719	0.00048	A	0.84	0.07236	0.013	0.79	4.43E-05	0.19
5	rs12697148	55914728	A	0.60	0.2659	0.057	A	0.40	0.243	0.00015	0.48	4.5E-05	0.25
8	rs17069790	4112508	A	1.40	0.1916	0.076	A	1.52	0.1168	0.00034	1.49	6.95E-05	0.73
5	rs1384282	113177023	G	0.71	0.09435	0.00027	G	0.86	0.06824	0.023	0.80	7.08E-05	0.11
19	rs10405467	52989040	G	1.27	0.1264	0.062	G	1.35	0.0843	0.00042	1.32	7.25E-05	0.69
5	rs6594762	113176166	A	0.71	0.09439	0.00033	A	0.86	0.06832	0.022	0.80	7.69E-05	0.12

2	rs714104	46318300	A	0.82	0.103	0.060	A	0.76	0.07825	0.00041	0.78	7.78E-05	0.52
6	rs5000996	150920	A	0.80	0.1225	0.074	A	0.72	0.09235	0.00039	0.75	9.2E-05	0.48

Al igual que en la primera fase del estudio, encontramos una fuerte evidencia de asociación con *CFH*, ya previamente comunicada, localizada en el cromosoma 1 (rs1065489, *P*-valor =  $1.18 \times 10^{-8}$  por alelo OR = 0.63 y rs11582939, *P*-valor =  $1.95 \times 10^{-8}$  por alelo OR = 0.64) (Figura 29). Una imputación detallada y el metaanálisis de los datos de España y Reino Unido, usando el proyecto 1000 Genomas<sup>238</sup> no reveló ninguna evidencia de asociación superior que la del SNP rs1065416 localizado en el gen *CFH* (Tabla 18 y Figura 30), sugiriendo que la asociación en esta región puede ser atribuida a una señal de asociación causal única.

**Tabla 18. SNPs imputados que alcanzaron un *P*-valor <  $1 \times 10^{-4}$  en el metaanálisis de los GWAS de Reino Unido y España para el locus *CFH*.** A1: alelo afectado; OR: odds ratio por alelo; SE: error estándar para la OR por alelo.

Cr	SNP	LC	ESIGEM-Spain GWAS				UK-GWAS				Metaanálisis	
			A1	OR	SE	<i>P</i> -valor	A1	OR	SE	<i>P</i> -valor	<i>P</i> -valor	OR
1	rs2336221	196708891	T	0.65	0.1054	5.22E-05	T	0.60	0.1263	0.00004463	1.05E-08	0.63
1	rs11799380	196708455	G	0.65	0.1054	5.34E-05	G	0.60	0.1263	0.00004463	1.08E-08	0.63
1	rs105980	196715666	A	0.65	0.1054	5.34E-05	A	0.60	0.1263	0.00004463	1.08E-08	0.63
1	rs35352142	196712902	T	0.66	0.1059	9.56E-05	T	0.57	0.1309	0.00002237	1.2E-08	0.63
1	rs72482675	196716924	G	0.65	0.1054	5.34E-05	G	0.60	0.1266	0.00005413	1.28E-08	0.63
1	rs70620	196704997	A	0.66	0.1054	7.48E-05	A	0.59	0.1267	0.00003671	1.32E-08	0.63
1	rs70621	196705009	A	0.66	0.1054	7.48E-05	A	0.59	0.1267	0.00003671	1.32E-08	0.63
1	rs742855	196705520	C	0.66	0.105	9.79E-05	C	0.59	0.1267	0.00003671	1.77E-08	0.63
1	rs529541	196719716	G	0.66	0.1055	7.36E-05	G	0.60	0.1267	0.00005615	1.87E-08	0.63
1	rs1048663	196674982	A	0.67	0.1051	0.000124	A	0.60	0.1272	0.00005109	3.09E-08	0.64
1	rs12406047	196677898	T	0.67	0.1051	0.000126	T	0.60	0.1272	0.00005109	3.13E-08	0.64
1	rs74213209	196679010	G	0.67	0.1051	0.000126	G	0.60	0.1272	0.00005109	3.13E-08	0.64
1	rs1831280	196683274	G	0.67	0.1051	0.000126	G	0.60	0.1264	0.00005489	3.27E-08	0.64
1	rs11584505	196679927	C	0.67	0.1051	0.000124	C	0.60	0.1264	0.00005598	3.29E-08	0.64
1	rs12402808	196691625	A	0.67	0.1051	0.000123	A	0.60	0.1268	0.00006255	3.56E-08	0.64
1	rs11801630	196692148	T	0.67	0.1051	0.000123	T	0.60	0.1268	0.00006255	3.56E-08	0.64
1	rs10922107	196698651	T	0.67	0.1051	0.000123	T	0.60	0.1268	0.0000651	3.69E-08	0.64
1	rs10489456	196687515	A	0.67	0.1051	0.000121	A	0.61	0.126	0.00006818	3.73E-08	0.64
1	rs11799595	196700322	C	0.67	0.1051	0.00012	C	0.60	0.1267	0.00006817	3.73E-08	0.64
1	rs3753396	196695742	G	0.67	0.1055	0.000136	G	0.60	0.1277	0.00007314	4.58E-08	0.64
1	rs776089	196721097	C	0.65	0.1105	0.000118	C	0.59	0.1337	0.0001007	5.25E-08	0.63
1	rs72482676	196730755	C	0.67	0.1111	0.000253	C	0.58	0.1325	0.00004546	5.82E-08	0.63
1	rs6695321	196675861	G	0.77	0.07302	0.000252	G	0.69	0.09663	0.0001485	1.92E-07	0.74
1	rs74822326	196924296	G	0.62	0.1069	5.84E-06	G	0.75	0.1128	0.01094	4.66E-07	0.68
1	rs139124820	196905991	C	0.75	0.0717	4.39E-05	C	0.77	0.09421	0.005169	7.65E-07	0.75

1	rs11589158	196933238	G	0.66	0.1014	3.87E-05	G	0.73	0.1124	0.005421	8.69E-07	0.69
1	rs146441739	196908385	T	0.65	0.1021	3.30E-05	T	0.74	0.1114	0.007336	1.11E-06	0.69
1	1-196914852	196914852	A	0.65	0.1017	3.11E-05	A	0.74	0.1115	0.008015	1.15E-06	0.69
1	rs115698922	196912012	T	0.66	0.1017	3.41E-05	T	0.74	0.1117	0.007711	1.18E-06	0.69
1	rs75799269	196926303	A	0.66	0.1017	3.21E-05	A	0.75	0.1116	0.008608	1.27E-06	0.69
1	rs76886884	196924288	C	0.65	0.1018	3.14E-05	C	0.75	0.1116	0.008608	1.27E-06	0.69
1	1-196905842	196905842	T	0.66	0.1021	3.92E-05	T	0.75	0.1114	0.009057	1.64E-06	0.70
1	rs148833787	196905982	A	0.66	0.1021	3.79E-05	A	0.75	0.1115	0.01009	1.79E-06	0.70
1	1-196905378	196905378	A	0.66	0.1031	4.86E-05	A	0.75	0.1123	0.01196	2.71E-06	0.70
1	rs34331968	196659753	C	0.80	0.06973	0.001426	C	0.73	0.09239	0.0007569	4.77E-06	0.78
1	rs10922096	196662459	C	0.80	0.0697	0.00147	C	0.74	0.09246	0.0008825	5.6E-06	0.78
1	rs12405238	196661613	T	0.79	0.0833	0.004077	T	0.71	0.1065	0.001318	2.21E-05	0.76
1	rs10922093	196661181	G	0.79	0.08329	0.004536	G	0.71	0.1068	0.001176	2.3E-05	0.76
1	rs72734328	196667944	G	0.79	0.08314	0.005158	G	0.71	0.1068	0.001224	2.74E-05	0.76
1	rs11580821	196667729	T	0.79	0.08313	0.005217	T	0.71	0.1068	0.001224	2.78E-05	0.76
1	rs506317	196717153	C	1.28	0.0677	0.000339	C	1.19	0.0954	0.06678	6.69E-05	1.25
1	rs4044578	196881420	C	1.28	0.06752	0.000227	C	1.16	0.09587	0.1228	9.47E-05	1.24

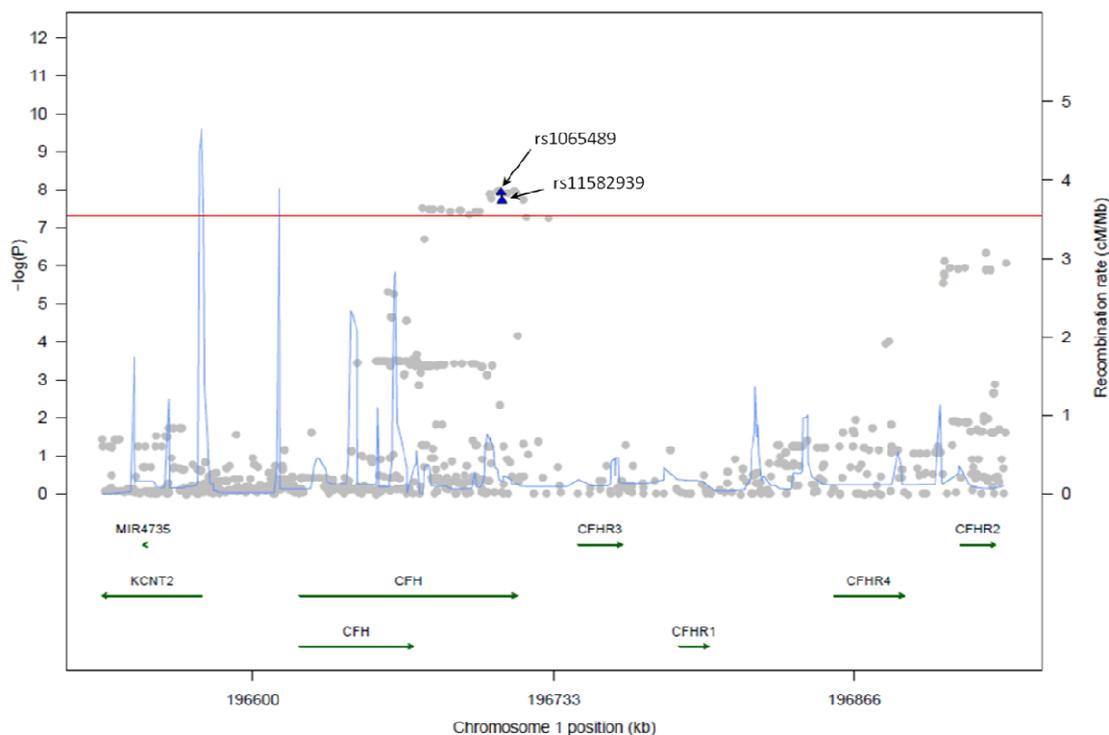
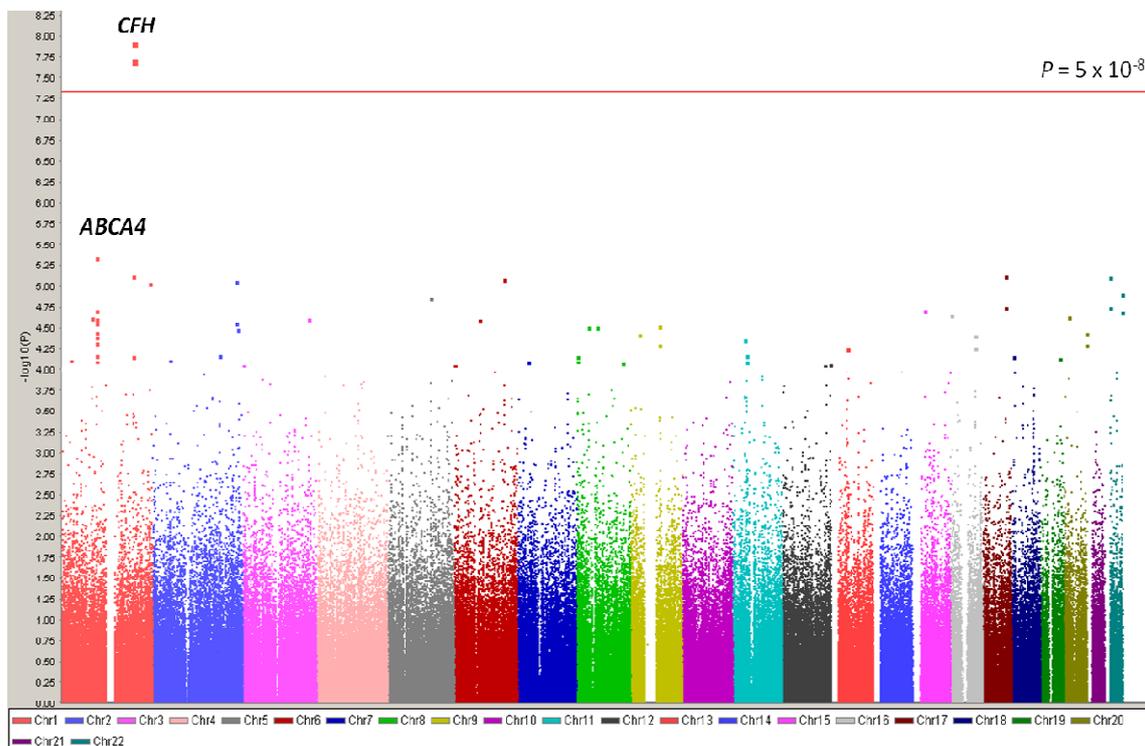


Fig. 30. Representación gráfica de la asociación regional de los SNPs localizados en el locus *CFH* del cromosoma 1 del metaanálisis entre los GWAS de Reino Unido y de España usando el panel europeo de 1000 Genomas para la imputación. Los resultados se muestran en el contexto de rs1065489 y rs11582939 (triángulos azules), que fueron directamente genotipados.

También percibimos que el segundo locus más significativo estaba localizado en el SNP marcador dentro del gen que codifica el *ATP-binding cassette*, sub-familia A (*ABC1*), miembro 4 - *ABCA4* (rs544830,  $P$ -valor =  $2.93 \times 10^{-6}$ , por alelo OR = 1.30) (Figura 31 y Tabla 19).



**Fig. 31.** *Manhattan plot* para el metaanálisis de las muestras de enfermedad meningocócica de ambos GWAS (de Reino Unido y España). El eje Y representa la fuerza de la asociación estadística (representada por  $-\log^{10}$  de  $P$ -valor) para cada SNP. El eje X representa cada cromosoma en un color diferente. La línea roja horizontal delimita evidencia de asociación significativa con la enfermedad ( $P$ -valor =  $5 \times 10^{-8}$ ).

**Tabla 19. Análisis de asociación entre los SNPs en el gen *ABCA4* y la enfermedad meningocócica en las tres cohortes.** MAF<sub>CA</sub>: MAF en casos. MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles. OR: Odds ratio con referencia al alelo de riesgo.  $P_{\text{het}}$ :  $P$ -valor para heterogeneidad entre las muestras.  $I^2$ : Índice I-al cuadrado entre las muestras, con valores entre 0 (no heterogeneidad) a 100 (muy alta heterogeneidad).

SNP ID	Muestra	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	OR (95% IC)	$P$ -valor	$P_{\text{het}}$	$I^2$
<b>rs544830</b> (G/A)	UK-GWAS	0.562	0.493	1.33	$3.81 \times 10^{-5}$		
	Spain-GWAS	0.532	0.502	1.24	0.021	-	-
	Meta-GWAS	-	-	1.30	$2.93 \times 10^{-6}$	-	-
	Replicación	0.563	0.498	1.30	$7.40 \times 10^{-5}$	-	-
	<b>Todas las muestras</b>	-	-	<b>1.30 (1.20 - 1.41)</b>	<b><math>9.17 \times 10^{-10}</math></b>	<b>0.82</b>	<b>0</b>
<b>rs550060</b> (A/G)	UK-GWAS	0.525	0.454	1.33	$3.81 \times 10^{-5}$	-	-
	Spain-GWAS	0.494	0.469	1.20	0.052	-	-
	Meta-GWAS	-	-	1.29	$4.48 \times 10^{-6}$	-	-
	Replicación	0.518	0.466	1.23	0.0044	-	-
	<b>Todas las muestras</b>	-	-	<b>1.27 (1.16 - 1.38)</b>	<b><math>1.06 \times 10^{-7}</math></b>	<b>0.60</b>	<b>0</b>
<b>rs497511</b> (G/A)	UK-GWAS	0.526	0.455	1.33	$3.81 \times 10^{-5}$	-	-
	Spain-GWAS	0.498	0.477	1.20	0.056	-	-
	Meta-GWAS	-	-	1.29	$4.55 \times 10^{-6}$	-	-
	Replicación	0.523	0.459	1.30	$1.11 \times 10^{-4}$	-	-
	<b>Todas las muestras</b>	-	-	<b>1.29 (1.18 - 1.40)</b>	<b><math>3.95 \times 10^{-9}</math></b>	<b>0.66</b>	<b>0</b>

Este marcador fue corroborado por otros dos SNPs colindantes (rs550060,  $P$ -valor =  $4.48 \times 10^{-6}$ , por alelo OR = 1.29 y rs497511,  $P$ -valor =  $4.55 \times 10^{-6}$ , por alelo OR = 1.29) (Figura 24 y Tabla 12).

### 6.2.3. Replicación en el Oeste de Europa

Se llevó a cabo una replicación de estos tres SNPs de *ABCA4* en una tercera colección de muestras del Oeste de Europa. Hubo una replicación significativa de los tres SNPs en esta muestra que comprendía 565 casos y 2,330 controles (Tablas 19 y 20). Asimismo se evidenció una asociación significativa de todo el genoma para dos SNPs *ABCA4* en el metaanálisis de datos de las muestras de enfermedad meningocócica de España, Reino Unido y el Oeste de Europa (rs544830  $P$ -valor =  $9.17 \times 10^{-10}$ ; rs497511,  $P$ -valor =  $3.95 \times 10^{-9}$ ) (Tabla 19).

**Tabla 20. Asociación resultante entre ABCA4 rs544830 y la enfermedad meningocócica en todas las muestras. Los resultados de la replicación del Oeste de Europa son estratificados más adelante por país de reclutamiento (Austria/Alemania y Holanda). MAF<sub>CA</sub>: MAF en casos. MAF<sub>CO</sub>: MAF en controles.  $P_{het}$ :  $P$ -valor para heterogeneidad entre las muestras.  $I^2$ : Índice I-al cuadrado entre las muestras, con valores entre 0 (no heterogeneidad) a 100 (muy alta heterogeneidad).**

Muestras (casos/controles)	MAF <sub>CA</sub>	MAF <sub>CO</sub>	OR (95% IC)	$P$ -valor	$P_{het}$	$I^2$
UK-GWAS (475 / 4703)	0.562	0.493	1.33	$3.81 \times 10^{-5}$		
Spain GWAS (419 / 967)	0.532	0.502	1.24	0.021	-	-
Metaanálisis GWAS UK-Spain	-	-	1.30	$2.93 \times 10^{-6}$	0.54	0
Replicación Austria/Alemania (379 / 2,196)	0.554	0.497	1.26	0.0036		
Replicación Holanda (186 / 134)	0.578	0.500	1.37	0.052		
Replicación todo el Oeste de Europa	0.563	0.498	1.30	$7.40 \times 10^{-5}$	0.64	0
Todas las muestras	-	-	1.30 (1.20 -1.41)	$9.17 \times 10^{-10}$	0.82	0

No fue posible corregir formalmente la estratificación de poblaciones en la muestra de replicación del Oeste de Europa. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que la asociación significativa observada entre ABCA4 rs544830 y la enfermedad meningocócica en esta cohorte podría deberse, potencialmente, a un factor de confusión debido a la existencia de estratificación poblacional. Por tanto estratificamos el análisis de asociación por países, y nos encontramos con que la OR era homogénea y constante en todos los lugares (Tabla 20), sugiriendo que los hallazgos de la replicación son lo suficientemente sólidos.

#### 6.2.4. Imputación de los datos

A continuación llevamos a cabo una imputación detallada del gen ABCA4 y sus regiones adyacentes usando la base de datos europea de 1000 Genomas, que incluye secuencias genéticas poblacionalmente raras (< 5% de frecuencia) y muy raras (< 1% de frecuencia). No se detectó ninguna evidencia de asociación superior a la observada en rs544830, y todos los SNPs que mostraban asociación estaban localizados en un bloque de fuerte desequilibrio de ligamiento flanqueado por puntos calientes de recombinación (*recombination hotspots*) (Figura 32).

