

# Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante el período 1985 a 1992

Eddy Caro<sup>1</sup>, Isabel Martínez<sup>1</sup>, Mercedes Gutiérrez<sup>1</sup>, Niurys Núñez<sup>1</sup>, Lucía Rodríguez<sup>1</sup>, Franklin Sotolongo<sup>1</sup>, José Bravo<sup>2</sup>, Gaspar Loren<sup>3</sup>, Dominique Caugant<sup>4</sup>, Mónica Ginebra<sup>1</sup>, Nidia Rojas<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. La Habana, Cuba. E-mail: isamartinez@finlay.edu.cu

<sup>2</sup> Instituto Pedro Kourí (IPK). La Habana, Cuba.

<sup>3</sup> Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona, España.

<sup