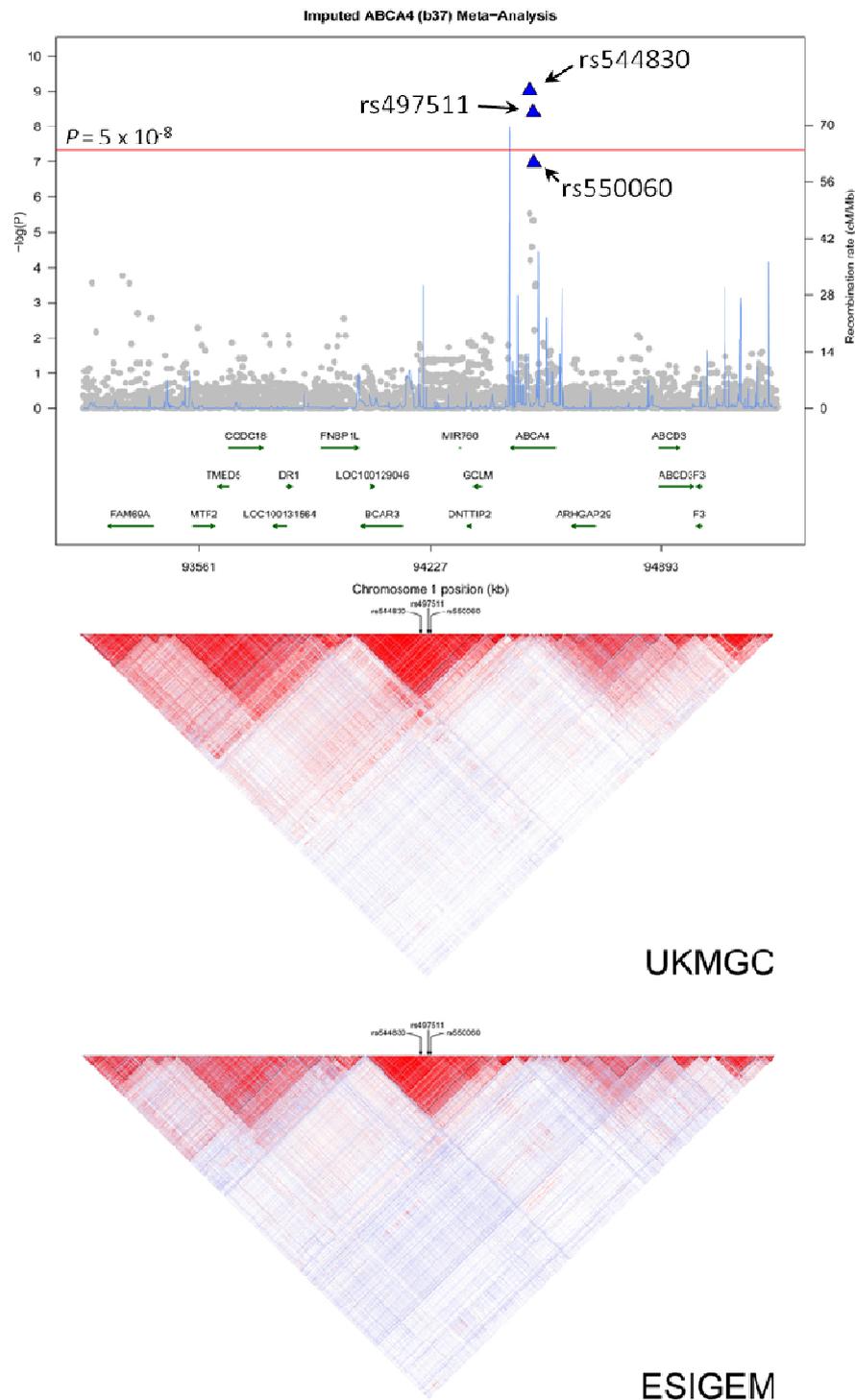


Fig. 32. Representación gráfica de la asociación regional (gráfico superior) y desequilibrio de ligamiento (gráfico inferior) en *ABCA4* y su región colindante (*flanking region*) del metaanálisis del GWAS de España y Reino Unido, usando el panel europeo 1000 Genomas para la imputación. Las flechas en la gráfica superior identifican el marcador centinela rs544830 y sus dos SNPs corroboradores. Los tres SNPs están localizados dentro de un bloque de fuerte desequilibrio de ligamiento, y flanqueado por puntos calientes de recombinación.

Estos datos sugieren que la asociación de enfermedad está, en efecto, confinada a *ABCA4*, y este resultado es concordante con los análisis condicionales que muestran que la asociación con *ABCA4* puede ser atribuida a rs544830 en el contexto de nuestros datos (Tabla 21).

**Tabla 21. Análisis condicional con los SNPs seleccionados en el locus *ABCA4* para el metaanálisis entre los GWAS de España y Reino Unido. El SNP condicionante es rs544830. LC: localización cromosómica.**

SNP	LC	Antes del análisis condicional		Después del análisis condicional	
		P-valor	OR	P-cond	OR-cond
rs544830	94285481	$2.93 \times 10^{-6}$	1.30	-	-
rs497511	94295701	$4.56 \times 10^{-6}$	1.29	0.48	1.10
rs550060	94297372	$4.59 \times 10^{-6}$	1.29	0.59	1.07
rs3789399	94284305	$1.92 \times 10^{-5}$	0.78	0.97	1.00
rs3789412	94308655	$2.31 \times 10^{-5}$	1.30	0.01	1.19
rs4147836	94289062	$2.59 \times 10^{-5}$	1.30	0.06	1.15
rs4147833	94300951	$3.25 \times 10^{-5}$	1.30	0.06	1.15
rs3789407	94304194	$3.83 \times 10^{-5}$	1.30	0.06	1.15
rs1191231	94289573	$4.48 \times 10^{-5}$	0.79	0.58	0.95
rs4140392	94304601	$6.04 \times 10^{-5}$	1.29	0.08	1.14
rs2151849	94307762	$7.49 \times 10^{-5}$	1.28	0.02	1.17
rs3789405	94303912	0.00019	1.25	0.05	1.14
rs4847273	94302331	0.00025	1.25	0.05	1.13
rs1007347	94303106	0.00043	1.24	0.06	1.13
rs549848	94297444	0.0030	0.84	0.77	1.03
rs2297633	94283261	0.0031	0.84	0.70	1.03
rs549114	94306942	0.0087	0.85	0.98	1.00
rs1889405	94349998	0.0091	1.18	0.03	1.15
rs1931575	94305602	0.0098	1.18	0.39	1.06
rs3789411	94308134	0.012	0.86	0.95	1.00
rs4147837	94285730	0.016	1.19	0.78	1.02
rs1889404	94350011	0.018	1.16	0.06	1.13
rs3827712	94347759	0.018	0.87	0.11	0.91
rs4847196	94327041	0.019	1.16	0.12	1.11
rs2275035	94317748	0.021	1.15	0.09	1.11
rs4147812	94347631	0.022	0.88	0.13	0.92
rs4147825	94333526	0.022	1.14	0.18	1.08
rs4147811	94347644	0.022	0.88	0.13	0.91
rs4147828	94320477	0.023	1.17	0.14	1.11
rs4147816	94347368	0.024	0.88	0.13	0.92

---

rs3789433	94348028	0.025	1.15	0.11	1.11
rs2297636	94341410	0.025	1.14	0.18	1.09
rs3789432	94347896	0.025	0.88	0.13	0.92
rs481931	94342604	0.026	0.88	0.14	0.92
rs2297634	94349556	0.026	0.88	0.10	0.91
rs4147820	94334672	0.027	1.16	0.12	1.11
rs570926	94342806	0.029	0.88	0.14	0.92
rs3789435	94348948	0.029	0.89	0.10	0.91
rs2297671	94268841	0.031	0.89	0.13	0.92
rs4147814	94347503	0.032	0.89	0.10	0.91
rs4147823	94333860	0.036	1.14	0.14	1.10
rs3789421	94338165	0.036	1.16	0.15	1.11
rs1211213	94344008	0.038	0.88	0.14	0.92
rs3827713	94349112	0.038	0.89	0.11	0.91
rs2068334	94332303	0.040	1.15	0.19	1.10
rs4147815	94347396	0.045	1.14	0.20	1.09

## 7. DISCUSIÓN

---



## 7. DISCUSIÓN

---

Hemos demostrado que la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica invasiva, principal causa de muerte por infección en países desarrollados a través de sepsis y meningitis, tiene una base genética. Determinados polimorfismos genéticos contribuyen a explicar la razón por la que no todos somos igual de susceptibles a la infección por *N. meningitidis*, y por qué conduce a la enfermedad en tan sólo una pequeña proporción de aquellos a los que coloniza. La variabilidad genética en la vía alternativa del complemento, especialmente en el factor H, y el gen *ABCA4*, parecen modular la susceptibilidad del huésped a la enfermedad meningocócica. Además, ambas localizaciones genéticas están también implicadas en la susceptibilidad a la degeneración macular, lo que establece una relación inédita entre dos entidades hasta la fecha nunca relacionadas en la literatura.

### 7.1. Región *CFH* y susceptibilidad a enfermedad meningocócica

Comunicamos el primer GWAS de susceptibilidad a enfermedad meningocócica (UK-GWAS), y en él identificamos una fuerte evidencia de asociación en el factor H del complemento (*CFH*) y la proteína 3 relacionada con el factor H del complemento (*CFHR3*), localizados en el cromosoma 1. El estudio se llevó a cabo en una muestra de 475 pacientes de Reino Unido y 4703 controles. La replicación de este hallazgo en otras dos cohortes independientes europeas —del Oeste de Europa y de España— contribuye a consolidar la validez de la asociación encontrada. Dos variantes en el gen del factor H del complemento (*CFH*) mostraron una evidencia de asociación altamente significativa en todo el genoma: rs1065489 ( $P$ -valor =  $2.2 \times 10^{-11}$ ) y rs11582939 ( $P$ -valor =  $3.7 \times 10^{-10}$ ), así como también *CFHR3* (rs426736,  $P$ -valor =  $4.6 \times 10^{-13}$ ).

Este hallazgo se vio corroborado, además, en la segunda fase del estudio, en el que realizamos un segundo GWAS de susceptibilidad a enfermedad meningocócica (ESIGEM-Spain GWAS) en 419 pacientes y 967 controles españoles. A continuación llevamos a cabo un metaanálisis conjunto de ambos GWAS (el de Reino Unido y el de España), y una replicación de los principales polimorfismos en una tercera cohorte del

Oeste de Europa. Posteriormente realizamos un metaanálisis de los SNPs seleccionados de las tres poblaciones europeas tratando de buscar la variante causal por mapeo e imputación de la región asociada. El polimorfismo rs1065489, localizado en el gen *CFH*, fue nuevamente el locus que mostró la mayor evidencia de asociación con enfermedad meningocócica en las tres cohortes estudiadas, alcanzando un nivel de significación muy elevado ( $P$ -valor =  $1.18 \times 10^{-8}$ ).

CFH regula la vía alternativa del complemento y se sabe que es utilizado por *N. meningitidis* para escapar del control inmunológico del huésped<sup>239</sup>. Por tanto, la unión del CFH a *N. meningitidis* a través de su proteína de unión al factor H del complemento (fHbp, *factor H binding protein*) protegería a la bacteria del daño u opsonización mediados por el complemento, facilitando que la bacteria eluda la respuesta inmunológica innata del huésped (Figura 33).

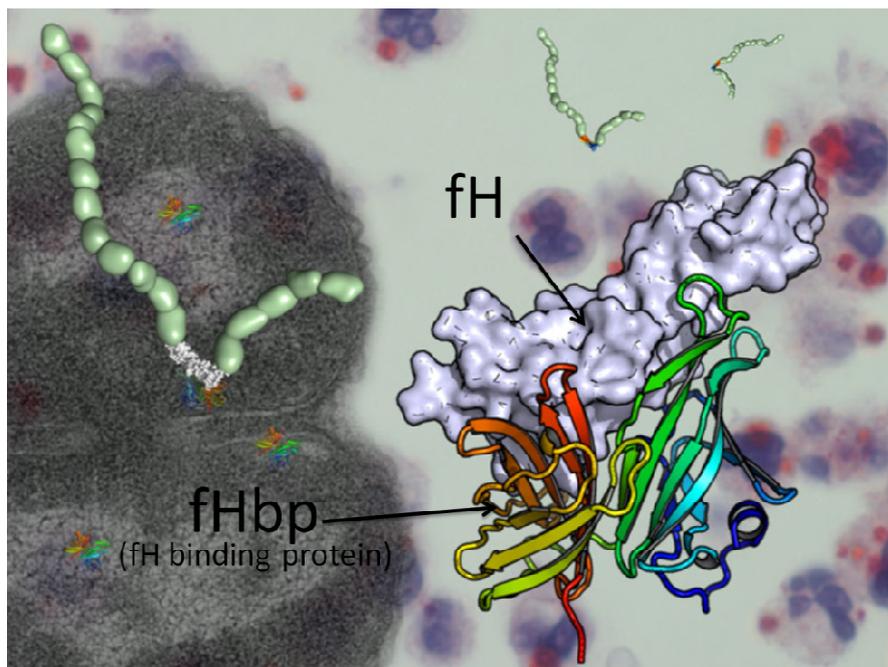
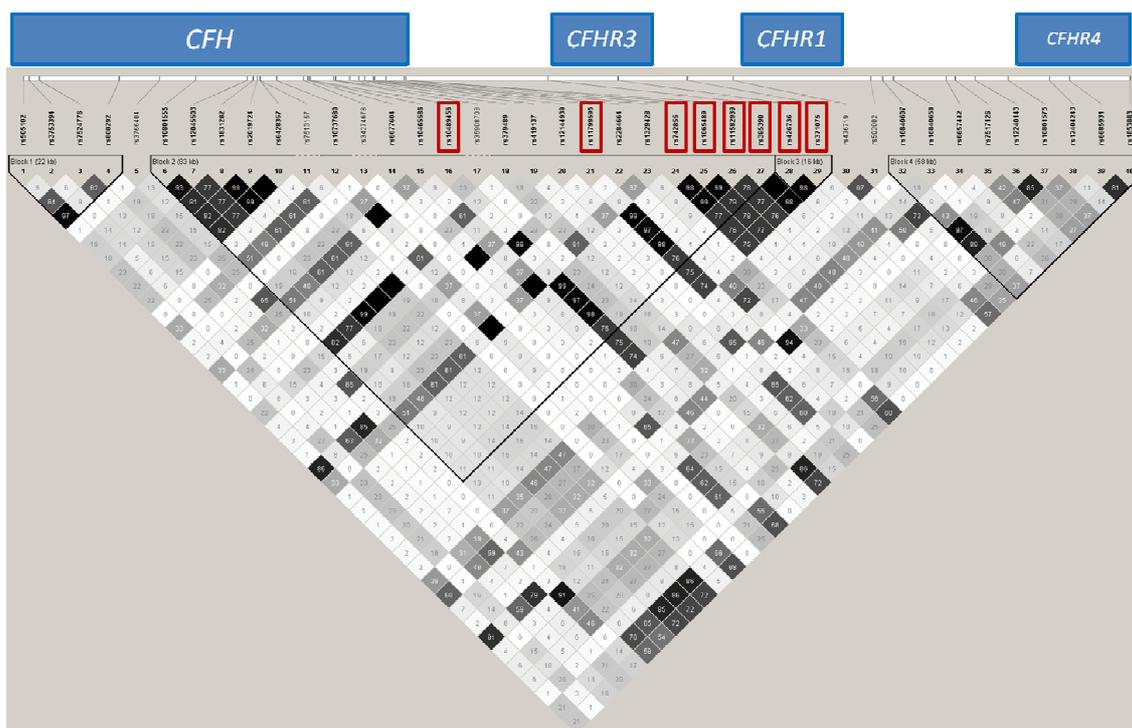


Fig. 33. *N. meningitidis* se une al CFH mediante su proteína de unión al factor H del complemento (fHbp), tratando de evadir la acción bactericida del complemento. Adaptado de *Schneider et al*<sup>240</sup>.

Estudios genéticos previos comunicaron que un polimorfismo de la region promotora, rs3753394, localizado a 88 kb en dirección 5', p.936D<E, estaba asociado con la susceptibilidad del huésped a la enfermedad meningocócica. Estos estudios también correlacionaron los niveles de proteína CFH con esta variante del promotor<sup>9</sup>. Sin embargo, aunque este SNP fue genotipado en el GWAS inicial, no alcanzó

significación estadística,  $P$ -valor = 0.08 (Tabla 13). El análisis de desequilibrio de ligamiento mostró que ambos polimorfismos pertenecen a diferentes bloques dentro del gen ( $r^2 = 0.4$ ) (Figura 34). Asimismo, no se pudieron apreciar evidencias que pudieran apuntar a posibles errores de genotipado.



**Figura 34.** Gráfico de desequilibrio de ligamiento del agrupamiento (cluster) *CFH* en el cromosoma 1. Los números dentro de los rombos indican el valor de  $r^2$ . Para aquellos SNPs sin ningún valor anotado,  $r^2 = 1$ . Los polimorfismos con un  $P$ -valor combinado significativo en los tres grupos de estudio, se muestran en cajas rojas. Seis de los ocho SNPs significativamente asociados estaban localizados en un bloque de alto desequilibrio de ligamiento ( $r^2 > 0.75$ ).

Una posible explicación para esta discrepancia en los resultados puede derivar de las diferencias propias de cada cepa de meningococo invasor<sup>9</sup>. La fHbp muestra variación de secuencia<sup>9</sup>, y un estudio previo mostró diferencias funcionales en el suero bactericida de meningococos de diferentes tipos de cápsulas. En este estudio previo el principal efecto del polimorfismo promotor y el aumento en la concentración plasmática de CFH, aconteció en las cepas del serogrupo C, mientras que sólo se observó un leve efecto en las cepas del serogrupo B. Sin embargo, este tipo de análisis de subgrupo reduce la potencia estadística, haciendo difícil la búsqueda de respuestas concluyentes. En el presente estudio tratamos de identificar efectos de susceptibilidad

que fuesen consistentes para todos los serogrupos, puesto que las cepas infecciosas difieren en las tres cohortes. La cohorte de Reino Unido fue reclutada entre 1995 y 2005, antes de la introducción de la vacuna frente al serogrupo C, cuando este serogrupo era el responsable de aproximadamente el 40% de los casos. Sin embargo, la cohorte española se estableció después de la introducción de la vacuna frente al serogrupo C, y por tanto el serogrupo B es probablemente el principal responsable de los casos. A pesar de estas diferencias, las tres cohortes han mostrado una asociación consistente con la región *CFH*, sugiriendo que esta asociación es independiente de la cepa.

CFHR3 se une a la heparina, y uno de sus papeles en la regulación del complemento podría ser competir con CFH para unirse con C3 (componente 3 del complemento). De modo similar *CFHR1* comparte homología de secuencia con *CFH*, y parece ser una variante truncada de *splicing* (*truncated splice variant*) del gen *CFH*<sup>239</sup>. Ambas proteínas, CFHR3 y CFHR1, puede que compitan con CFH para unirse a la fHbp del meningococo. rs16840658, un SNP en *CFHR1* que mostró una fuerte evidencia de asociación con enfermedad meningocócica tanto en el GWAS inicial como en la cohorte de replicación del Oeste de Europa, falló en el genotipado en la cohorte de replicación española. A pesar de esta inconsistencia entre poblaciones, no podemos excluir la posibilidad de que los tres genes contribuyan a la susceptibilidad o protección individual frente a la enfermedad meningocócica.

## 7.2. Una posible explicación para el "cinturón de la meningitis" africano

La región de la sabana africana que se extiende desde Etiopía (en el Este) a Senegal (en el Oeste) aglutina la mayor incidencia de EM en todo el mundo, pudiendo afectar, en determinadas epidemias, hasta al 1% de la población. Es por ello que a esta franja de territorio subsahariano, que abarca una población de unos 300 millones de habitantes, Lapeysonnie acuñó en 1963 como "cinturón de la meningitis"<sup>19</sup>.

La epidemia más grave de meningitis meningocócica que ha experimentado África hasta el momento fue la de 1996, causada por el serogrupo A, con más de 150.000 casos y 16.000 muertes registradas. Las condiciones climáticas de estos países parecen contribuir a la recurrencia anual de tales epidemias, sobre todo en relación con la llegada del *Harmattan*, el viento cálido y seco que preludia la llegada de la estación seca, a principios de año.

Dentro de *CFH* la asociación más significativa encontrada en nuestro estudio fue una sustitución no-sinónima, potencialmente funcional (rs1065489, p.936D<E) localizada en el exón 19, que alcanzó un *P*-valor (combinado) altamente significativo ( $2.2 \times 10^{-11}$ ) en las tres cohortes estudiadas (Tabla 12). Los portadores del alelo con frecuencia menor (T) tuvieron menos riesgo de enfermedad meningocócica, (OR = 0.64; IC al 95%: 0.56-0.73). Esto fue corroborado por un segundo polimorfismo, a una distancia de 397 pares de bases en dirección 5', que estaba en completo desequilibrio de ligamiento ( $r^2 = 1$ ) con D936E (rs11582939; *P*-valor combinado =  $3.7 \times 10^{-10}$ ). La frecuencia de este polimorfismo varía enormemente en las diferentes poblaciones de Hapmap<sup>234</sup>, y destaca el hecho de que las poblaciones subsaharianas son las que tienen la frecuencia más baja de este marcador. Parece que la incidencia de EM es inversamente proporcional a la frecuencia del alelo minoritario de este SNP, lo que podría contribuir a explicar la elevada incidencia de la enfermedad meningocócica en estos países.

### **7.3. Enfoque traslacional de la asociación *CFH* y la susceptibilidad a enfermedad meningocócica: nueva generación de vacunas frente a meningococo**

La introducción de vacunas conjugadas frente a meningococo C supuso una disminución drástica de la incidencia de la EM en los países desarrollados. Sin embargo el gran reto de la lucha frente a la enfermedad meningocócica en los últimos años se ha centrado principalmente en conseguir una vacuna efectiva frente al serogrupo B. La similitud antigénica del polisacárido capsular de este serogrupo con sacáridos del tejido neuronal humano y su baja inmunogenicidad han hecho que las nuevas estrategias vacunales tratasen de centrarse en antígenos no capsulares<sup>1,163</sup>. En el momento actual hay dos vacunas frente al meningococo B que han demostrado efectividad en ensayos vacunales, y que cuentan con la presencia de fHbp entre sus componentes antigénicos, lo que habla en favor del papel de esta lipoproteína en la interacción entre meningococo y huésped. Una de ellas es la vacuna **rLP2086** (de laboratorios Wyeth-Pfizer)<sup>174</sup>, compuesta por los 2 tipos de fHbp (A y B); la otra es la vacuna **4 CMenB** (de laboratorios Novartis)<sup>176-177</sup>, primer ejemplo de un desarrollo de vacunas exitoso mediante vacunología inversa. Para esta segunda vacuna, de entre los antígenos proteicos que demostraron capacidad para producir anticuerpos

bactericidas en suero, se escogieron los que inducían una protección más amplia, y fHbp fue uno de ellos, además de NadA, NHBA y PorA.

Nuestro hallazgo reafirma la importancia que el factor H del complemento tiene específicamente en la defensa de nuestro organismo frente a *N. meningitidis*. Por otro lado la microbiología molecular ha constatado la importancia que para *Neisseria* tiene la proteína ligadora de factor H (fHbp), que le permite actuar como un “caballo de Troya” y evadir las defensas de nuestro organismo. El hecho de que las nuevas generaciones de vacunas frente a meningococo incluyan en su composición específicamente un antígeno que estimule la respuesta neutralizante frente a fHbp, encaja en este nuevo marco biológico. El hallazgo, en nuestro estudio, de *CFH* como gen involucrado en la susceptibilidad a la EM es concordante con la eficacia demostrada por la nueva generación de vacunas antimeningocócicas. Los futuros estudios en marcha nos permitirán ver cuál es la repercusión funcional que las distintas variantes genéticas en *CFH* pueden condicionar a nivel de las diferentes proteínas del complemento, y a su vez, en qué pueden modificar la respuesta inmune a las vacunas.

#### 7.4. Región *CFH* y susceptibilidad a otras enfermedades

Dos enfermedades, la degeneración macular senil (DMS)<sup>236</sup> y el síndrome hemolítico urémico (SHU) atípico<sup>235</sup> han sido previamente asociados con *CFH*, *CFHR1* y *CFHR3*. El riesgo atribuible en la DMS ha sido estimado en torno al 31% para individuos portadores de la variante alélica p.402Y<H dentro de *CFH*<sup>241</sup>. Se ha comunicado que una delección, incluyendo el 3' final de *CFH*, y abarcando *CFHR3* y *CFHR1*, está asociada con protección frente a DMS (riesgo atribuible = -53.4%)<sup>236</sup> y un riesgo aumentado de desarrollar SHU atípico (riesgo atribuible = 58%)<sup>235</sup>. Para la enfermedad meningocócica, el alelo asociado a *CFH* (p.936D<E) confiere una reducción del riesgo de enfermedad muy similar al SNP asociado a *CFHR3* (riesgo atribuible = -37.5 y -34.3%, respectivamente). Aunque p.936D<E no está en la región delecionada, su elevado desequilibrio de ligamiento ( $r^2 = 0.75-0.99$ ) con SNPs dentro del área prevista de delección, indica una correlación muy elevada entre ellos.

Es sabido que la existencia de variaciones en el número de copias (*copy number variation*) de los genes *CFHR3* y *CFHR1* podría condicionar la concentración de las proteínas del suero<sup>235,242</sup>. Sin embargo, los factores de susceptibilidad a nivel de SNPs individuales tienen una alta probabilidad de variar entre DMS y enfermedad

meningocócica debido a los diferentes patrones de asociación que afectan a SNPs particulares en cada enfermedad (Tabla 20). Por ejemplo, SNPs en estrecho desequilibrio de ligamiento con la alteración funcional p.402Y<H (rs1061170;  $P$ -valor <  $10^{-10}$  y OR > 2 para DMS) mostraron evidencia de asociación muy nominal en este análisis GWAS y no se replicaron en las cohortes de seguimiento.

### 7.5. Región *ABCA4* y susceptibilidad a enfermedad meningocócica

Como *CFH* y *CFHR3* son también genes asociados con susceptibilidad para la degeneración macular senil (DMS)<sup>236</sup>, la asociación encontrada entre la región *CFH* y enfermedad meningocócica en la primera fase del estudio planteó la posibilidad de que *N. meningitidis* fuese un desencadenante oculto para la DMS, o de que ambas entidades compartiesen un mecanismo patogénico común<sup>243-244</sup>. La idea de proseguir con esta hipótesis fue lo que nos llevó a la realización de la segunda fase del estudio.

En esta segunda fase, el segundo locus que mostró mayor evidencia de asociación con enfermedad meningocócica, después de *CFH*, fue *ABCA4*. Hemos identificado polimorfismos frecuentes en *ABCA4* asociadas con susceptibilidad a enfermedad meningocócica en las tres cohortes europeas independientes (Reino Unido, España y el Oeste de Europa), lo que implica una posible conexión entre la infección por *N. meningitidis* y la degeneración macular. Ya en la primera fase del estudio *ABCA4* había aparecido asociado a EM, aunque con una significación menor que esta fase. *N. meningitidis* puede que actúe como desencadenante o factor acelerador de degeneración macular en estos pacientes susceptibles. De forma alternativa, puede que la mácula sea un lugar anatómico particularmente vulnerable con mínima resistencia a la activación del complemento en pacientes con esta condición genética, permitiendo una relación peculiar con *Neisseria*.

El gen *ABCA4* codifica una proteína que se expresa primariamente en la retina y pertenece a la familia de genes transportadores de cassette de unión a ATP (*ATP-binding cassette transporter genes*). La proteína *ABCA4* es producida en los fotorreceptores y activada siguiendo una foto-transducción<sup>245</sup>. Ahora se sabe que la proteína *ABCA4* es responsable de la eliminación de componentes potencialmente tóxicos para la retina (llamados N-retinilidene-PE) generados durante la fototransducción desde las células fotorreceptoras. Mutaciones patogénicas infrecuentes en *ABCA4* fueron identificadas como causantes de degeneración macular de inicio juvenil<sup>245-246</sup>. Aunque *ABCA4* se expresa predominantemente en la retina,

también lo hace en el cerebro y los plexos coroideos. Por ello, ABCA4 puede que juegue un papel en la función de la barrera hematoencefálica y que afecte a las condiciones del líquido cefalorraquídeo<sup>247-248</sup>. Esta observación sugiere el posible papel de ABCA4 en la patología del SNC, además del ojo, lo cual sería concordante con la asociación observada en la toxoplasmosis congénita con participación cerebral<sup>249</sup>.

Consideramos la posibilidad de que la asociación observada en ABCA4 podría ser dependiente del enriquecimiento del grupo de casos para los individuos susceptibles de DMS. El riesgo vital de degeneración macular juvenil (enfermedad de Stargardt) es muy bajo (1 de 10,000 individuos<sup>245</sup>). Para la DMS, el riesgo vital ha sido comunicado en torno al 10% en individuos de 75 o más años<sup>236</sup>, aumentando hasta tres veces en portadores de mutaciones CFH<sup>250</sup>. El riesgo vital para enfermedad meningocócica es muy bajo para cualquier individuo en toda Europa (<0.1%<sup>233</sup>) llevando a una tasa muy baja de falsos positivos entre los controles, con una mínima pérdida de potencia. Como ambas enfermedades son infrecuentes, la presencia concomitante de individuos susceptibles entre los niños con sepsis meningocócica es teóricamente baja (0.1% multiplicado por 10% multiplicado por 3 veces los portadores de mutaciones en CFH = 0.03% ó 3 en 10,000 pacientes con enfermedad meningocócica que también son portadores CFH). En esta línea, la observación entre ABCA4 rs544830 y la susceptibilidad para enfermedad meningocócica es poco probable que se deba a un factor de confusión por la presencia de individuos susceptibles de DMS portando el alelo de riesgo en CFH.

Ahora son necesarios estudios biológicos que nos permitan esclarecer la relación funcional precisa entre enfermedad meningocócica y DMS.

#### **7.6. *Neisseria meningitidis* como potencial agente desencadenante de la enfermedad de Stargardt y de la degeneración macular senil en pacientes susceptibles**

La conexión entre *N. meningitidis* y la enfermedad ocular ha sido previamente descrita, o bien con el ojo como primer objetivo de infección (por ejemplo en conjuntivitis, endoftalmitis...) o bien como la primera manifestación de enfermedad meningocócica invasiva<sup>251-252</sup>. Variaciones genéticas tanto en CFH como en ABCA4 han sido implicadas en la degeneración macular. Existen mutaciones patógenas conocidas localizadas en el gen ABCA4 que causan la enfermedad de Stargardt<sup>245-246</sup>, una

degeneración macular de inicio en la juventud, así como también se conocen variantes en *CFH* que están asociadas con la DMS<sup>253</sup>. Nuestros hallazgos se unen a la creciente línea de evidencia que relaciona la enfermedad meningocócica con la degeneración macular. Sin embargo, los mecanismos por los que los genes de las regiones *ABCA4* y *CFH* están asociados con la DMS y la enfermedad meningocócica son aún desconocidos, puesto que las proteínas que codifican no tienen interacciones funcionales conocidas. Cabe destacar que estudios GWAS a larga escala en DMS no detectaron evidencia de asociación que sobrepasase  $P$ -valor  $< 10^{-5}$  en *ABCA4*<sup>250</sup>. Una explicación podría ser que son mutaciones realmente infrecuentes en *ABCA4*, y no variantes comunes, las que están asociadas con riesgo incrementado de DMS, tal y como fue previamente mostrado<sup>254</sup>. Debido a esta diferencia en la arquitectura genética, fuimos incapaces de presentar una clara comparación de los alelos de susceptibilidad de *ABCA4* y la dirección de efecto de asociación (OR) para DMS y enfermedad meningocócica. Futuros trabajos deben ahora resecuenciar *ABCA4* en las muestras de enfermedad meningocócica para evaluar si las mutaciones dañinas e infrecuentes son causa de enfermedad meningocócica, tal y como fue recientemente mostrado en *MTNRB1* para la diabetes tipo 2<sup>255</sup>.

Nuestros datos permiten considerar a *N. meningitidis* como un agente potencialmente desencadenante de la enfermedad de Stargardt o de la DMS en pacientes susceptibles. Existen evidencias indirectas como las de la participación de un agente infeccioso (*Chlamydia pneumoniae*) en la patogénesis de la DMS y modelos murinos. *C. pneumoniae* ha sido encontrada en membranas neovasculares de pacientes con DMS<sup>256</sup> y se han relacionado los anticuerpos séricos anti-*C. pneumoniae* con un riesgo incrementado para la progresión de la DMS<sup>257</sup>.

Sin embargo, no se encontraron asociaciones consistentes entre la infección por *Chlamydia*, el genotipo *CFH* y la DMS<sup>258-259</sup>. Tanto *C. pneumoniae* como *N. meningitidis* son potentes activadores de la vía alternativa del complemento y de la sobre-activación del complemento, que son clave en la patogénesis de la DMS. Todavía no está claro si esta interacción es sinérgica o aditiva.

Como ambas bacterias son activadoras de la vía alternativa del complemento<sup>260</sup>, es posible que una vez estimulada esta vía, se desencadene su acción en pacientes con la variante de riesgo *CFH*, llevando a la patogénesis de la DMS. Considerando su capacidad de estimular la vía alternativa del complemento, nuestra hipótesis es que la *N. meningitis* nasofaríngea -o eventualmente ocular- portadora, puede que induzca

una inflamación de bajo grado capaz de desencadenar la patogénesis de la DMS en pacientes susceptibles.

De forma notable, en contraste con la hipótesis de *C. pneumoniae*, tanto la infección por *N. meningitidis* como la DMS comparten vías genéticas comunes de enfermedad. Son necesarios más estudios para contribuir a determinar si existe conexión entre el estado de portador o la infección por *N. meningitidis* y la patogénesis de la DMS.

Otra evidencia sobre los mecanismos comunes entre enfermedad meningocócica y DMS procede de la observación de que los fumadores, tanto activos como pasivos, están relacionados con ambas entidades<sup>261-262</sup>.

Además, ha sido demostrado en ratones que en la enfermedad de Stargardt recesiva (*ABCA4*<sup>-/-</sup>) puede haber una disregulación del complemento que lleve a una inflamación crónica de las células retinianas pigmentarias<sup>263</sup>. Las variantes *CFH* se ha visto que están asociadas en gran medida con enfermedades autoinmunes e inflamatorias como la nefropatía IgA<sup>264</sup>, el síndrome hemolítico-urémico<sup>265</sup>, y el lupus eritematoso sistémico<sup>266</sup>, todas ellas enfermedades en las que existe evidencia epidemiológica de un desencadenante infeccioso. Esta evidencia señala que la enfermedad meningocócica, la DMS y la enfermedad de Stargardt comparten locus comunes de susceptibilidad, y sugiere la existencia de una vía común en su patología.

### **7.7. Acceso de *Neisseria meningitidis* al ojo**

Más allá de la potencial conexión anatómica entre la garganta y el ojo a través de la fosa nasal, puede que haya otros mecanismos implicados. Ahora se sabe que la colonización por especies *Neisseria* resulta en su localización intracelular<sup>267</sup> facilitando la propagación de las bacterias desde la garganta a nuevos lugares de colonización y la migración a través del epitelio, un prerrequisito para la diseminación y la enfermedad invasiva. Un posible mecanismo para esto ha sido recientemente descrito, y consiste en un proceso de desprendimiento regulado, basado principalmente en modificaciones post-transcripcionales en los *pili* tipo IV<sup>268</sup>. Estas organelas filamentosas permiten la formación de agregados bacterianos asociados con las células huésped, y a través de modificaciones post-transcripcionales consistentes en la adición de fosfoglicerol a los *pili*, esta propiedad se pierde y algunas bacterias se separan de la colonia<sup>268</sup>. Éste parece ser el proceso que explica la diseminación sanguínea, pero

puede que también esté implicado en la migración cerebral o, eventualmente, en la migración de *N. meningitidis* de la garganta al ojo.

### 7.8. Enfermedad meningocócica y otras asociaciones genéticas

Nuestro estudio no detectó otras asociaciones genéticas comunicadas previamente en relación con la enfermedad meningocócica<sup>4,7,8,10</sup>. Una posible explicación podría estar relacionada con la metodología del GWAS, que puede que no fuese capaz de capturar estas variantes reportadas previamente. Una segunda explicación podría ser que muchos de los estudios previos usaron tamaños muestrales más pequeños que el presente, lo que podría limitar su potencia estadística para detectar verdaderas asociaciones.

### 7.9. Limitaciones del estudio

Nuestro trabajo tiene una serie de limitaciones que debemos reseñar.

Se trata de un trabajo multicéntrico en el que han colaborado hospitales con atención pediátrica de Reino Unido, España y el Oeste de Europa, lo que ha permitido reunir la mayor cohorte de pacientes con enfermedad meningocócica estudiada hasta el momento a nivel internacional. No obstante esto implica la intervención de diferentes especialistas (personal técnico, médico, genetistas, bioinformáticos, matemáticos, etc), laboratorios de análisis y genotipado. La falta de unificación en la metodología aplicada, podría añadir "ruido" o factores de confusión a nuestros resultados. Debemos tener presente que las técnicas de genotipado y los procesos de manejo de datos no están exentos de posibles errores. El genotipado erróneo de un SNP por parte de un laboratorio podría generar una asociación estadística espuria<sup>186</sup>.

Por otra parte, la estratificación poblacional es probablemente uno de los principales problemas a los que se enfrentan los estudios de asociación. Si los casos y controles no pertenecen al mismo grupo poblacional, sus características genéticas son diferentes y puede que lleven a falsas asociaciones con la enfermedad a estudio. Aun cuando los casos y controles proceden teóricamente del mismo grupo poblacional, como en nuestro caso, es difícil conseguir que esa población escogida sea genéticamente "homogénea". Existen herramientas bioinformáticas y estadísticas que tratan de detectar este problema *a posteriori*, como el análisis de componentes principales, aplicado en ambas fases de nuestro estudio. Este análisis trata de

identificar perfiles genéticos diferentes a los esperados de acuerdo al grupo poblacional al que supuestamente pertenecen (*population outliers*). En este sentido la cohorte procedente de España mostró un ligero grado de estratificación poblacional (Figura 26). Por otra parte, en la cohorte de replicación del Oeste de Europa, al no poseer ADN suficiente para el genotipado de sus controles, no fue posible corregir formalmente la estratificación de poblaciones. No obstante, estratificamos el análisis de asociación por países y nos encontramos con OR homogéneas y constantes en todos los lugares de forma individual (Tabla 20), lo que sugería que los hallazgos de la replicación eran sólidos, y no debidos a estratificación de poblaciones.

Asimismo la epidemiología de la enfermedad meningocócica es dinámica e impredecible. El reclutamiento de casos y controles en diferentes países y en distintos años, hace que la proporción de cepas infecciosas difieran en las tres cohortes de estudio en ambas fases. Por ejemplo, la introducción de la vacunación frente al serogrupo C condicionó importantes cambios en los cepas predominantes en los países implicados. En este sentido la cohorte de Reino Unido fue reclutada antes de la introducción de esta vacunación sistemática, y sin embargo la cohorte española ya se encontraba bajo su influencia, lo que hace que la proporción de serogrupos predominantes en una y otra sean muy diferentes. Cabe destacar, sin embargo, que a pesar de estas diferencias, las tres cohortes han mostrado una asociación consistente con la región *CFH*, sugiriendo que esta asociación es independiente de la cepa causal.

Hasta la fecha aún no hemos realizado estudios funcionales que puedan ayudar a entender los hallazgos del presente proyecto, y son pocos los estudios publicados en relación con la expresión de *CFH*<sup>269-270</sup>. Esto parece ser especialmente importante con respecto al gen *ABCA4* y a la conexión que pudiera existir entre *N. meningitidis* y la retina: la bacteria como desencadenante o acelerador de DMS en sujetos susceptibles, y/o la mácula como puerta de entrada para la infección con poca resistencia a la activación del complemento. En esta línea cabe mencionar los estudios relacionados con los análisis de expresión, que hoy en día se pueden abordar usando técnicas de secuenciación de última generación, conocidas como *next generation sequencing* o NGS<sup>271-272</sup>, y en el contexto de los estudios de expresión, como RNAseq. Actualmente el grupo ha iniciado ya estudios de expresión en esta dirección.

### 7.10. Perspectivas futuras

Nuestro trabajo de investigación ha logrado un avance importante en el conocimiento de la enfermedad meningocócica describiendo las bases genéticas de la susceptibilidad a presentarla. Sin embargo éste es sólo el principio; es necesario profundizar en los aspectos funcionales de estos hallazgos y tratar de trasladarlos a la esfera clínica, de manera que puedan condicionar la prevención, el tratamiento o el pronóstico de estos pacientes. Dicho de otro modo, éste ha sido el punto de partida de futuras investigaciones que ayudarán a entender la compleja interacción entre la bacteria, el medioambiente y el huésped, inicialmente centrado en la enfermedad meningocócica, pero seguramente extrapolable a otros modelos de enfermedad bacteriana grave. Es indudable que la adición de estudios más funcionales al proyecto (*pathways*, proteómica, ARNm, e interacción génica) podría revolucionar aún más el conocimiento de la patogenia y la fisiopatología de la enfermedad meningocócica, además de complementar los aspectos genómicos de la investigación, con la identificación de nuevas dianas terapéuticas y preventivas.

Dentro del grupo de investigación, y también en colaboración con otros grupos de los consorcios internacionales (ESIGEM, EUCLIDS), se están desarrollando ya varias líneas de investigación que dan continuidad al presente proyecto. Por un lado, se están desarrollando estudios basados en la tecnología NGS (*Next Generation Sequencing*) para caracterizar fenotipos extremos en la enfermedad meningocócica, así como también en otras entidades patológicas. Dentro de los proyectos de secuenciación de ADN, también se está llevando a cabo la caracterización fina de los genes implicados en la enfermedad meningocócica. Por ejemplo, el estudio del gen *ABCA4* es particularmente importante, no sólo en pacientes con enfermedad meningocócica sino también en el estudio comparativo con otras patologías del ojo, en donde este gen parece jugar un papel fundamental (degeneración macular senil, enfermedad de Stargard, etc).

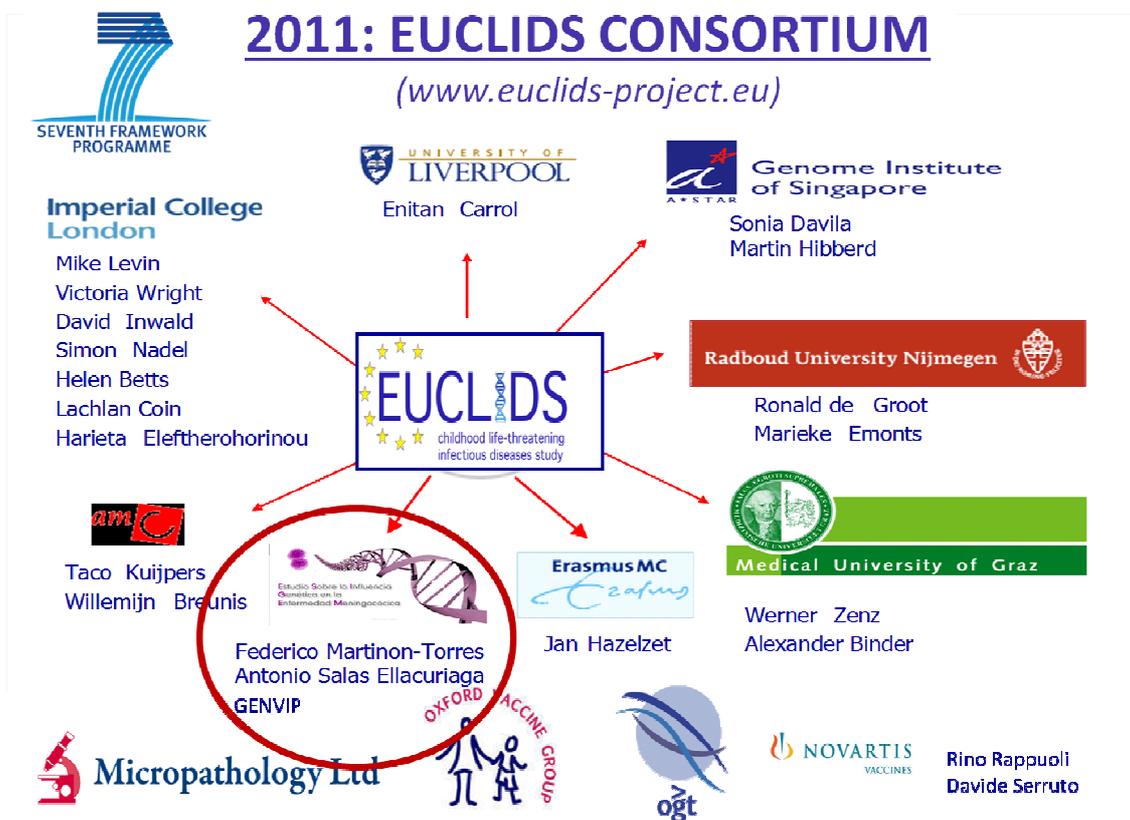
Se están desarrollando también líneas encaminadas al conocimiento de los patrones de expresión usando tecnología de ultra-secuenciación, en concreto RNAseq. La secuenciación masiva de RNA es hoy en día una de las herramientas más valiosas para la evaluación funcional de las enfermedades complejas. Así, la tecnología NGS de secuenciación del transcriptoma está actualmente sustituyendo a la de *microarrays* como método de elección para cuantificar y perfilar los niveles de expresión génica. Además RNAseq permite también detectar variantes de *splicing*

alternativo, transcritos raros y precursores de miRNA. Es probable que este tipo de aproximación permita clasificar a los pacientes en relación a su clínica, así como un mejor diagnóstico y un tratamiento individualizado.

A pesar de que existen ya algunas herramientas y técnicas bioinformáticas y estadísticas para el tratamiento de los datos (pre-procesamiento, alineamiento, análisis cuantitativo, expresión diferencial, etc) es necesario hacer un esfuerzo importante en el grupo en relación al desarrollo de nuevas aproximaciones metodológicas y analíticas que permitan resolver las múltiples cuestiones que se van planteando en relación al estudio de la enfermedad meningocócica y el proyecto concreto que se está desarrollando.

### Metodología de trabajo prevista: Consorcio EUCLIDS

A finales de 2011 a este consorcio internacional se le unieron otras instituciones y empresas con el fin de desarrollar un proyecto aunador denominado EUCLIDS (*European Childhood Life Threatening Diseases Study*), proyecto a 5 años con el objetivo de estudiar las bases genéticas de la enfermedad bacteriana grave en el niño



Creemos que estas conexiones sinérgicas son las que posibilitan el avance de la ciencia en el conocimiento de enfermedades como la enfermedad meningocócica invasiva. Permiten reclutar mayores cohortes de pacientes que se ajusten a los criterios de inclusión, posibilitando la replicación de los hallazgos de cada estudio en poblaciones independientes, lo que contribuye a consolidar la validez de los resultados.

La misión de este consorcio es explicar desde una perspectiva genómica con estudios a gran escala, qué genes y qué caminos biológicos determinan la susceptibilidad y gravedad en enfermedades infecciosas bacterianas amenazantes para la vida en la infancia. Para ello, se utilizará como prototipo, cómo no, la enfermedad meningocócica. Aplicaremos esta misma estrategia a la enfermedad por neumococo, estafilococo, streptocococo y salmonella, responsables junto con el meningococo, de una de cada cuatro muertes infantiles.



## **8. CONCLUSIONES**

---



## 8. CONCLUSIONES

---

1. Existen factores genéticos que condicionan la mayor o menor susceptibilidad a la enfermedad meningocócica invasiva.
2. La región del factor H del complemento (*CFH*) y la proteína 3 relacionada con el factor H del complemento (*CFHR3*) son los locus que han demostrado la mayor evidencia de asociación con la enfermedad *meningocócica*. Los SNPs rs1065489 (en *CFH*) y rs426736 (en *CFHR3*) se comportan como factores protectores. *CFH* es un factor que regula la vía alternativa del complemento; *N. meningitidis* se une a él a través de su proteína de unión al factor H del complemento (fHbp) y consigue evadir la respuesta inmunológica innata del huésped. *CFHR3* es otro factor regulador del complemento, que comparte homología con *CFH* y parece competir con él en su unión al fHbp.
3. La asociación entre *CFH* y la enfermedad meningocócica ha sido corroborada de forma contundente en tres cohortes independientes de casos y controles así como en un metaanálisis conjunto de las tres poblaciones, tanto en la primera como en la segunda fase del estudio, lo que permite consolidar la validez de nuestros hallazgos.
4. El polimorfismo rs1065489, localizado en la región *CFH*, podría ayudar a explicar la elevada incidencia de enfermedad meningocócica en el “cinturón de la meningitis” africano. Así por ejemplo, en la población Yoruba (Ibadan, Nigeria) analizada dentro del proyecto genómico internacional Hapmap, este polimorfismo presenta la frecuencia más baja, y en general se observa una relación inversa entre la frecuencia del alelo minoritario de este marcador y la incidencia de enfermedad meningocócica.
5. La implicación de *CFH* en la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica puede contribuir a explicar la idoneidad de las nuevas vacunas frente a

meningococo B, que contienen en su composición la proteína de unión al factor H del complemento (fHbp).

6. Después de la región *CFH*, el locus *ABCA4* es el que ha demostrado mayor evidencia de asociación con la enfermedad meningocócica de forma independiente en las tres cohortes estudiadas y en el metaanálisis conjunto. El SNP rs544830 (en *ABCA4*) se comporta como factor de predisposición. *ABCA4* se expresa predominantemente en la retina, pero también en el cerebro y los plexos coroideos, pudiendo estar involucrada en la función de la barrera hematoencefálica.
7. La asociación encontrada entre los genes *CFH* y *ABCA4* y la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica, plantea un nexo genético común entre dos enfermedades hasta ahora no relacionadas, como son la enfermedad meningocócica y la degeneración macular senil. *N. meningitidis* puede que actúe como desencadenante o factor acelerador de degeneración macular en estos pacientes susceptibles. De forma alternativa, puede que la mácula sea un lugar anatómico particularmente vulnerable con mínima resistencia a la activación del complemento en pacientes con esta condición genética, permitiendo una relación peculiar con *Neisseria*.

## **9. BIBLIOGRAFÍA**

---



## 9. BIBLIOGRAFÍA

---

1. Rosenstein N, Perkins B, Stephens D, Popovic T, Hughes J. Meningococcal Disease. *N Engl J Med*. 2001;344(18):1378-88.
2. Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, Harrison LH, Jelfs J, Ladhani SN, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2012;30(Suppl2):B26-36.
3. Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Global epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2009;27(Suppl2):B51-63.
4. Mathew S, Overturf GD. Complement and properdin deficiencies in meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25(3):255-6.
5. Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med*. 1996;335(26):1941-9.
6. Wright V, Hibberd M, Levin M. Genetic polymorphisms in host response to meningococcal infection: the role of susceptibility and severity genes. *Vaccine*. 2009;27(Suppl2):B90-102.
7. Smirnova, Mann N, Dols A, Derkx HH, Hibberd ML, Levin M, et al. Assay of locus-specific genetic load implicates rare Toll-like receptor 4 mutations in meningococcal susceptibility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(10):6075-80.

8. Hibberd ML, Sumiya M, Summerfield JA, Booy R, Levin M. Association of variants of the gene for mannose-binding lectin with susceptibility to meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet*. 1999;353(9158):1049-53.
9. Haralambous E, Dolly SO, Hibberd ML, Litt DJ, Udalova IA, O'dwyer C, et al. Factor H, a regulator of complement activity, is a major determinant of meningococcal disease susceptibility in UK Caucasian patients. *Scand J Infect Dis*. 2006;38(9):764-71.
10. Haralambous E, Hibberd ML, Hermans PW, Ninis N, Nadel S, Levin M. Role of functional plasminogen-activator-inhibitor-1 4G/5G promoter polymorphism in susceptibility, severity, and outcome of meningococcal disease in Caucasian children. *Crit Care Med*. 2003;31(12):2788-93.
11. Salas A, Fachal L, Marcos-Alonso S, Vega A, Martinon-Torres F; grupo de investigación ESIGEM. Investigating the role of mitochondrial haplogroups in genetic predisposition to meningococcal disease. *PLoS One*. 2009; 4(12):e8347.
12. Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre el Manejo de la Enfermedad Meningocócica Invasiva. Guía de Práctica Clínica sobre el Manejo de la Enfermedad Meningocócica Invasiva. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud; 2013. Guías de Práctica Clínica en el SNS: IACS Nº 2011/01.
13. Vieusseaux M. Memoire sur la maladie qui a regne a Geneve au printemps de 1805. *J Med Chir Pharmacol*. 1805;11:163-5.
14. Wheichselbaum A. Ueber die Aetiologie der Akuten Meningitis Cerebro-spinalis. *Fortschr Med*. 1887;5:573-83.
15. Anta Carabias L. Aportaciones microbiológicas a la valoración de antimicrobianos e inmunización frente a *Neisseria meningitidis*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid; 2001.
16. Uiterwijk A, Koehler PJ. A history of acute bacterial meningitis. *J Hist Neurosci*. 2012;21:293-313.

17. Tyler KL. History of bacterial meningitis. Chapter 28. *Handb Clin Neurol*. 2010;95:417-33.
18. Vipond C, Care R, Feavers IM. History of meningococcal vaccines and their serological correlates of protection. *Vaccine*. 2012;30(Suppl 2):B10-7.
19. Lapeyssonnie L. La méningite cérébro-spinale en Afrique. *Bull World Health Organ*. 1963;28(Suppl):3-114
20. Vyse A, Wolter JM, Chen J, Ng T, Soriano-Gabarro M. Meningococcal disease in Asia: an under-recognised public health burden. *Epidemiol Infect*. 2011;139:967-85.
21. Australian Meningococcal Surveillance Programme. Annual report of the Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2009. *Commun Dis Intell*. 2010;34(3):291-302.
22. Australian Government Department of Health and Ageing. Communicable Diseases Surveillance: National Notifiable Diseases Surveillance System. *Commun Dis Intell*. 2010;34(3):214-6.
23. Patel MS, Merianos A, Hanna JN, Vartto K, Tait P, Morey F, et al. Epidemic meningococcal meningitis in central Australia, 1987-1991. *Med J Aust*. 1993;158:336-40.
24. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance (ABCs) report, Emerging Infections Program Network, *Neisseria meningitidis*, 2009. Available at: <<http://www.cdc.gov/abcs/reportsfindings/survreports/mening09.pdf>>
25. Cohn AC, MacNeil JR, Harrison LH, Hatcher C, Theodore J, Schmidt M, et al. Changes in *Neisseria meningitidis* disease epidemiology in the United States, 1998-2007: implications for prevention of meningococcal disease. *Clin Infect Dis* 2010;50(2):184-91.

- 
26. Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. España. Año 2010. Boletín Epidemiológico Semanal. 2011;19:100-16.
27. Grupo de Trabajo MenB. Vacuna frente a enfermedad meningocócica invasora por serogrupo B y su posible utilización en salud pública. Ponencia de Programas y Registro de Vacunaciones. Comisión de Salud Pública del Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013.
28. Gil-Prieto R, Garcia-Garcia L, Alvaro-Meca A, et al. The burden of hospitalizations for meningococcal infection in Spain (1997-2008). *Vaccine*. 2011;29:5765-70.
29. Grupo de trabajo de enfermedad meningocócica de la ponencia de programa y registro de vacunación. Situación actual de la enfermedad meningocócica en España. Modificación de la pauta de vacunación frente meningitis C. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.
30. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of invasive bacterial diseases in Europe 2008/2009. Surveillance reports. Disponible en:[http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1107 SUR IBD 2008-09.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1107_SUR_IBD_2008-09.pdf)10.
31. Schwartz B, Moore PS, Broome CV. Global epidemiology of meningococcal disease. *Clin Microbiol Rev*. 1989;2 Suppl:S118-24.
32. Al-Tawfiq JA, Clark TA, Memish ZA. Meningococcal disease: The organism, clinical presentation, and worldwide epidemiology. *J Travel Med*. 2010;17 Suppl:3-8.
33. Stephens DS. Conquering the Meningococcus. *FEMS Microbiology Reviews* 2007;31:3-14.
34. Stephens DS, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococcaemia, and Neisseria meningitidis. *Lancet* 2007;369(9580):2196-210.

- 
35. Uria MJ, Zhang Q, Li Y, Chan A, Exley RM, Gollan B, et al. A generic mechanism in *Neisseria meningitidis* for enhanced resistance against bactericidal antibodies. *J Exp Med*. 2008;205:1423-34.
36. Varki A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J*. 1997;11:248-55.
37. Diaz Romero J, Outschoorn IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(4):559-75.
38. *Neisseria* y bacterias relacionadas. En: Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editores. *Microbiología médica*. 6ª ed. Barcelona: Elsevier España;2009. p. 291-300.
39. Kallstrom H, Blackmer Gill D, Albiger B, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Attachment of *Neisseria gonorrhoeae* to the cellular pilus receptor CD46: identification of domains important for bacterial adherence. *Cell Microbiol*. 2001;3:133-43.
40. Merz AJ, So M, Sheetz MP. Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature*. 2000;407:98-102.
41. Roupael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: biology, microbiology, and epidemiology. *Methods Mol Biol*. 2012;799:1-20.
42. Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol*. 2004;53:821-32.
43. Fisiopatología de la enfermedad meningocócica. Aramburo Caragol A, Martín-Torres N, Zenz W, Hazelzet JA, Martín-Torres F. Capítulo en: Moraga-Llop FA, editor. *La enfermedad meningocócica. Pasado, presente y futuro*. Sant Hilari Sacalm (Girona): Grafiques Montseny; 2013, pp 85-101
44. Trivedi K, Tang CM, Exley RM. Mechanisms of meningococcal colonisation. *Trends Microbiol*. 2011;19:456-63.

- 
45. Carbonnelle E, Hill DJ, Morand P, Griffiths NJ, Bourdoulous S, Murillo I, et al. Meningococcal interactions with the host. *Vaccine*. 2009;27(Suppl 2):B78-89.
46. Jordan PW, Saunders NJ. Host iron binding proteins acting as niche indicators for *Neisseria meningitidis*. *PLoS One*. 2009;4:e5198.
47. Pace DP, A. J. Meningococcal disease: clinical presentation and sequelae. *Vaccine*. 2012 May 30;30 Suppl 2:B3-9.
48. Blackwell CC, Tzanakaki G, Kremastinou J, Weir DM, Vakalis N, Elton RA, et al. Factors affecting carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek military recruits. *Epidemiol Infect*. 1992 Jun;108(3):441-8.
49. Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med*. 1969;129(6):1307-26.
50. de Greeff SC, de Melker HE, Schouls LM, Spanjaard L, van Deuren M. Pre-admission clinical course of meningococcal disease and opportunities for the earlier start of appropriate intervention: a prospective epidemiological study on 752 patients in the Netherlands, 2003-2005. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008;27(10):985-92.
51. Brouwer MC, Spanjaard L, Prins JM, van der Ley P, van de Beek D, van der Ende A. Association of chronic meningococemia with infection by meningococci with underacylated lipopolysaccharide. *J Infect*. 2011;62(6):479-83.
52. Tinsley C, Nassif X. Meningococcal pathogenesis: at the boundary between the pre- and post-genomic eras. *Curr Opin in Microbiology* 2001;4:47-52.
53. Meningococcal vaccines: WHO position paper, November 2011. *WHO Weekly epidemiological record*. 2011;86(47):521-40.
54. Marcos Alonso S. Estudio sobre las características clínicas y la influencia genética en la susceptibilidad a la enfermedad meningocócica. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, 2011.

- 
55. Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol.* 2006;24(1):7-19.
56. Gilsdorf DGaJ. *Neisseria meningitidis (meningococcus)*. In: Robert M. Kliegman BS, Joseph St. Geme and Nina F Schor editor. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 19th ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier; 2011. p. 929-37.
57. Young LS, LaForce FM, Head JJ, Feeley JC, Bennet JV. A simultaneous outbreak of meningococcal and influenza infections. *N Engl J Med.* 1972;287(1):5-9.
58. Moore P, Hierholzer J, DeWitt W, Gouan K, Djoré D, Lippeveld P, et al. Respiratory viruses and mycoplasma as cofactors for epidemic group A meningococcal meningitidis. *JAMA.* 1990;264(10):1271-5.
59. Cartwright KA, Jones DM, Smith AJ, Stuart JM, Kaczmarek EB, Palmer SR. Influenza A and meningococcal disease. *Lancet.* 1991;338(8766):554-7.
60. Dunlop KA, Coyle PV, Jackson P, Patterson CC, Shields MD. Respiratory viruses do not trigger meningococcal disease in children. *J Infect.* 2006;54(5):454-8.
61. Kvalsvig A, Unsworth D. The immunopathogenesis of meningococcal disease. *J Clin Pathol.* 2003;56(6):417-22.
62. Schneider MC, Exley RM, Ram S, Sim RB, Tang CM. Interactions between *Neisseria meningitidis* and the complement system. *Trends Microbiol.* 2007;15(5):233-40.
63. Kleijn E, Hazelzet J, Kornelisse R, de Groot R. Pathophysiology of meningococcal sepsis in children. *Eur J Pediatr.* 1998;157(11):869-80.
64. Thompson M, Connor S, Ward N, Molyneux D. Impact of Climate Variability on Infectious Disease in West Africa. *EcoHealth Journal Consortium.* 2004;1:138-50.

- 
65. Molesworth AM, Cuevas LE, Connor SJ, Morse AP, Thompson MC. Environmental risk and meningitis epidemics in Africa. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(10):1287-92.
66. Baines PB, Hart CA. Severe meningococcal disease in childhood. *Br J Anaesth.* 2003;90(1):72-83.
67. Brandtzaeg P, Ovsteboo R, Kierulf P. Compartmentalization of lipopolysaccharide production correlates with clinical presentation in meningococcal disease. *J Infect Dis.* 1992;166(3):650-2.
68. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. *Lancet.* 1997;349(9046):170-3.
69. Hackett SJ, Thomson AP, Hart CA. Cytokines, chemokines and other effector molecules involved in meningococcal disease. *J Med Microbiol.* 2001;50(10):847-59.
70. Hazelzet JA, Kornelisse RF, van der Pouw Kraan TC, Joosten KF, van der Voort E, van Mierlo G, et al. Interleukin 12 levels during the initial phase of septic shock with purpura in children: relation to severity of disease. *Cytokine.* 1997;9(9):711-6.
71. Densen P. Complement deficiencies and meningococcal disease. *Clin Exp Immunol.* 1991;86 Suppl 1:57-62.
72. Hack CE, Ogilvie AC, Eisele B, Eerenberg AJ, Wagstaff J, Thijs LG. C1-inhibitor substitution therapy in septic shock and in the vascular leak syndrome induced by high doses of interleukin-2. *Intensive Care Med.* 1993;19 Suppl 1:S19-28.
73. Brandtzaeg P, Hogasen K, Kierulf P, Mollnes TE. The excessive complement activation in fulminant meningococcal septicemia is predominantly caused by alternative pathway activation. *J Infect Dis.* 1996;173(3):647-55.
74. Ricklin B, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007;25(11):1265-75.

75. Hazelzet JA, de Groot R, van Mierlo G, Joosten KF, van der Voort E, Eerenberg A, et al. Complement activation in relation to capillary leakage in children with septic shock and purpura. *Infect Immun*. 1998;66(11):5350-6.
76. Churchwell KB, McManus ML, Kent P, Gorlin J, Galacki D, Humphreys D, et al. Intensive blood and plasma exchange for treatment of coagulopathy in meningococemia. *J Clin Apher*. 1995;10(4):171-7.
77. Brandtzaeg P, Joo GB, Brusletto B, Kierulf P. Plasminogen activator inhibitor 1 and 2, alpha-2-antiplasmin, plasminogen, and endotoxin levels in systemic meningococcal disease. *Thromb Res*. 1990;57(2):271-8.
78. de Kleijn ED, de Groot R, Hack CE, Mulder PG, Engl W, Moritz B, et al. Activation of protein C following infusion of protein C concentrate in children with severe meningococcal sepsis and purpura fulminans: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, dose-finding study. *Crit Care Med*. 2003;31(6):1839-47.
79. Hermans PW, Hibberd ML, Booy R, Daramola O, Hazelzet JA, de Groot R, et al. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene and outcome of meningococcal disease. Meningococcal Research Group. *Lancet*. 1999;354(9178):556-60.
80. Geishofer G, Binder A, Muller M, Zohrer B, Resch B, Muller W, et al. 4G/5G promoter polymorphism in the plasminogen-activator-inhibitor-1 gene in children with systemic meningococcaemia. *Eur J Pediatr*. 2005;164(8):486-90.
81. Binder A, Endler G, Muller M, Mannhalter C, Zenz W. 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter polymorphism associates with disseminated intravascular coagulation in children with systemic meningococemia. *J Thromb Haemost*. 2007;5(10):2049-54.
82. Gore I, Saphir O. Myocarditis; a classification of 1402 cases. *Am Heart J*. 1947;34(6):827-30.

- 
83. Pathan N, Hemingway CA, Alizadeh AA, Stephens AC, Boldrick JC, Oragui EE, et al. Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock. *Lancet*. 2004;363(9404):203-9.
84. Pathan N, Franklin JL, Eleftherohorinou H, Wright VJ, Hemingway CA, Waddell SJ, et al. Myocardial depressant effects of interleukin 6 in meningococcal sepsis are regulated by p38 mitogen-activated protein kinase. *Crit Care Med*. 2011;39(7):1692-711.
85. Coureuil M, Join-Lambert O, Lecuyer H, Bourdoulous S, Marullo S, Nassif X. Mechanism of meningeal invasion by *Neisseria meningitidis*. *Virulence*. 2012;3(2):164-72.
86. Brouwer MC, McIntyre P, de Gans J, Prasad K, van de Beek D. Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;8(9):CD004405.
87. Hackett SJ, Guiver M, Marsh J, Sills JA, Thomson AP, Kaczmarski EB, et al. Meningococcal bacterial DNA load at presentation correlates with disease severity. *Arch Dis Child*. 2002;8 (1):44-6.
88. Kaplan SL, Schutze GE, Leake JA, Barson WJ, Halasa NB, Byington CL, et al. Multicenter surveillance of invasive meningococcal infections in children. *Pediatrics*. 2006;118(4):e979-84.
89. Edmond K, Clark A, Korczak VS, Sanderson C, Griffiths UK, Rudan I. Global and regional risk of disabling sequelae from bacterial meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(5):317-28.
90. Ploysangam T, Sheth AP. Chronic meningococemia in childhood: case report and review of the literature. *Pediatr Dermatol*. 1996;13(6):483-7.
91. Jennens ID, O'Reilly M, Yung AP. Chronic meningococcal disease. *Med J Aust*. 1990;153(9):556-9.

92. Barquet N, Gasser I, Domingo P, Moraga F, Macaya A, Elcuaz R. Primary meningococcal conjunctivitis: report of 21 patients and review. *Rev Infect Dis.* 1990;12(5):838-47.
93. Perkins MD, Mirrett S, Reller LB. Rapid bacterial antigen detection is not clinically useful. *J Clin Microbiol.* 1995;33(6):1486-91.
94. Davison E, Borrow R, Guiver M, Kaczmarek EB, Fox AJ. The adaptation of the IS1106 PCR to a PCR ELISA format for the diagnosis of meningococcal infection. *Serodiagn Immunother Infect Dis.* 1996;8:51-6.
95. Loza E, Planes A, Rodríguez M. Hemocultivos. En: Loza E, Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en microbiología clínica.* Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2003.
96. Newcombe J, Cartwright K, Palmer WH, Mc-Fadden J. PCR of peripheral blood diagnosis of meningococcal disease. *J Clin Microbiol.* 1996;34(7):1637-40.
97. Meningococcal carriage and disease. Cartwright KAV, editor. *Meningococcal disease.* Chichester, UK: John Wiley and Sons; 1995, pp 115-146.
98. Bohr V, Rasmussen N, Hansen B, Kajersem B, Jessen O, Jhonsen N, et al. 875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and the impact of preadmission antibiotic therapy. Part III of a three-part series. *J Infect.* 1983;7(3):193-202.
99. Formas clínicas de la enfermedad meningocócica. Ruiz Contreras J, Casado Flores J. Capítulo en: Moraga-Llop FA, editor. *La enfermedad meningocócica. Pasado, presente y futuro.* Sant Hilari Sacalm (Girona): Grafiques Montseny; 2013, pp 121-130.
100. Hahne SJ, Charlett A, Purcell B, Samuelsson S, Camaroni I, Ehrhard I, et al. Effectiveness of antibiotics given before admission in reducing mortality from meningococcal disease: systematic review. *BMJ.* 2006;332(7553):1299-303.
101. Nadel S, Kroll JS. Diagnosis and management of meningococcal disease: the need for centralized care. *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31(1):71-83.

- 
102. Nadel S, Britto J, Booy R, Maconochie I, Habibi P, Levin M. Avoidable deficiencies in the delivery of health care to children with meningococcal disease. *J Accid Emerg Med.* 1998;15(5):298-303.
103. Pelkonen T, Roine I, Cruzeiro ML, Pitkaranta A, Kataja M, Peltola H. Slow initial beta-lactam infusion and oral paracetamol to treat childhood bacterial meningitis: a randomised, controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(8):613-21.
104. Hart CA, Thomson AP. Meningococcal disease and its management in children. *BMJ.* 2006;333 (7570):685-90.
105. Vázquez JA, Enríquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: any need to act? *FEMS Microbiol Rev.* 2007;31:64-70.
106. Pérez-Trallero E, Aldamiz-Echeverria L, Pérez-Yarza EG. Meningococci with increased resistance to penicillin. *Lancet.* 1990;335:1096.
107. Ellis-Pegler R, Galler L, Roberts S, Thomas M, Woodhouse A. Three days of intravenous benzyl penicillin treatment of meningococcal disease in adults. *Clin Infect Dis.* 2003;37:658-62.
108. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2008. *Crit Care Med.* 2008;36:296-327.
109. National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) guideline bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in children. CL, UK: NICE. 2010. Disponible en: <http://www.nice.org.uk/CG102>.
110. Carcillo JA, Davis AL, Zaritsky A. Role of early fluid resuscitation in pediatric septic shock. *JAMA.* 1991;266:1242-5.

- 
111. Han YY, Carcillo JA, Dragotta MA, Bills DM, Watson RS, Westerman ME, et al. Early reversal of pediatric-neonatal septic shock by community physicians is associated with improved outcome. *Pediatrics*. 2003;112:793-9.
112. Levy MM, Dellinger RP, Townsend SR, Linde-Zwirble WT, Marshall JC, Bion J, et al. The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Crit Care Med*. 2010;38:367-74.
113. Finfer S, Bellomo R, McEvoy S, Lo SK, Myburgh J, Neal B, et al. Effect of baseline serum albumin concentration on outcome of resuscitation with albumin or saline in patients in intensive care units: analysis of data from the saline versus albumin fluid evaluation (SAFE) study. *BMJ*. 2006;333:1044.
114. Booy R, Habibi P, Nadel S, de Munter C, Britto J, Morrison A, et al. Reduction in case fatality rate from meningococcal disease associated with improved healthcare delivery. *Arch Dis Child*. 2001;85:386-90.
115. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, et al. Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA*. 2009;301:2362-75.
116. Branco RG, Russell RR. Should steroids be used in children with meningococcal shock? *Arch Dis Child*. 2005;90:1195-6.
117. Pollard AJ, Nadel S, Ninis N, Faust SN, Levin M. Emergency management of meningococcal disease: eight years on. *Arch Dis Child*. 2007;92:283-6.
118. Werdan K, Pilz G, Bujdoso O, Fraunberger P, Neeser G, Schmieder RE, et al. Scorebased immunoglobulin G therapy of patients with sepsis: the SBITS study. *Crit Care Med*. 2007;35:2693-701.
119. INIS Collaborative Group, Brocklehurst P, Farrell B, King A, Juszczak E, Darlow B, Haque K, et al. Treatment of neonatal sepsis with intravenous immune globulin. *N Engl J Med*. 2011;365:1201-11.

- 
120. Levin M, Quint PA, Goldstein B, Barton P, Bradley JS, Shemie SD, et al. Recombinant bactericidal/permeability-increasing protein (rBPI21) as adjunctive treatment for children with severe meningococcal sepsis: a randomized trial. rBPI21 Meningococcal Sepsis Study Group. *Lancet*. 2000;356:961-7.
121. Derkx B, Wittes J, McCloskey R. Randomized, placebo-controlled trial of HA-1A, a human monoclonal antibody to endotoxin, in children with meningococcal septic shock. European Pediatric Meningococcal Septic Shock Trial Study Group. *Clin Infect Dis*. 1999;28:770-7.
122. McCloskey RV, Straube RC, Sanders C, Smith SM, Smith CR. Treatment of septic shock with human monoclonal antibody HA-1A. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. CHESS Trial Study Group. *Ann Intern Med*. 1994;121:1-5.
123. Ziegler EJ, Fisher CJ, Jr., Sprung CL, Straube RC, Sadoff JC, Foulke GE, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med*. 1991;324:429-36.
124. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA*. 1995;273:934-410.
125. Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *JAMA*. 1994;271:1836-43.
126. Treatment of severe infectious purpura in children with human plasma from donors immunized with *Escherichia coli* J5: a prospective double-blind study. J5 study Group. *J Infect Dis*. 1992;165:695-701.

- 
127. Staubach KH, Schroder J, Stuber F, Gehrke K, Traumann E, Zabel P. Effect of pentoxifylline in severe sepsis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arch Surg.* 1998;133:94-100.
128. Ronco C, Bonello M, Bordoni V, Ricci Z, D'Intini V, Bellomo R, et al. Extracorporeal therapies in non-renal disease: treatment of sepsis and the peak concentration hypothesis. *Blood Purif.* 2004;22:164-74.
129. Van Deuren M, Santman FW, van Dalen R, Sauerwein RW, Span LF, van der Meer JW. Plasma and whole blood exchange in meningococcal sepsis. *Clin Infect Dis.* 1992;15:424-30.
130. Cornejo R, Downey P, Castro R, Romero C, Regueira T, Vega J, et al. High-volume hemofiltration as salvage therapy in severe hyperdynamic septic shock. *Intensive Care Med.* 2006;32:713-22.
131. Payen D, Mateo J, Cavillon JM, Fraisse F, Floriot C, Vicaut E. Impact of continuous venovenous hemofiltration on organ failure during the early phase of severe sepsis: a randomized controlled trial. *Crit Care Med.* 2009;37:803-10.
132. Marshall JC. Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: what have we learned? *Intensive Care Med.* 2000;26(Suppl 1):S75-83.
133. Kuppermann N, Inkelis SH, Saladino R. The role of heparin in the prevention of extremity and digit necrosis in meningococcal purpura fulminans. *Pediatr Infect Dis J.* 1994;13:867-73.
134. Cobcroft R, Henderson A, Solano C, Scott D. Meningococcal purpura fulminans treated with antithrombin III concentrate: what is the optimal replacement therapy? *Aust N Z J Med.* 1994;24:575-6.
135. Macias WL, Nelson DR. Severe protein C deficiency predicts early death in severe sepsis. *Crit Care Med.* 2004;32(5 Suppl):S223-8.

136. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, López-Rodríguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med*. 2001;344:699-709.
137. Martí-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev* (3):CD004388.
138. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, Dhainaut JF, Douglas IS, Finfer S, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. *N Engl J Med*. 2012;366:2055-64.
139. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, Dalton H, Peters M, Macias WL, et al. Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet*. 2007;369:836-43.
140. Vincent JL, Nadel S, Kutsogiannis DJ, Gibney RT, Yan SB, Wyss VL, et al. Drotrecogin alfa (activated) in patients with severe sepsis presenting with purpura fulminans, meningitis, or meningococcal disease: a retrospective analysis of patients enrolled in recent clinical studies. *Crit Care*. 2005;9:R331-43.
141. Martínón-Torres F, Iglesias Meleiro JM, Fernández Sanmartín M, Rodríguez Núñez A, Martínón Sánchez JM. Proteína C activada humana recombinante en el tratamiento de niños con púrpura fulminante meningocócica. *An Pediatr (Barc)*. 2004;61:261-5.
142. Zenz W, Zoehrer B, Levin M, Fanconi S, Hatzis TD, Knight G, et al. Use of recombinant tissue plasminogen activator in children with meningococcal purpura fulminans: a retrospective study. *Crit Care Med*. 2004;32:1777-80.
143. Sánchez Santos L, Couceiro Gianzo J, Blanco Fernández P, Rodríguez Núñez A, Martínón Sanchez JM. Utilidad del factor activador del plasminógeno en la sepsis meningocócica. *An Esp Pediatr*. 1997;47:327-8.
144. De Chalain T, Cohen S, Burnstein F. Successful use of leeches in the treatment of purpura fulminans. *Ann Plast Surg* 1995;35:300-6.

145. Dippenaar R, Smith J, Goussard P, Walters E. Meningococcal purpura fulminans treated with medicinal leeches. *Pediatric Critical Care Medicine* 2006;7:476-8.
146. Dippenaar R, Smith J, Goussard P, Walters E. Meningococcal purpura fulminans treated with medicinal leeches. *Pediatr Crit Care Med* 2006;7:476-8.
147. Nolan J, Sinclair R. Review of management of purpura fulminans and two case reports. *Br J Anesth* 2001;86:581-6.
148. Lawrence C, Matthew J, Cox N. The effect of ketanserin on healing of fresh surgical wounds. *Br J Dermatol* 1995;132:580-6.
149. Leclerc F, Leteurtre S, Cremer R, Fourier C, Sadik A. Do new strategies in meningococemia produce better outcomes? *Crit Care Med*. 2000;28(Suppl 9):S60-3.
150. Huang S, Clarke JA. Severe skin loss after meningococcal septicaemia: complications in treatment. *Acta Paediatr*. 1997;86:1263-6.
151. Betrosian AP, Berlet T, Agarwal B. Purpura fulminans in sepsis. *Am J Med Sci*. 2006;332:339-45.
152. McIntyre PB, Berkey CS, King SM, Schaad UB, Kilpi T, Kanra GY, et al. Dexamethasone as adjunctive therapy in bacterial meningitis. A meta-analysis of randomized clinical trials since 1988. *JAMA*. 1997;278:925-31.
153. Brigham KS, Sandora TJ. *Neisseria meningitidis*: Epidemiology, treatment and prevention in adolescents. *Curr Opin Pediatr*. 2009;21:437-43.
154. Van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer JW. Update on meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13:144-66.

- 
155. American Academy of Paediatrics. Meningococo, infecciones. En: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlyn DW, Long SS, directores. Red Book: Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 28ªed. México: Editorial Médica Panamericana; 2011.p. 479-87.
156. Panatto D, Amicizia D, Lai P, Gasparini R. Neisseria meningitidis B vaccines. *Exp Rev Vaccines*. 2011;10:1337-51.
157. Bai X, Findlow J, Borrow R. Recombinant protein meningococcal serogroup B vaccine combined with outer membrane vesicles. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11:969-85.
158. Yogev R, Tan T. Meningococcal disease: The advances and challenges of meningococcal disease prevention. *Hum Vaccin*. 2011;7:828-37.
159. Larrauri A, Cano R, Garcia M, Mateo S. Impact and effectiveness of meningococcal C conjugate vaccine following its introduction in Spain. *Vaccine*. 2005;23:4097-100.
160. Grupo de trabajo de enfermedad meningocócica de la ponencia de programa y registro de vacunación. Situación actual de la enfermedad meningocócica en España. Modificación de la pauta de vacunación frente meningitis C. Ministerio de Sanidad y Consumo, 2005.
161. Cano R, Garrido M. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III. Enfermedad meningocócica en España. Análisis de la temporada 2006-2007. *Bol Epidemiol Sem*. 2008;16:73-6.
162. Servicio de Vigilancia Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto Carlos III. Comentario epidemiológico de las enfermedades de declaración obligatoria y sistema de información microbiológica. España. Año 2010. *Boletín Epidemiológico Semanal*. 2011;19:100-16.
163. Abad R, Vazquez JA. Microbiology and public health: new challenges in surveillance and control of meningococcal disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2012;30:53-5.

164. Principi N, Esposito S. Universal protein vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B, *Streptococcus pneumoniae* and influenza. *Hum Vaccin*. 2011;7:905-12.
165. Su EL, Snape MD. A combination recombinant protein and outermembrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:575-88.
166. O'Hallahan J, McNicholas A, Galloway Y, O'Leary E, Roseveare C. Delivering a safe and effective strain-specific vaccine to control an epidemic of group B meningococcal disease. *N Z Med J*. 2009;122:48-59.
167. Rouaud P, Perrocheau A, Taha MK, Sesboue C, Forgues AM, Parent du Chatelet I, et al. Prolonged outbreak of B meningococcal disease in the Seine-Maritime department, France, January 2003 to June 2005. *Euro Surveill*. 2006;11:178-81.
168. De Moraes JC, Perkins BA, Camargo MC, Hidalgo NT, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet*. 1992;340:1074-8.
169. Safadi MA, McIntosh ED. Epidemiology and prevention of meningococcal disease: A critical appraisal of vaccine policies. *Expert Rev Vaccines*. 2011;10:1717-30.
170. Yogev R, Tan T. Meningococcal disease: The advances and challenges of meningococcal disease prevention. *Hum Vaccin*. 2011;7:828-37.
171. Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L, Abad R, Enriquez R, De La Fuente L, et al. Antigenic and/or phase variation of PorA protein in non-subtypable *Neisseria meningitidis* strains isolated in Spain. *J Med Microbiol*. 2004;53:515-8.
172. Snape MD, Dawson T, Oster P, Evans A, John TM, Ohene-Kena B, et al. Immunogenicity of two investigational serogroup B meningococcal vaccines in the first year of life: A randomized comparative trial. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29:e71-9.

173. Vazquez JA, Marcos C, Berron S. Sero/subtyping of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Spain. *Epidemiol Infect.* 1994;113:267-74.
174. Richmond PC, Marshall HS, Nissen MD, Jiang Q, Jansen KU, Garces-Sanchez M, et al. Safety, immunogenicity, and tolerability of meningococcal serogroup B bivalent recombinant lipoprotein 2086 vaccine in healthy adolescents: A randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(8):597-607.
175. Jiang HQ, Hoiseth SK, Harris SL, McNeil LK, Zhu D, Tan C, et al. Broad vaccine coverage predicted for a bivalent recombinant factor H binding protein based vaccine to prevent serogroup B meningococcal disease. *Vaccine.* 2010;28:6086-93.
176. Rappuoli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccine development. *Vaccine.* 2001;19:2688-91.
177. Moriel DG, Scarselli M, Serino L, Mora M, Rappuoli R, Maignani V. Genome-based vaccine development: A short cut for the future. *Hum Vaccin.* 2008;4:184-8.
178. Serruto D, Adu-Bobie J, Capecchi B, Rappuoli R, Pizza M, Maignani V. Biotechnology and vaccines: Application of functional genomics to *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. *J Biotechnol.* 2004;113:15-32.
179. Pizza M, Scarlato V, Maignani V, Giuliani MM, Arico B, Comanducci M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science.* 2000;287:1816-20.
180. Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: A decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18 Suppl 5:109-16.
181. Tan LK, Carlone GM, Borrow R. Advances in the development of vaccines against *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med.* 2010;362:1511-20.
182. European Medicines Agency. Bexsero®. Ficha técnica o resumen de las características del producto. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/002333/WC500137881.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002333/WC500137881.pdf)

183. Martín-Torres, F. Immunisation against meningococcus B: the case of Spain en: [www.thelancet.com](http://www.thelancet.com) Vol 382 November 9, 2013.
184. NJ Department of Health. Vaccine Preventable Disease Program. Meningococcal Disease FAQ December 12, 2013 disponible en: [http://www.state.nj.us/health/cd/meningo/documents/meningococcal\\_faq.pdf](http://www.state.nj.us/health/cd/meningo/documents/meningococcal_faq.pdf)
185. Gil A, Barranco D, Batalla J, Bayas JM, Campins M, Gorrotxategi Gorrotxategi P, et al. Prevention of serogroup B meningococcal disease using a four-component vaccine. *An Pediatr (Barc)*. 2013 Oct 9. pii: S1695-4033(13)00169-0. doi: 10.1016/j.anpedi.2013.04.013.
186. Salas A, et al. La genómica al servicio de la pediatría en el estudio de la enfermedad multifactorial. *Acta Pediatr Esp*. 2010;68(2):55-60.
187. Blackwell CC, Jonsdottir K, Hanson M, Todd WT, Chaudhuri AK, Mathew B, et al. Non-secretion of ABO antigens predisposing to infection by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Lancet*. 1986;2:284-5.
188. Blackwell CC, Weir DM, James VS, Todd WT, Banatvala N, Chaudhuri AK, et al. Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect*. 1990;104:203-9.
189. Callaghan MJ, Rockett K, Banner C, Haralambous E, Betts H, Faust S, et al. Haplotypic diversity in human CEACAM genes: effects on susceptibility to meningococcal disease. *Genes Immun*. 2008;9:30-7.
190. Woods JP, Frelinger JA, Warrack G, Cannon JG. Mouse genetic locus *Lps* influences susceptibility to *Neisseria meningitidis* infection. *Infect Immun*. 1988;56:1950-5.
191. Faber J, Meyer CU, Gemmer C, Russo A, Finn A, Murdoch C, et al. Human toll-like receptor 4 mutations are associated with susceptibility to invasive meningococcal disease in infancy. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:80-1.

192. Faber J, Henninger N, Finn A, Zenz W, Zepp F, Knuf M. A toll-like receptor 4 variant is associated with fatal outcome in children with invasive meningococcal disease. *Acta Paediatr.* 2009;98:548-52.
193. Read RC, Pullin J, Gregory S, Borrow R, Kaczmarski EB, di Giovine FS, et al. A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2001;184:640-2.
194. Allen A, Obaro S, Bojang K, Awomoyi AA, Greenwood BM, Whittle H, et al. Variation in Toll-like receptor 4 and susceptibility to group A meningococcal meningitis in Gambian children. *Pediatr Infect Dis J.* 2003;22:1018-9.
195. Sanders MS, van Well GT, Ouburg S, Morre SA, van Furth AM. Toll-like receptor 9 polymorphisms are associated with severity variables in a cohort of meningococcal meningitis survivors. *BMC Infect Dis.* 2012;12:112.
196. van Well GT, Sanders MS, Ouburg S, van Furth AM, Morre SA. Polymorphisms in Toll-like receptors 2, 4, and 9 are highly associated with hearing loss in survivors of bacterial meningitis. *PLoS One.* 2012;7:e35837.
197. Medvedev AE, Lentschat A, Kuhns DB, Blanco JC, Salkowski C, Zhang S, et al. Distinct mutations in IRAK-4 confer hyporesponsiveness to lipopolysaccharide and interleukin-1 in a patient with recurrent bacterial infections. *J Exp Med.* 2003;198:521-31.
198. Ellison RT 3rd, Kohler PF, Curd JG, Judson FN, Reller LB. Prevalence of congenital or acquired complement deficiency in patients with sporadic meningococcal disease. *N Engl J Med.* 1983;308:913-6.
199. Fijen CA, Kuijper EJ, te Bulte MT, Daha MR, Dankert J. Assessment of complement deficiency in patients with meningococcal disease in The Netherlands. *Clin Infect Dis.* 1999;28:98-105.

- 
200. Faber J, Schuessler T, Finn A, Murdoch C, Zenz W, Habermehl P, et al. Age-dependent association of human mannose-binding lectin mutations with susceptibility to invasive meningococcal disease in childhood. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26:243-6.
201. Brouwer MC, Read RC, van de Beek D. Host genetics and outcome in meningococcal disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2010;10:262-74.
202. Salimans MM, Bax WA, Stegeman F, van Deuren M, Bartelink AK, van Dijk H. Association between familial deficiency of mannose-binding lectin and mutations in the corresponding gene and promoter region. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11:806-7.
203. Bradley DT, Bourke TW, Fairley DJ, Borrow R, Shields MD, Young IS, et al. Genetic susceptibility to invasive meningococcal disease: MBL2 structural polymorphisms revisited in a large case-control study and a systematic review. *Int J Immunogenet*. 2012;39:328-37.
204. Densen P, Weiler JM, Griffiss JM, Hoffmann LG. Familial properdin deficiency and fatal meningococemia. Correction of the bactericidal defect by vaccination. *N Engl J Med*. 1987;316:922-6.
205. Spath PJ, Sjöholm AG, Fredrikson GN, Misiano G, Scherz R, Schaad UB, et al. Properdin deficiency in a large Swiss family: identification of a stop codon in the properdin gene, and association of meningococcal disease with lack of the IgG2 allotype marker G2m(n). *Clin Exp Immunol*. 1999;118:278-84.
206. Fijen CA, Derkx BH, Kuijper EJ, Mannens M, Poort SR, Peters M, et al. Fulminant meningococcal septic shock in a boy with combined inherited properdin and protein C deficiency. *Clin Exp Immunol*. 1995;102:290-6.
207. Bathum L, Hansen H, Teisner B, Koch C, Garred P, Rasmussen K, et al. Association between combined properdin and mannosebinding lectin deficiency and infection with *Neisseria meningitidis*. *Mol Immunol*. 2006;43:473-9.

208. Fijen CA, Kuijper EJ, Te Bulte M, van de Heuvel MM, Holdrinet AC, Sim RB, et al. Heterozygous and homozygous factor H deficiency states in a Dutch family. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:511-6.
209. Nielsen HE, Christensen KC, Koch C, Thomsen BS, Heegaard NH, Trantum-Jensen J. Hereditary, complete deficiency of complement factor H associated with recurrent meningococcal disease. *Scand J Immunol.* 1989;30:711-8.
210. Jack DL, Cole J, Naylor SC, Borrow R, Kaczmarski EB, Klein NJ, et al. Genetic polymorphism of the binding domain of surfactant protein-A2 increases susceptibility to meningococcal disease. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1426-33.
211. van der Pol WL, Huizinga TW, Vidarssonvan der Pol WL, Huizinga TW, Vidarsson G, van der Linden MW, Jansen MD, Keijsers V, et al. Relevance of Fcγ receptor and interleukin-10 polymorphisms for meningococcal disease. *J Infect Dis.* 2001;184:1548-55.
212. Smith I, Vedeler C, Halstensen A. FcγRIIIa and FcγRIIIb polymorphisms were not associated with meningococcal disease in Western Norway. *Epidemiol Infect.* 2003;130:193-9.
213. Domingo P, Muñoz-Díaz E, Baraldes MA, Arilla M, Barquet N, Pericas R, et al. Associations between Fc γ receptor IIA polymorphisms and the risk and prognosis of meningococcal disease. *Am J Med.* 2002;112:19-25.
214. Domingo P, Muñoz-Díaz E, Baraldes MA, Arilla M, Barquet N, Pericas R, et al. Relevance of genetically determined host factors to the prognosis of meningococcal disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:634-7.
215. Betrosian AP, Berlet T, Agarwal B. Purpura fulminans in sepsis. *Am J Med Sci.* 2006;332:339-45.
216. Sackesen C, Secmeer G, Gurgey A, Kanra G, Ecevit Z, Ceyhan M, et al. Homozygous Factor V Leiden mutation in a child with meningococcal purpura fulminans. *Pediatr Infect Dis J.* 1998;17:87.

217. Kondaveeti S, Hibberd ML, Booy R, Nadel S, Levin M. Effect of the Factor V Leiden mutation on the severity of meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18:893-6.
218. Kremer Hovinga JA, Franco RF, Zago MA, Ten Cate H, Westendorp RG, Reitsma PH. A functional single nucleotide polymorphism in the thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) gene associates with outcome of meningococcal disease. *J Thromb Haemost*. 2004;2:54-7.
219. Emonts M, de Bruijne EL, Guimaraes AH, Declerck PJ, Leebeek FW, de Maat MP, et al. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor is associated with severity and outcome of severe meningococcal infection in children. *J Thromb Haemost*. 2008;6:268-76.
220. Read RC, Cannings C, Naylor SC, Timms JM, Maheswaran R, Borrow R, et al. Variation within genes encoding interleukin-1 and the interleukin-1 receptor antagonist influence the severity of meningococcal disease. *Ann Intern Med*. 2003;138:534-41.
221. Endler G, Marculescu R, Starkl P, Binder A, Geishofer G, Muller M, et al. Polymorphisms in the interleukin-1 gene cluster in children and young adults with systemic meningococemia. *Clin Chem*. 2006;52:511-4.
222. Balding J, Healy CM, Livingstone WJ, White B, Mynett-Johnson L, Cafferkey M, et al. Genomic polymorphic profiles in an Irish population with meningococcaemia: is it possible to predict severity and outcome of disease? *Genes Immun*. 2003;4:533-40.
223. Harding D, Baines PB, Brull D, Vassiliou V, Ellis I, Hart A, et al. Severity of meningococcal disease in children and the angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1103-6.
224. Haralambous E, Weiss HA, Radalowicz A, Hibberd ML, Booy R, Levin M. Sibling familial risk ratio of meningococcal disease in UK Caucasians. *Epidemiol Infect*. 2003;130(3):413-18.

- 
225. Binder A, Endler G, Rieger S, Geishofer G, Resch B, Mannhalter B, et al. Protein C promoter polymorphisms associate with sepsis in children with systemic meningococemia. *Hum Genet.* 2007;122(2):183-90.
226. Burgner D, Davila S, Breunis WD, Ng SB, Li Y, Bonnard C, et al. A genome-wide association study identifies novel and functionally related susceptibility loci for Kawasaki disease. *PLoS Genet.* 2009;5(1): e1000319
227. Howie BN, Donnelly P and Marchini J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet.* 2009;5(6):e1000529.
228. Marchini J, Howie B, Myers S, McVean J, Donnelly P. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet.* 2007;39(7):906-913.
229. Emonts M, Vermont CL, Houwing-Duistermaat JJ, Haralambous E, Gaast-de Jongh, Hazelzet JA, et al. Polymorphisms in *PARP*, *IL1B*, *IL4*, *IL10*, *C1INH*, *DEFB1*, and *DEFA4* in meningococcal disease in three populations. *Shock.* 2010;34(1):17-22.
230. Schmermund A, Mohlenkamp S, Stang A, Gronemeyer D, Seibel R, Hirche H, et al. Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. *Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle. American Heart Journal.* 2002;144(2):212-8.

- 
231. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21(2):263-5.
232. Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661-678.
233. Emonts M, Hazelzet JA, de Groot R, Hermans PW. Host genetic determinants of *Neisseria meningitidis* infections. *Lancet Infect Dis*. 2003;3(9):565-577.
234. International HapMap consortium, Frazer KA, Ballinger DJ, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, et al. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449(7164):851-61.
235. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, Józsi M, Richter H, Misselwitz J, et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet*. 2007;(3)3:e41.
236. Hughes AE, Orr N, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38(10):1173-77.
237. International multiple sclerosis genetics consortium, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
238. 1000 Genomes Project Consortium, et al. A map of human genome variation from population scale sequencing. *Nature*. 2010;467(7319):1061-73.
239. Male DA, Ormsby RJ, Ranganathan S, Giannakis E, Gordon DL. Complement factor H: sequence analysis of 221 kb of human genomic DNA containing the entire fH, fHR-1 and fHR-3 genes. *Mol Immunol*. 2000;37(1-2):41-52.

240. Schneider MC, Prosser BE, Caesar JJ, Kugelberg E, Li S, Zhang Q, et al. *Neisseria meningitidis* recruits factor H using protein mimicry of host carbohydrates. *Nature*. 2009;458(7240):890-3.
241. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308(5720):385-89.
242. Abarategui-Garrido C, Martínez-Barricarte R, López-Trascasa M, de Córdoba SR, Sánchez-Corral P. Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood*. 2009;114(19):4261-71.
243. Khor CC, Hibberd ML. Host-pathogen interactions revealed by human genome-wide surveys. *Trends Genet*. 2012;28(5):233-43.
244. Khor CC, Hibberd ML. Revealing the molecular signatures of host-pathogen interactions. *Genome Biol* 2011;12(10):229.
245. Allikmets R. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 1997;17(1):122.
246. Kaplan J, Gerber S, Larget-Piet D, Rozet JM, Dollfus H, Dufier JL, et al. A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nat Genet* 1993;5(3):308-11.
247. Tachikawa M, Watanabe M, Hori S, Fukaya M, Ohtsuki S, Asashima T, et al. Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *Journal of neurochemistry* 2005;95(1):294-304.
248. Bhongsatiern J, Ohtsuki S, Tachikawa M, Hori S, Terasaki T. Retinal-specific ATP-binding cassette transporter (ABCR/ABCA4) is expressed at the choroid plexus in rat brain. *Journal of neurochemistry* 2005;92(5):1277-80.

249. Jamieson SE, de Roubaix LA, Cortina-Borja M, Tan HK, Mui EJ, Cordell HJ, et al. Genetic and epigenetic factors at COL2A1 and ABCA4 influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. PLoS One. 2008;3(6): e2285.
250. Yu Y, Bhangale TR, Fagerness J, Ripke S, Thorleifsson G, Tan PL, et al. Common variants near *FRK/COL10A1* and *VEGFA* are associated with advanced age-related macular degeneration. Hum Mol Genet 2011;20(18):3699-709.
251. Balaskas K, Potamitou D. Endogenous endophthalmitis secondary to bacterial meningitis from *Neisseria Meningitidis*: a case report and review of the literature. Cases journal 2009;2:149.
252. Yeung WL, Yam KL, Chan WM, Hui J. Red eyes as the initial presentation of systemic meningococcal infection. Journal of paediatrics and child health 2003;39:390-1.
253. Lin WY, Lee WC. Incorporating prior knowledge to facilitate discoveries in a genome-wide association study on age-related macular degeneration. BMC research notes 2010;3:26.
254. Allikmets R, Shroyer NF, Singh N, Seddon JM, Lewis RA, Bernstein PS, et al. Mutation of the Stargardt disease gene (*ABCR*) in age-related macular degeneration. Science 1997;277(5333):1805-7.
255. Bonnefond A, Clement N, Fawcett K, Yengo L, Vaillant E, Guillaume JL, et al. Rare *MTNR1B* variants impairing melatonin receptor 1B function contribute to type 2 diabetes. Nat Genet 2012;44(3):297-301.
256. Kalayoglu MV, Bula D, Arroyo J, Gragoudas ES, D'Amico D, Miller JW. Identification of *Chlamydia pneumoniae* within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2005;243(11):1080-90.

- 
257. Robman L, Mahdi O, McCarty C, Dimitrov P, Tikellis G, McNeil J, et al. Exposure to *Chlamydia pneumoniae* infection and progression of age-related macular degeneration. *Am J Epidemiol*. 2005;161(11):1013-9.
258. Khandhadia S, Foster S, Cree A, Griffiths H, Osmond C, Goverhand S, et al. Chlamydia infection status, genotype, and age-related macular degeneration. *Mol Vis*. 2012;18:29-37.
259. Turgut B, Uyar F, Ilhan F, Demir T, Celiker, U. *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* seropositivity in patients with age-related macular degeneration. *J Clin Med Res*. 2010;2(2):85-9.
260. Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(1):1-18.
261. Soriano-Gabarro M, Wolter J, Hogeia C, Vyse A. Carriage of *Neisseria meningitidis* in Europe: a review of studies undertaken in the region. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011;9:761-74.
262. Lee CC, Middaugh NA, Howie SR, Ezzati M. Association of secondhand smoke exposure with pediatric invasive bacterial disease and bacterial carriage: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2010;7:e1000374.
263. Radu RA, Hu J, Yuan Q, Welch DL, Makshanoff J, Lloyd M, et al. Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration. *J Biol Chem*. 2011;286(21):18593-601.
264. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. *Nat Genet*. 2011;43(4):321-7.
265. Wright AF. A rare variant in CFH directly links age-related macular degeneration with rare glomerular nephropathies. *Nat Genet*. 2011;43(12):1176-7.

- 
266. Zhao J, Wu H, Khosravi M, Cui H, Qian X, Kelly JA, et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS Genet.* 2011;7(5):e1002079.
267. Wong HE, Li MS, Kroll JS, Hibberd ML, Langford PR. Genome wide expression profiling reveals suppression of host defence responses during colonisation by *Neisseria meningitidis* but not *N. lactamica*. *PLoS One.* 2011;6(10):e26130.
268. Chamot-Rooke J, Mikaty G, Malosse C, Soyer M, Dumont A, Gault J, et al. Posttranslational modification of pili upon cell contact triggers *N. meningitidis* dissemination. *Science.* 2011;331: 778-82.
269. Whitmore SS, Braun TA, Skeie JM, Haas CM, Sohn EH, Stone EM, et al. Altered gene expression in dry age-related macular degeneration suggests early loss of choroidal endothelial cells. *Mol Vis.* 2013; 19:2274-97.
270. Kenney MC, Chwa M, Atilano SR, Pavlis JM, Falatoonzadeh P, Ramirez C, et al. Mitochondrial DNA variants mediate energy production and expression levels for CFH, C3 and EFEMP1 genes: implications for age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2013;8(1):e54339.
271. Fujinami K, Zernant J, Chana RK, Wright GA, Tsunoda K, Ozawa Y, et al. ABCA4 gene screening by next-generation sequencing in a British cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(10):6662-74.
272. Zernant J, Schubert C, Im KM, Burke T, Brown CM, Fishman GA, et al. Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(11):8479-87.



## **ANEXO I: La red ESIGEM**

---



## ANEXO I: La red ESIGEM

### A. La red ESIGEM

La red ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia de la Genética de la Enfermedad Meningocócica, [www.esigem.org](http://www.esigem.org)), es una red de investigación nacional coordinada desde el Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, que se puso en marcha en 2005 con la finalidad de avanzar en el conocimiento de la enfermedad meningocócica, especialmente en sus aspectos genéticos. Está constituida por más de 40 centros distribuidos por toda la península y más de 90 investigadores colaboradores (Ver relación de centros e investigadores colaboradores más adelante). Se trata de una red multidisciplinar constituida fundamentalmente por pediatras y genetistas, pero que también dispone de microbiólogos, bioinformáticos, bioestadistas y biólogos, entre otros. Cuenta con la colaboración del Laboratorio de Genética del Instituto de Medicina Legal de la Universidad de Santiago, la Fundación Galega de Medicina Genómica y el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN; Santiago de Compostela).

Código	Hospital	Investigador colaborador
01	Hospital Clínico Universitario (Santiago)	Dra. Nazareth Martinón Torres Dra. Natalia García Dra. Fernanda Pardo Sánchez Dr. José Manuel Sánchez Granados
02	Hospital Universitario de Salamanca	Dra. Olga Serrano Ayesarán Dr. Manuel Silveira Cancela
03	Hospital da Costa de Burela (Lugo)	Dr. José Luis García Rodríguez
04	Complejo Hospitalario Cristal-Piñor (Ourense)	Dra. Susana María Rey García
05	Hospital Parc Pauï de Sabadell	Dr. Valentí Pineda Solas Dra. Teresa Gill
06	Hospital Donostia de San Sebastián	Dra. Cristina Calvo Monge
07	Hospital Ramón y Cajal de Madrid	Dr. César Pérez-Caballero Macarró
08	Hospital Virgen de la Salud de Toledo	Dr. José Antonio Alonso Martín Dr. David Arjona Villanueva
09	Hospital Virgen de las Nieves de Granada	Dra. Pilar Ascón González de Aguiló
10	Hospital Joan XXIII de Tarragona	Dr. Xavier Allué Martínez
11	Hospital Universitario Central de Asturias	Dr. Andrés Concha Torre
12	Hospital General Universitario de Alicante	Dr. Roberto Reig Saenz
13	Hospital Torrecárdenas de Almería	Dr. Manuel González-Ripoll Garzón Dr. Francisco Giménez Sánchez
14	Complejo Hospitalario Universitario de Vigo	Dr. Alfredo Repáraz Romero Dr. Manuel Ortiz Pallares
15	Complejo Hospitalario de Jaén	Dr. Jesús de la Cruz Moreno Dra. M. Carmen Martínez Padilla Dra. Carmen Santiago Gutierrez
16	Hospital Infantil "La Fe" de Valencia	Dr. Vicente Modesto I Alapont Dr. Rafael Gómez Zafra
17	Hospital Marqués de Valdecilla de Santander	Dr. Alvaro Castellanos Ortega Dr. Marcelino Pumarada Dr. Juan Casado Flores
18	Hospital "Niño Jesús" de Madrid	Dra. Sonia Marcos Alonso
19	Hospital Juan Canalejo de La Coruña	Dra. Ángela Ferrer Barba Dra. Ana Hurtado Doce
20	Hospital Gregorio-Marañón de Madrid	Dra. Amaya Bustinza Arriortua Dr. Francisco Gómez-Campderá Dra. María Luisa Navarro Gómez
21	Hospital San Juan de Dios (Barcelona)	Dra. Elizabeth Esteban Torné
22	Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)	Dra. Sonia Cañadas Palazón
23	Hospital Carlos Haya (Málaga)	Dr. José Manuel Gonzalez Dr. David Moreno
24	Hospital de Cruces (Vizcaya)	Dr. Julio López Bayón Dra. Elvira Morteruel Arizkuren
25	Hospital Xeral-Calde (Lugo)	Dra. Soledad Martínez Regueira
26	Hospital Reina Sofía (Córdoba)	Dr. Juan Luis Pérez Navero
27	Hospital "Virgen del Rocio" (Sevilla)	Dra. María Teresa Alonso Salas
28	Hospital Universitario de Albacete	Dra. María del Mar Ballesteros García
29	Hospital Clínico Universitario de Valencia	Dr. Juan Ignacio Muñoz Bonet
30	Hospital Puerta del Mar (Cádiz)	Dr. Servando Pantoja Rosso
31	Hospital Virgen del Camino (Navarra)	Dr. Enrique Bernaola Iturbe
32	Hospital Infantil "La Paz" (Madrid)	Dr. Francisco Alvarado Ortega
33	Hospital Virgen de La Arrixaca (Murcia)	Dra. Susana Reyes Dominguez Dra. María Cruz León León
34	Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid)	Dr. Juan Ignacio Sánchez Díaz Dra. Silvia Belda Hofeinz
35	Hospital Rey Don Jaime (Castellón)	Dra. Natalia Molini Menchón
36	Hospital San Cecilio (Granada)	Dra. Esther Ocete Hita
37	Hospital de Manforte (Lugo)	Dr. Santiago Fernández Cebrían
38	Hospital Josep Trueta (Girona)	Dr. Mario Sánchez Fernández
39	Hospital Vixen da Xunqueira (Cee)	Dra. Isabel Quintela Fernández
40	Hospital 9 de Octubre (Valencia)	Dr. Rafael López Peña
41	Hospital de Sant Pau (Barcelona)	Dr. Eduardo Carreras Gonzalez Dra. Sonia Brio Sanagustin
42	Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca)	Dr. José Joaquín Dueñas Morales
43	Hospital Arquitecto Marqués (Fermol)	Dr. José Luaces Gonzalez Dr. Ramon Fernández Prieto

Fig. Relación de centros e investigadores colaboradores de la red ESIGEM.

**B. Web del estudio genético de la enfermedad meningocócica (www.esigem.org) para la cohorte de ESIGEM-España**

english version | versión en castellano

INICIO PROYECTO CENTROS FINANCIACIÓN ESIGEM PRODUCCIÓN CONTACTO

Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica

acceso investigador

© 2009 PROTOCOLO ESIGEM, todos los derechos reservados. favoritos



english version | versión en castellano

INICIO **PROYECTO** CENTROS FINANCIACIÓN ESIGEM PRODUCCIÓN CONTACTO

**Aprobación ética:** Comité Etico de Investigación Clínica de Galicia (resolución nº2005/295)

**Acreditación:** Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos de la Asociación Española de Pediatría (2/11/2005)

**Tipo de Estudio:** Ambispectivo multicéntrico

**Objetivos:** Evaluar la influencia genética en la Enfermedad Meningocócica:  
- Correlacionar patrones genéticos y pronósticos  
- Correlacionar patrones genéticos y clínicos

**Autores protocolo** Dr. Federico Martín-Torres  
Dra. Sonia Marcos Alonso

**Investigadores principales** Dr. Angel Carracedo Alvarez  
Dra. Sonia Marcos Alonso  
Dr. Federico Martín-Torres  
Dr. Jose María Martín Sánchez  
Dr. Antonio Salas Ellacuriaga  
Dra. Ana Paula Vega Gliemmo

**Coordinador de ESIGEM** Federico Martinon-Torres

© 2009 PROTOCOLO ESIGEM, todos los derechos reservados. favoritos

# ESIGEM

english version | [versión en castellano](#)

INICIO
PROYECTO
CENTROS
FINANCIACIÓN
ESIGEM
PRODUCCIÓN
CONTACTO

El estudio será coordinado desde el centro investigador principal (**Hospital Clínico Universitario de Santiago**) por el equipo Investigador Principal.  
El reclutamiento de pacientes se realizará a través de los siguientes centros:

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hospital Clínico Universitario (Santiago)</li> <li>• Hospital Universitario de Salamanca</li> <li>• Hospital da Costa de Burela (Lugo)</li> <li>• Complejo Hospitalario Cristal-Piñor (Ourense)</li> <li>• Hospital Parc Paulí de Sabadell</li> <li>• Hospital Donosita de San Sebastián</li> <li>• Hospital Ramón y Cajal de Madrid</li> <li>• Hospital Virgen de la Salud de Toledo</li> <li>• Hospital Virgen de las Nieves de Granada</li> <li>• Hospital Joan XXIII de Tarragona</li> <li>• Hospital Universitario Central de Asturias</li> <li>• Hospital General Universitario de Alicante</li> <li>• Hospital Torrecárdenas de Almería</li> <li>• Complejo Hospitalario Universitario de Vigo</li> <li>• Complejo Hospitalario de Jaén</li> <li>• Hospital San Juan de Dios (Barcelona)</li> <li>• Hospital Infantil "La Fe" de Valencia</li> <li>• Hospital Marqués de Valdecilla de Santander</li> <li>• Hospital "Niño Jesús" de Madrid</li> <li>• Hospital Juan Canalejo de La Coruña</li> <li>• Hospital Gregorio-Marañón de Madrid</li> <li>• Hospital Vall d'Hebron (Barcelona)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hospital Carlos Haya (Málaga)</li> <li>• Hospital de Cruces (Vizcaya)</li> <li>• Hospital Xeral-Calde (Lugo)</li> <li>• Hospital Reina Sofía (Córdoba)</li> <li>• Hospital "Virgen del Rocío"(Sevilla)</li> <li>• Hospital Universitario de Albacete</li> <li>• Hospital Clínico Universitario de Valencia</li> <li>• Hospital Puerta del Mar (Cádiz)</li> <li>• Hospital Virgen del Camino (Navarra)</li> <li>• Hospital Infantil "La Paz" (Madrid)</li> <li>• Hospital San Juan de Dios (Barcelona)</li> <li>• Hospital Virgen de La Arrixaxa (Murcia)</li> <li>• Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid)</li> <li>• Hospital Rey Don Jaime (Castellón)</li> <li>• Hospital San Cecilio (Granada)</li> <li>• Hospital de Monforte (Lugo)</li> <li>• Hospital Josep Trueta (Girona)</li> <li>• Hospital Virxen da Xunqueira (Cee)</li> <li>• Hospital 9 de Octubre (Valencia)</li> <li>• Hospital de Sant Pau (Barcelona)</li> <li>• Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca)</li> <li>• Hospital Arquitecto Marçide (Ferrol)</li> </ul>
--	---

© 2009 PROTOCOLO ESIGEM, todos los derechos reservados.

[favoritos](#)







**C. Protocolo de recogida de datos en la cohorte de casos de ESIGEM-España.**



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

**Protocolo ESIGEM  
Formulario Recogida Datos**

**Instrucciones de cumplimentación y envío del formulario:**

- Por favor rellene con la máxima precisión el cuestionario en TODOS sus apartados.
- Utilice los menús desplegables, y consulte los apéndices cuando sea necesario.
- Una vez cumplimentado el protocolo guarde el archivo con el nombre "código de su centro-- número paciente-primer apellido paciente-segundo apellido paciente" (ejemplo: 001-003-Perez-Sanchez)
- Una vez completado, enviar a la dirección [federicomartinon@telefonica.net](mailto:federicomartinon@telefonica.net) o [fedemartinon@movistar.com](mailto:fedemartinon@movistar.com). Gracias.

**Código del hospital:**  
**Protocolo nº:**  
**Prospectivo o Retrospectivo:** -----  
**Nº de historia del paciente:**  
**Nombre médico que cumplimenta protocolo:**

**Datos generales y de filiación genética del paciente:**

Sexo: --  
 Raza/Etnia/Grupo poblacional:----- Nivel socioeconómico:-----  
 Fecha de Nacimiento (dd/mm/aaaa):  
 Edad (años y meses):  
 Localidad origen:                      Provincia:  
 Localidad (probable) de contagio:                      Provincia:  
 Diagnóstico(\*ver apéndice pág 6 a 9):-----  
 Grado de seguridad diagnóstica (\*ver apéndice pág. 6 a 9): -----  
 Localidad (Provincia) de nacimiento niño:  
 Localidad (Provincia) de nacimiento padre:  
 Localidad (Provincia) de nacimiento madre:  
 Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo paterno:  
 Localidad (Provincia) de nacimiento abuela paterna:  
 Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo materno:  
 Localidad (Provincia) de nacimiento abuela materna:  
 Fecha ingreso en hospital (dd/mm/aaaa):  
 Tiempo de evolución desde inicio cuadro hasta el ingreso (horas):

Dirección Praxi: Hospital Clínico Universitario Travesía Choupana, s/n-15706 Santiago, Tel. 981 950 000-Fax. 981 950 464-CJF: O.1500258E - Hospital GI Coarques Travesía Choupana, s/n-Tel. 981 956 000-15706 Santiago - Hospital de Conso-R/Ramón Baltar, s/n-Tel. 981 951 000-Fax. 981 531 255-15708 Santiago - Hospital Psiquiátrico P/Martín Herrera, 2-7 Tel. 981 951 900-Fax 981 951 901-15706 Santiago





**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Tiempo de evolución desde la aparición de las primeras lesiones cutáneas hasta el ingreso (horas):

Ingresó en UCIP:  Sí  No

Duración estancia en UCIP (días) *[especificar decimales, especialmente en el caso de estancias menores de 24 horas, ejemplo 18 horas=0,75 días]*

Duración estancia hospitalaria total (días): *[especificar decimales, especialmente en el caso de estancias menores de 24 horas, ejemplo 12 horas=0,5]*

Fecha de  Alta /  Exitus: (formato dd/mm/aa)

Si procede – especificar causa del exitus (especificar):

Estado al alta UCIP: -----

Estado al alta hospital ----

Estado a los 30 días ----

Estado a los 90 días ----

### Antecedentes del paciente

Familiares en 1º o 2º grado con:

- Enfermedad meningocócica --
- Meningitis --
- Inmunodeficiencia congénita o adquirida -- (especificar si procede):
- Enfermedad hereditaria: -- (especificar si procede)
- Otros (especificar):

Antecedentes personales de:

- Meningitis bacteriana --
- Otras infecciones graves que requiriesen ingreso --
- Inmunodeficiencia congénita o adquirida: -- (especificar si procede):
- Tratamiento con inmunosupresores: -- (especificar si procede):

¿Vacunado frente a meningococo? --

Recibió tratamiento antibiótico previo al ingreso:--

- Si procede especificar cual y durante cuántos días

### Datos microbiológicos

Visualización de diplococo gram negativo (meningococo): -----

Pruebas rápidas - detección de antígenos polisacáridos de meningococo:  
-----

Detección de ADN de Neisseria Meningitidis en sangre o LCR -----

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario-Travelisa Choupana, s/n - 15706 Santiago-Tel: 981 950 000-Fax: 981 950 454-CIF: Q1500258E - Hospital OI Casares-Travelisa Choupana, s/n-Tel: 981 950 000-15706 Santiago - Hospital de Corzo-Pedemón Baltar, s/n-Tel: 981 951 000-Fax: 981 951 255-15706 Santiago - Hospital Paqueleiro-Plazamir Herrera, 2-Tel: 981 951 900-Fax: 981 951 001-15706 Santiago



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Aislamiento de Neisseria Meningitidis en:[se pueden señalar varios]:

No aislado  Sangre,  LCR,  Petequias,  otro (Especificar)

Serogrupo aislado: -- Serotipo aislado: Serosubtipo:

MIC (concentración mínima inhibitoria) penicilina: MIC cefotaxima:

Serología de N meningitidis: -----

### Diagnósticos [Ver anexo para definiciones – pags 6 a 9]

Diagnóstico clínico: ----- Meningitis meningocócica: ---

Disfunción cardiovascular: -- Disfunción neurológica --

Oligoanuria --: Disfunción renal --

Disfunción respiratoria -- Lesión pulmonar aguda --

SDRA -- Disfunción hematológica --

Coagulación intravascular diseminada -- Disfunción hepática --

Otros (gastrointestinal, cardiológico, especificar):

### Datos clínicos:

Púrpura -- : Lesión predominante: -----

- Extensión (Porcentaje de superficie corporal afectada por alguna lesión petequeial/equimótica/hemorrágica):

Compromiso vascular distal -- Especificar a continuación:

- Localización (Señalar la/s que correspondan):

- MSD -- , gravedad(\*): .., nivel [\*\*]: ...
- MSI -- , gravedad(\*): .., nivel [\*\*]: ...
- MID -- , gravedad(\*): .., nivel [\*\*]: ...
- MII -- , gravedad(\*): .., nivel [\*\*]: ...

- \*Gravedad de 1 a 10: (impresión clínica graduada de 1-leve a 10-necrosis posiblemente irreversible)
- \*\*Nivel: limite de extensión máxima compromiso vascular distal (dedos, mano, muñeca, antebrazo, brazo)

Hipotensión refractaria durante las dos primeras horas: --

Puntuación en la escala de coma de Glasgow (ver apéndice pags 11 y 12):

- Al ingreso:
- Peor registrado (a las        horas):

PRISM (Pediatric Risk of Mortality score) \* calcular con los peores valores registrados en las primeras **24** horas o hasta que el paciente fallece si lo hace antes de 24 horas:

\*(ver apéndice pag 13 o calcular online en: <http://www.sfar.org/scores2/prism2.html>)



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Puntuación en el score Castellanos/MSSS \* *calcular con los peores valores registrados en las primeras 2 horas del ingreso en UCIP:* \*(ver apéndice pag. 14 o calcular online en: <http://www.sfar.org/scores2/msss2.html>)

### Datos analíticos (peores registrados en las primeras 24 horas de ingreso):

Nº total de leucocitos (cel/mm <sup>3</sup> ):	Porcentaje de cayados (%):	
Nº total de plaquetas:	pH	
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	Exceso de bases (mmol/L):	
Bicarbonato (mmol/L)	Láctico sérico (mg/dl):	
PaO <sub>2</sub> arterial /FiO <sub>2</sub> :	Potasio (meq/l):	
Calcio (mg/dl):	Glucosa (mg/dl):	
Troponina (ng/ml):	CK (U/L):	
CK-MB (U/L):	Creatinina (mg/dl):	
Urea (mg/dl):	Fibrinógeno (mg/dl):	
Tiempo de protrombina (TP o Quick) (en segundos):	(en %):	INR:
Tiempo de tromboplastina (TTP) (en segundos):	(en %):	
Productos de degradación de fibrinógeno (PDF) (microgr/ml):		
Dímero D (nanogr/ml):	Antitrombina III (%):	
Proteína C (%) (si disponible):	Proteína S (%) (si disponible):	
Procalcitonina (ng/ml):	Proteína C reactiva:	
VSG 1ª hora (mm):	Análisis LCR (nº células):	
Cortisol:	ACTH:	

### Datos sobre el tratamiento

Expansores plasmáticos en las primeras 2 horas --

Aminas -- :

- Noradrenalina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Dopamina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Dobutamina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Adrenalina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Fenilefrina -- dosis máxima (microgr/kg/min)
- Milrinona -- dosis máxima (microgr/kg/min)

Duración total en días de tratamiento vasopresor:



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## Protocolo ESIGEM Formulario Recogida Datos

Derivados sanguíneos: [se puede señalar más de uno]:

- plasma fresco  concentrado hemáties  concentrado plaquetas  
 inmunoglobulina inespecífica  otros (especificar) .

Antibióticos [se puede señalar más de uno]

- cefotaxima  ceftriaxona  vancomicina  teicoplanina  
 meropenem  otros (especificar):

Soporte respiratorio

- NO  oxigenoterapia  VNI  intubación y ventilación asistida

Si estuvo intubado, duración de la intubación (días):

Corticoides: -- Terlipresina -- RTPA: --

Anticoagulantes naturales [se puede señalar más de uno]

- Proteína C  Proteína C activada  antitrombina III  otros

Hemofiltración -- -- Duración (días)

Plasmafiltración -- Nº ciclos: volumen total de plasma intercambiado (litros):

Otros tratamientos (especificar):

### Datos evolución / pronóstico:

Escala pronóstica Glasgow (Ver apéndice pag 15):

Al alta: A los 3 meses: A los 6 meses:

Escala de rendimiento global (POPC) (Ver apéndice pag 15):

Al alta: A los 3 meses: A los 6 meses:

Precisó o precisará injertos cutáneos -- -- especificar % superficie corporal:

Presenta amputaciones -- -- Especificar localización y nivel de amputación (ejemplo:

MSD: 2 falanges terminales, 1 falange proximal; MII pierna tercio distal...

- MSD --, especificar:
- MSI --, especificar:
- MID --, especificar:
- MII --, especificar:

### Observaciones, Comentarios y Sugerencias:



## ANEXOS

### Definiciones de SIRS/sepsis/shock(\*):

(\* )Goldstein et al. *Pediatr Crit Care Med* 2005;6:2-8

- **Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS):** Al menos cumplirá 2 de los siguientes cuatro criterios, y uno de los cuales debe ser necesariamente el 1º o el 2º
  1. Temperatura central  $>38,5^{\circ}\text{C}$  o  $< 36^{\circ}\text{C}$
  2. Leucocitosis, leucopenia, o desviación izquierda para la edad (en general  $>12.000/\text{mm}^3$ ,  $<4000 \text{ mm}^3$  o  $>10\%$ , respectivamente)
  3. Taquicardia: frecuencia cardíaca dos desviaciones estándar por encima de lo normal para la edad en ausencia de estímulos externos, drogas o estímulos dolorosos, frecuencia persistentemente elevada entre 3 minutos y 4 horas, y no explicable de otra manera; o en niños de menos de 1 año bradicardia (frecuencia por debajo del percentil 10 para la edad en ausencia de drogas o estímulos vagales, o enfermedad cardíaca congénita) o disminución persistente al menos 30 minutos no explicable de otro modo.
  4. Frecuencia respiratoria 2 desviaciones estándar por encima de la correspondiente a la edad, o ventilación mecánica por un proceso agudo no relacionado con la enfermedad neuromuscular subyacente o la realización de anestesia general.
- **Sospecha de infección:** Síndrome clínico altamente sugestivo de infección por los hallazgos en el examen clínico y/o las pruebas complementarias
  - Petequias y/o púrpura con inestabilidad hemodinámica
  - Fiebre, tos, hipoxemia, leucocitosis e infiltrados pulmonares
  - Abdomen distendido timpánico, fiebre y leucocitosis, perforación intestinal



Complexo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

- **Infección confirmada o probada:** Aislamiento, Visualización o PCR positiva del germen responsable
- **Sepsis:** SIRS en presencia de o como resultado de una infección sospechada o confirmada.
- **Sepsis severa o grave:** Sepsis más la presencia de disfunción cardiovascular, o síndrome de distrés respiratorio agudo, o dos o más disfunciones de otros órganos (hepático, hematológico, renal, neurológico o respiratorio).
- **Shock séptico:** Sepsis y disfunción cardiovascular.
- **Disfunción cardiovascular:** Presencia de uno de los siguientes criterios a pesar de la expansión isotónica de la volemia con al menos 40 ml/kg en 1 hora
  - Hipotensión (tensión arterial sistólica por debajo del percentil 5 o por debajo de dos desviaciones estándar para la edad)
  - Necesidad de drogas vasoactivas para mantener la tensión arterial en el rango normal (dopamina >5 micrgr/kg min, o dobutamina, adrenalina o noradrenalina a cualquier dosis)
  - Dos criterios de los 5 siguientes:
    - Exceso de bases < -5 mmol/l
    - Lactato arterial > 36 mg/dl o 2 mmol/l
    - Oliguria (< 1ml/kg/hora)
    - Relleno capilar alargado (> 5 segundos)
    - Temperatura diferencial central periférica > 3°C
- **Disfunción respiratoria:**
  - $PaO_2/FiO_2 < 300$  en ausencia de enfermedad cardíaca cianótica o enfermedad pulmonar previa
  - $PaCO_2 > 65$  mmHg o 20 mmHg por encima del basal
  - Necesidad de  $FiO_2 > 50\%$  para mantener  $SatO_2 \geq 92\%$
  - Necesidad no electiva de ventilación mecánica invasiva o no invasiva



Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

- **Disfunción neurológica:** Puntaje en la escala de Glasgow  $\leq 11$  o cambio agudo en el puntaje de Glasgow  $\geq 3$  puntos con respecto al puntaje basal.
- **Disfunción hematológica:** Plaquetopenia ( $< 80.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$  o descenso del 50% con respecto al valor más alto registrado en los tres días previos), o INR  $> 2$ .
- **Disfunción renal:** Creatinina sérica más de dos veces por encima del límite normal para la edad, o incremento dos veces por encima del valor basal
- **Disfunción hepática:** Bilirrubina total  $\geq 4$  mg/dl, ó GOT/ALT dos veces por encima del límite normal para la edad.
- **Lesión pulmonar aguda:**  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ , con infiltrados bilaterales, de instauración aguda y en ausencia de fracaso cardíaco izquierdo.
- **Síndrome de distrés respiratorio agudo:**  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$ , con infiltrados bilaterales, de instauración aguda y en ausencia de fracaso cardíaco izquierdo.
- **Hipotensión refractaria:** Hipotensión arterial sistólica (por debajo percentil 5 o dos desviaciones estándar para la edad) que no se normaliza en las primeras dos horas del ingreso en UCIP a pesar de un tratamiento óptimo con volumen ( $> 40$  ml/kg) y drogas vasoactivas.



Complexo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

### Definiciones Enfermedad Meningocócica(\*)

(\*) CIE-9-MC036; CCDR 2005;31:31S1; CDC 2005

- **Meningitis Meningocócica:** Cultivo positivo en LCR para Neisseria meningitidis y/o más de 20 leucocitos/mm<sup>3</sup> en LCR y clínica compatible, y/o hallazgos compatibles en la autopsia
- **Meningococemia:** Presencia de Neisseria Meningitidis en sangre.
- **Sospecha clínica de enfermedad Meningocócica:** Rash purpúrico y/o petequeal junto con meningitis y/o sepsis, y/o la ausencia de evidencias alternativas que justifiquen el cuadro clínico. También se considerará cualquier cuadro clínicamente compatible en el que exista la evidencia de un contacto estrecho con un caso confirmado en los 60 días previos.
- **Caso probable de enfermedad Meningocócica:** Sospecha clínica de enfermedad Meningocócica junto con:
  - o El hallazgo de diplococos gram negativos en sitios normalmente estériles o en aspirado/frotis de lesiones petequiales/purpúricas, ó
  - o La presencia de antígenos de meningococo en sangre, LCR u orina.
  - o Hallazgos serológicos compatibles (títulos elevados de IgM, o elevación significativa de los títulos de IgM o Ig G frente a antígenos de proteína de membrana externa de N. meningitidis)
- **Caso confirmado de enfermedad Meningocócica:** Aislamiento de Neisseria meningitidis o presencia de ADN de meningococo (PCR) en un sitio normalmente estéril (sangre, LCR,...)y/o en aspirado/frotis de lesiones petequiales/purpúricas.



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

**Protocolo ESIGEM  
ANEXOS Recogida Datos**

**Percentil 5 y 95 de constantes vitales según edad**

**(\*)Goldstein et al. Pediatr Crit Care Med 2005;6:2-8**

	Taquicardia (lpm)	Bradycardia (lpm)	Taquipnea (rpm)	Leucocitosis Leucopenia (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Tensión arterial sistólica
1mes-1 año	>180	< 90	>34	>17.5 o <5	<75
2-5 años	>140	---	>22	>15.5 o <6	<74
6-12 años	>130	---	>18	>13.5 o <4.5	<83
13-18 años	>110	---	>14	>11 o <4.5	<90

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario-Travesía Choupana, s/n -15706 Santiago, Tel. 881 950 000-Fax 881 950 454-CIF: O1500259E - Hospital GI Casares-Travesía Choupana, s/n-Tel. 881 956 000-15706 Santiago -  
 Hospital de Compostela-Ramón Ballar, s/n-Tel. 881 951 000-Fax 881 531 235-15706 Santiago - Hospital Raquelinos-PMartin Herrera, 2-Tel. 881 951 900-Fax 881 951 901-15706 Santiago



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

### Escala de coma de Glasgow

ACTIVIDAD	MEJOR RESPUESTA
<b>Apertura de Ojos:</b>	
Espontánea: .....	4
Al hablarle: .....	3
Al dolor: .....	2
Ausencia: .....	1
<b>Verbal:</b>	
Orientado: .....	5
Confuso: .....	4
Palabras inadecuadas: .....	3
Sonidos inespecíficos: .....	2
Ausencia:.....	1
<b>Motora:</b>	
Obedece órdenes: .....	6
Localiza dolor: .....	5
Retirada al dolor: .....	4
Flexión al dolor: .....	3
Extensión anormal: .....	2
Ausencia: .....	1

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario-Travesía Choupana, s/n -15706 Santiago-Tel. 981 950 000-Fax 981 950 454-CIF: O1502296E - Hospital GI Casares-Travesía Choupana, s/n-Tel. 981 950 000-15706 Santiago - Hospital de Conso-RRamón Baltar, s/n-Tel. 981 951 000-Fax 981 531 235-15706 Santiago - Hospital Psiquiátrico-PMartin Herrera, 2-Tel. 981 951 900-Fax 981 951 901-15706 Santiago



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

### Escala de coma de Glasgow Modificada para Lactantes

<b><u>ACTIVIDAD</u></b>	<b><u>MEJOR RESPUESTA</u></b>
<b><u>Apertura de Ojos:</u></b>	
Espontánea: .....	<b>4</b>
Al hablarle: .....	<b>3</b>
Al dolor: .....	<b>2</b>
Ausencia: .....	<b>1</b>
<b><u>Verbal:</u></b>	
Balbuceo: .....	<b>5</b>
Irritable: .....	<b>4</b>
Llanto al dolor: .....	<b>3</b>
Quejidos al dolor: .....	<b>2</b>
Ausencia:.....	<b>1</b>
<b><u>Motora:</u></b>	
Movimientos espontaneos.....	<b>6</b>
Retirada al tocar: .....	<b>5</b>
Retirada al dolor: .....	<b>4</b>
Flexión anormal: .....	<b>3</b>
Extensión anormal: .....	<b>2</b>
Ausencia: .....	<b>1</b>

Dirección Postal: Hospital Clínico Universitario Traxelas Chousa, s/n, 15708 Santiago, Tel. 981 950 000-Fax 981 950 454-CIF: O1502260E - Hospital GI Cuarens-Traxelas Chousa, s/n, Tel. 981 956 000-15708 Santiago - Hospital de Comos-Ramón Ballar, s/n, Tel. 981 951 000-Fax 981 531 235-15708 Santiago - Hospital Psiquiátrico-PN Martín Herrera, 2, Tel. 981 951 900-Fax 981 951 901-15708 Santiago



Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

### Pediatric Risk of Mortality Score (PRISM) \*

\*Puede calcularlo online en: <http://www.sfar.org/scores2/prism2.html>

	< 1 año	TODOS	> 1 año	Puntaje
<b>TAS (mm Hg)</b>	130-160		150-200	2
	55-65		65-75	2
	> 160		> 200	6
	40-54		50-64	6
	< 40		<50	7
<b>TAD (mm Hg)</b>		> 110		6
<b>Frecuencia cardíaca (lpm)</b>	> 160		> 150	4
	< 90		< 80	4
<b>Frecuencia respiratoria (rpm)</b>	61-90		51-70	1
	> 90		> 70	5
	Apnea		Apnea	5
<b>PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub></b>		200-300		2
		< 200		3
<b>PaCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>		51-65		1
		> 65		5
<b>Glasgow</b>		< 8		6
<b>Reacción pupilar</b>		anisocoria/midriasis fijas y midriáticas		4
				10
<b>TP/TPT</b>		> 1,5 veces/control		2
<b>Bilirrubina total (mg/dl)</b>		> 3,5 en > 1 mes		6
<b>Potasio (mEq/l)</b>		3-3,5		1
		6,5-7,5		1
		< 3		5
		> 7,5		5
<b>Calcio (mg/dl)</b>		7-8		2
		12-15		2
		< 7		6
		> 15		6
<b>Glucosa (mg/dl)</b>		40-60		4
		250-400		4
		< 40		8
		> 400		8
<b>Bicarbonato (mEq/l)</b>		< 16		3
		> 32		3

Dirección Psud: Hospital Clínico Universitario, Travesía Choupanas, s/n, 15706 Santiago, Tel: 981 990 000 Fax: 981 990 464 C.F.: O1502056E - Hospital GI Choupanas, Travesía Choupanas, s/n, Tel: 981 990 000-15706 Santiago - Hospital Psiquiátrico-PN Martín Herrera, 2, Tel: 981 981 900 Fax: 981 981 901-15706 Santiago - Hospital de Coma-Ramón Baltar, s/n, Tel: 981 981 000 Fax: 981 531 235-15706 Santiago - Hospital Psiquiátrico-PN Martín Herrera, 2, Tel: 981 981 900 Fax: 981 981 901-15706 Santiago



Complexo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela

## Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos

### Score Castellanos – MSSS (meningococcal septic shock score)\*

\*Utilizar los peores valores registrados en las primeras 2 horas del ingreso en UCIP. Puede calcularlo online en: <http://www.sfar.org/scores2/msss2.html>

	SI	NO
Hipotensión refractaria*	2	0
Exceso de bases > 10 mmol/L	1	0
Glasgow < 8	2	0
Leucocitos < 4000/mm <sup>3</sup>	1	0
Tiempo de tromboplastina (TTP) > 150%	1	0
Cianosis	2	0
Oliguria*	1	0

#### **Definiciones(\*)**

- **Hipotension:** Presencia de hipotensión (TAS < 75 mmHg en niños menores de 4 años, y < 85 mmHg en niños mayores de 4 años) en las primeras 2 horas del ingreso a pesar de una resucitación líquida adecuada (carga de líquido > 20 ml / kg) y tratamiento con dopamina o dobutamina > 5 µg/kg.min o con adrenalina o noradrenalina > 0.1 µg/kg.min.
- **Oliguria:** diuresis < 1 mL/kg.h durante al menos una hora.

#### **Interpretación de la escala:**

- Riesgo débil ( $\leq 3$ )
- Riesgo intermedio (4-5)
- Riesgo alto ( $\geq 6$ )



**Complejo Hospitalario  
Universitario de  
Santiago de Compostela**

## **Protocolo ESIGEM ANEXOS Recogida Datos**

### **Escalas de valoración pronóstica**

#### **A/ Escala pronóstica Glasgow**

- 1 Muerte
- 2 Estado vegetativo (incapaz de interactuar con el entorno)
- 3 Discapacidad severa (entiende y obedece ordenes, pero es dependiente)
- 4 Discapacidad moderada (el paciente es capaz de defenderse por si mismo, pero no de reincorporarse a su vida normal previa (colegio, trabajo...))
- 5 Discapacidad leve o no discapacidad (puede reintegrarse en su vida normal, ir al colegio...)

#### **B/ Escala de rendimiento global (POPC)**

1. Actividad NORMAL para su edad.
2. Problemas físicos MENORES (producen limitación pero permiten actividad dentro de la normalidad).
3. Condiciones físicas o médicas que LIMITAN las actividades de la vida diaria.
4. DEPENDIENTE de los demás.
5. COMA. Estado vegetativo

### D. Consentimiento informado para la cohorte de ESIGEM-España.

Consentimiento Informado Protocolo ESIGEM (2ª fase) - www.esigem.org

**Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (E.S.I.G.E.M.)**

#### **Formulario de Consentimiento Informado (Original)**

##### **A. INFORMACION**

Las infecciones por meningococos son enfermedades muy graves, con alto riesgo de mortalidad o secuelas. Los estudios genéticos y funcionales pueden ayudar a conocer mejor la enfermedad y podrían ayudar a prevenirlas y tratarlas.

Los estudios genéticos y funcionales pueden ser muy diversos. En este caso nos referimos al análisis en el ADN, el ARN, las citoquinas y los mediadores proteicos extraídos de una muestra de sangre y otra de saliva, de una serie de genes y parámetros que podrían estar relacionados con la respuesta a la infección por meningococo. Estos análisis no pueden realizarse de otra manera y no suponen riesgos adicionales para el paciente. Se obtendrá la muestra aprovechando una extracción obligada.

El estudio incluye también un cuestionario sobre antecedentes personales y familiares. La finalidad de la investigación es mejorar los conocimientos sobre la patología que afecta a mi hijo/a y no supone ningún beneficio directo para él/ella. La participación es voluntaria y la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en los cuidados médicos de mi hijo/a.

Se guardará confidencialidad acerca de su identidad y no será informado de los resultados de los estudios genéticos que se realicen, salvo petición expresa y cuando estos estuviesen disponibles al final del estudio. Dichos resultados serán remitidos a una publicación científica para su difusión, guardando estricta confidencialidad sobre su identidad. Sus muestras se almacenarán codificadas en nuestro centro indefinidamente bajo la responsabilidad del investigador principal y se podrán utilizar como control en otros estudios genéticos y/o funcionales realizados por nuestro equipo. En cualquier caso se respetarán sus derechos tal y como establece la ley de protección de datos española, garantizando lo recogido en la Ley 15/1999 de protección de datos.

##### **B. CONSENTIMIENTO**

Yo,.....(nombre y apellidos),  
con DNI ....., en calidad de ..... (parentesco) del niño/a  
....., he leído y comprendido  
la información relativa a la realización del estudio genético en pacientes con  
enfermedad por meningococo (protocolo ESIGEM) y he podido preguntar las dudas  
que he considerado importantes.

Por eso, doy mi consentimiento para participar en dicho estudio.

Deseo, sin embargo,..... (opcional)

He sido informado adecuadamente de los puntos anteriores así como de los temas  
que de ellos se derivan por el facultativo D/Dª.....

En ....., a..... de ..... de 200.....

Firma del padre/tutor	Firma del facultativo
Teléfono contacto familia:.....	Teléfono contacto:.....

Consentimiento Informado

Protocolo ESIGEM (2ª fase) – www.esigem.org

**Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (E.S.I.G.E.M.)**

**Formulario de Consentimiento Informado (Copia padre/tutor)**

**A. INFORMACION**

Las infecciones por meningococos son enfermedades muy graves, con alto riesgo de mortalidad o secuelas. Los estudios genéticos y funcionales pueden ayudar a conocer mejor la enfermedad y podrían ayudar a prevenirlas y tratarlas.

Los estudios genéticos y funcionales pueden ser muy diversos. En este caso nos referimos al análisis en el ADN, el ARN, las citoquinas y los mediadores proteicos extraídos de una muestra de sangre y otra de saliva, de una serie de genes y parámetros que podrían estar relacionados con la respuesta a la infección por meningococo. Estos análisis no pueden realizarse de otra manera y no suponen riesgos adicionales para el paciente. Se obtendrá la muestra aprovechando una extracción obligada.

El estudio incluye también un cuestionario sobre antecedentes personales y familiares. La finalidad de la investigación es mejorar los conocimientos sobre la patología que afecta a mi hijo/a y no supone ningún beneficio directo para él/ella. La participación es voluntaria y la no aceptación de participar en este estudio no repercutirá en los cuidados médicos de mi hijo/a.

Se guardará confidencialidad acerca de su identidad y no será informado de los resultados de los estudios genéticos que se realicen, salvo petición expresa y cuando estos estuviesen disponibles al final del estudio. Dichos resultados serán remitidos a una publicación científica para su difusión, guardando estricta confidencialidad sobre su identidad. Sus muestras se almacenarán codificadas en nuestro centro indefinidamente bajo la responsabilidad del investigador principal y se podrán utilizar como control en otros estudios genéticos y/o funcionales realizados por nuestro equipo. En cualquier caso se respetarán sus derechos tal y como establece la ley de protección de datos española, garantizando lo recogido en la Ley 15/1999 de protección de datos.

**B. CONSENTIMIENTO**

Yo,.....(nombre y apellidos),  
con DNI ....., en calidad de ..... (parentesco) del niño/a  
....., he leído y comprendido  
la información relativa a la realización del estudio genético en pacientes con  
enfermedad por meningococo (protocolo ESIGEM) y he podido preguntar las dudas  
que he considerado importantes.

Por eso, doy mi consentimiento para participar en dicho estudio.

Deseo, sin embargo,..... (opcional)

He sido informado adecuadamente de los puntos anteriores así como de los temas  
que de ellos se derivan por el facultativo D/Dª.....

En ....., a..... de ..... de 200.....

Firma del padre/tutor	Firma del facultativo
Teléfono contacto familia:.....	Teléfono contacto:.....

Datos de Filiación Genética

Protocolo ESIGEM (2ª fase)

**Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica  
(E.S.I.G.E.M. - [www.esigem.org](http://www.esigem.org))**

**Datos de Filiación Genética**

**¡Atención!:** Esta hoja cumplimentada debe ser enviada junto con la hoja de Consentimiento Informado y la muestra de sangre.

*Por favor, complete con la mayor rigurosidad posible los siguientes apartados:*

- Código del Hospital:**..... **Fecha recogida muestra(dd/mm/aa):**.....
- Fecha ingreso en hospital (dd/mm/aa):**..... **Nº de historia:**.....
- Fecha Nacimiento (dd/mm/aaaa):**..... **Sexo (M/F):**..... **Raza:**.....
- Diagnóstico:** *(cumplimentar ambos apartados según las definiciones y los datos disponibles actuales)*
- Sepsis Meningocócica (1), Meningitis meningocócica (2), Ambos (3):**.....
- Sospecha Clínica (a), Caso Probable (b), Caso Confirmado(c):** .....
- Localidad (Provincia) de nacimiento niño:**.....
- Localidad (Provincia) de nacimiento padre:**.....
- Localidad (Provincia) de nacimiento madre:**.....
- Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo paterno:**.....
- Localidad (Provincia) de nacimiento abuela paterna:**.....
- Localidad (Provincia) de nacimiento abuelo materno:**.....
- Localidad (Provincia) de nacimiento abuela materna:**.....

**Observaciones:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Fdo. Investigador Colaborador

## E. Hoja de información para las familias en la cohorte de ESIGEM-España

Hoja de Información

Protocolo ESIGEM (2ª fase)

Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica

**(E.S.I.G.E.M. - [WWW.ESIGEM.ORG](http://WWW.ESIGEM.ORG))**

### Hoja de Información

En el momento actual, y a pesar de los avances en la prevención y el y tratamiento de las enfermedades provocadas por las bacterias llamadas meningococos, casi la mitad de los enfermos pueden fallecer, y más de la mitad de los que sobreviven, lo hacen con secuelas. Por eso, es esencial conocer mejor esta enfermedad para así tratar de prevenirla y curarla.

Las maneras de presentarse de esta infección son variadas, desde la simple presencia de la bacteria en la sangre con pocos signos de enfermedad, hasta el desencadenamiento de un fallo rápido de la función de varios órganos (corazón, pulmón, etc), que no responde siquiera a los tratamientos intensivos. Las razones que explican el por qué un paciente infectado por la *Neisseria* (bacteria causante de la enfermedad) desarrolle una u otra forma clínica de la enfermedad meningocócica, son múltiples y se conocen de forma incompleta. Una de las principales razones podría ser que, según las características genéticas de cada individuo, la reacción a la infección podría ser diferente.

Nuestro equipo de investigación, formado por pediatras y expertos en genética molecular, está realizando un estudio que puede suponer una oportunidad única de avanzar en el conocimiento de la **enfermedad meningocócica**. En dicho estudio participan los principales hospitales de nuestro país, con la colaboración del Laboratorio de Genética del Instituto de Medicina Legal, la Fundación Galega de Medicina Xenómica y del Centro Nacional de Genotipado (CEGEN; Santiago de Compostela).

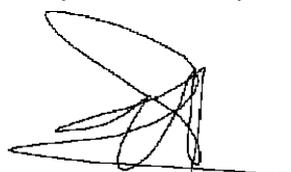
Hoja de Información

Protocolo ESIGEM (2ª fase)

El objetivo que perseguimos es conocer en qué medida la dotación genética del niño determina la expresividad clínica de la enfermedad (si afecta poco o mucho al paciente, y que órganos y en qué medida se ven afectados) y el pronóstico (si sobrevive o no, y si lo hace con o sin secuelas). Para ello, necesitamos por una parte una muestra de saliva y una muestra de sangre periférica de su hijo (cantidad máxima 6 ml) como la que se obtiene para los análisis de sangre ordinarios (de la que nosotros extraeremos el ADN, el ARN, citoquinas, y otros parámetros analíticos). Para ello, aprovecharíamos una extracción sanguínea ya prevista, o lo haríamos a través de un catéter ya implantado sin necesidad de pinchar al niño. Por otra parte, necesitamos que nos ayude a cumplimentar un cuestionario sencillo en el que se incluyen preguntas sobre sus antecedentes familiares y personales. Todos los datos serán manejados confidencialmente respetándose en todo momento su privacidad y la de su hijo. Aunque usted no será informado de los resultados del análisis, y dichos datos no modificarán el tratamiento que reciba su hijo, su participación supondrá una contribución esencial para avanzar en el conocimiento de esta terrible enfermedad, y esperamos que los resultados sí beneficien a otros niños en un futuro cercano.

Gracias de antemano por su consideración y su atención.

No dude en solicitar cualquier información adicional o plantearnos cualquier cuestión que estime oportuna.



Dr. Federico Martín Torres

Coordinador de la Red ESIGEM ([www.esigem.org](http://www.esigem.org))

Area de Pediatría, Hospital Clínico Universitario de Santiago

## F. Aprobaciones éticas para la cohorte de ESIGEM-España

### a. Comité de ética de la Universidad de Santiago de Compostela



VICERREITORÍA DE INVESTIGACIÓN  
E INNOVACIÓN  
Oficina de Investigación e Tecnoloxía

Edificio CACTUS – Campus universitario sur  
15782 Santiago de Compostela  
Tel. 981 547 040 - Fax 981 547 077  
Correo electrónico: [citinfo@usc.es](mailto:citinfo@usc.es)  
<http://maisd.usc.es>

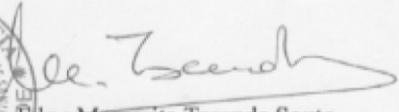
MANUEL CIFUENTES MARTÍNEZ, VICERRECTOR ADJUNTO DE INVESTIGACIÓN, 3º CICLO Y EXTENSIÓN DOCENTE Y PRESIDENTE DEL COMITÉ DE BIOÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA,

**CERTIFICO:** Que el proyecto de investigación titulado “E.S.I.G.E.M. Estudio sobre la influencia genética en la enfermedad meningocócica” del que son investigadores principales los profesores de la Universidad de Santiago de Compostela, **D. Antonio Salas Ellacuriaga** y **D. Federico Martín Torres** del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela, ha sido examinado y aprobado por el Comité de Bioética de esta Universidad, reunido el trece de diciembre del presente año, cumpliendo en su protocolo experimental los requisitos exigidos.

Y, para así conste a los efectos oportunos expido el presente certificado en Santiago de Compostela a trece de diciembre de dos mil cinco



## b. Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia

 <p><b>XUNTA DE GALICIA</b> CONSELLERÍA DE SANIDADE</p>	<p>Edificio Administrativo San Lázaro 15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA Teléfono: 981 54 28 13 - Fax: 981 54 18 04 www.sergas.es</p>	 <p><b>SERGAS</b> Secretaría Xeral Comité Ético de Investigación Clínica Telf. (981) 54 64 25 -- Fax (981) 54 18 04 E-mail: cec@sergas.es</p>
<h3>Informe del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia</h3> <p>Dña. Margarita Tasende Souto, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia</p> <p><b>CERTIFICA:</b></p> <p>Que este Comité ha evaluado, en su reunión del 16 de diciembre de 2005, la propuesta del Fundación Pública Gallega de Medicina Genómica para que se realice el estudio titulado "E.S.I.G.E.M. (<i>Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica</i>)", con nuestro número de registro: <b>2005/295</b>, y considera que:</p> <p>Se cumplen los requisitos éticos aplicables a este tipo de estudios, están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto y es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.</p> <p>Y que este Comité acepta, de conformidad con sus Procedimientos Normalizados de Trabajo, que dicho estudio sea realizado en el/los Centro/s: C.H. Universitario de Santiago; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, por: Sonia Marcos Grande, Federico Martín-Torres; Ángel Carracedo Álvarez, Antonio Salas Ellacuriaga, Ana Paula Vega Gliemmo como investigador/es principal/es.</p> <p style="text-align: center;">Santiago de Compostela a 16 de diciembre de 2005.</p> <div style="text-align: center;">         Edo.: Margarita Tasende Souto     </div>		
		

**c. Aprobación de la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos.**



*Sociedad Española de Cuidados Intensivos  
Pediátricos*

El estudio multicéntrico titulado “Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica (E.S.I.G.E.M.)”, coordinado por Federico Martín Torres del Servicio de Críticos, Intermedios y Urgencias Pediátricas Hospital Clínico Universitario de Santiago está avalado por la Sociedad Española de Cuidados Intensivos Pediátricos.

2 de noviembre de 2005

Corsino Rey Galán  
Vocal de Estudios Multicéntricos y  
Grupos de Trabajo de la SECIP

**ANEXO II - Relación de publicaciones y actividades científicas  
más relevantes derivadas de la realización de la tesis doctoral y  
de sus resultados**

---



## **ANEXO II - Relación de publicaciones y actividades científicas más relevantes derivadas de la realización de la tesis doctoral y de sus resultados**

---

### **A. Artículos publicados**

- Martín-Torres F, Khor CC, Wright VJ, Davila S, Lim KS, Binder A, Breunis WB, Inwald D, Nadel S, Betts H, Carrol, ED, de Groot R, Hermans PWM, Hazelzet JA, Emonts M, Lim CC, Kuijpers TW, Martín-Torres N, Fachal L, Vega A, Zenz W, Levin M, Hibberd ML, Salas A.

Meningococcal disease and age-related macular degeneration are genetically related.

**Eur J Hum Genet. 2012;20(Suppl 1):35.**

- Sonia Davila, Victoria J. Wright, Chiea Chuen Khor, Kar Seng Lim, Alexander Binder, Willemijn B. Breunis, David Inwald, Simon Nadel, Helen Betts, Enitan Carrol, Ronald de Groot, Jan Hazelzet, Marieke Emonts, Chui Chin Lim, Taco W. Kuijpers, Federico Martinon-Torres, Antonio Salas, Werner Zenz, Michael Levin, Martin L. Hibberd, on behalf of the ESPID meningococcal genetics consortium (N Martinon-Torres)

Genome-wide association study identifies variants in the CFH region associated with host genetic susceptibility to meningococcal disease.

**Nat Genet. 2010 Sep;42(9):772-6**

Factor impacto: 34.284 - Q1

- Salas A, Marcos-Alonso S, Vega A, Fachal L, Martín-Torres F, Grupo de Investigación ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica) (Martinon-Torres N)

La genómica al servicio de la pediatría en el estudio de la enfermedad multifactorial.

**Acta Pediatr Esp. 2010;68(2):55-60**

Salas A, Fachal L, Marcos Alonso S, Vega A, Martinon-Torres F, Grupo de Investigación ESIGEM (Estudio Sobre la Influencia Genética en la Enfermedad Meningocócica) (Martinon-Torres N)  
Investigating the role of mitochondrial haplogroups in genetic predisposition to meningococcal disease.  
**PLoS One. 2009 Dec 17;4(12):e8347**

### C. Capítulos de libros

- Fisiopatología de la enfermedad meningocócica. Aramburo Caragol A, Martinón-Torres N, Zenz W, Hazelzet JA, Martinón-Torres F. Capítulo en: Moraga-Llop FA, editor. La enfermedad meningocócica. Pasado, presente y futuro. Sant Hilari Sacalm (Girona): Grafiques Montseny; 2013, pp 85-101.

### D. Ponencias y comunicaciones

Martinón Torres N, Aramburo Caragol A, Cebey López M, Carballo Gómez A, Marcos Alonso S, Fachal Vilar L, Vega Gliemmo A, Martinón Sánchez JM, Carracedo Álvarez A, Salas Ellacuriaga A, Martinón Torres F, Grupo ESIGEM, Grupo EUCLIDS.

Red Nacional de Investigación para el Estudio de la Influencia Genética de la Enfermedad Meningocócica (grupo ESIGEM) e integración en el Consorcio Internacional para el Estudio de las Enfermedades Bacterianas Graves (grupo EUCLIDS).

Comunicación oral en: II Xornada de Investigación Biosanitaria. Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela. Fundación IDICHUS. 26 de abril de 2012.

## E. Conferencia

### **Reunión de Jóvenes Investigadores en Infectología Pediátrica. Edición 02.**

(nº exp 13/7166).

"Factores genéticos y meningococo: de colonizador a patógeno".

Sociedad Española de Infectología Pediátrica. Hospital Universitario La Paz, Madrid, 4 de octubre de 2013.

## F. Proyectos de Investigación financiados por agencias públicas o privadas

- Proyecto: **The genetic basis of meningococcal and other life threatening bacterial infections of childhood (EUCLIDS project: EU childhood life threatening infectious diseases genetics study).**

Investigador principal en España: Federico Martín Torres.

Coordinador general: Professor M. Levin

Papel desarrollado: Investigador colaborador

Periodo de desarrollo: 2011-2017.

Presupuesto total: 12.000.000 euros.

Organismo financiador: Unión Europea (7º Programa Marco). Collaborative Project (ii) Large-scale integrating project - Health 2011.2.1.1-3 Large scale genomic approaches to identifying host determinants of infectious diseases. FP7 Health 2011 two stage.

- Proyecto **MENDICOS: Disease course and sequelae of invasive meningococcal disease in Spain.**

Investigador principal: Federico Martín Torres.

Papel desarrollado: Investigador colaborador.

Empresa/administración financiera: Novartis.

- **Convenio de colaboración de investigación pediátrica en enfermedades infecciosas Sanofi Pasteur MSD y fundación IDICHUS –G3VIP Y ReGALIP**

Fecha de inicio y finalización: 2010

Investigador principal: Federico Martín Torres

Papel desarrollado: investigador colaborador.

Presupuesto: 35.000 euros

Empresa/Administración financiera: Sanofi Pasteur MSD

- Proyecto: **Genética de la enfermedad meningocócica: Estudio multicéntrico sobre los mecanismos de predisposición y protección genética en la infección meningocócica pediátrica.**

Investigador principal: Federico Martín Torres

Papel desarrollado: Investigador colaborador

Periodo de desarrollo: 2008 a 2011

Presupuesto: 173.030 euros

Organismo financiador: FIS - Instituto de Salud Carlos III PI070069

- **Convenio de colaboración para desarrollo de investigación pediátrica en enfermedades infecciosas Sanofi Pasteur MSD y fundación IDICHUS – G3VIP Y ReGALIP**

Fecha de inicio y finalización: 2007-2009

Investigador principal: Federico Martín Torres

Papel desarrollado: investigador colaborador

Presupuesto: 65.000 euros

Empresa/Administración financiera: Sanofi Pasteur MSD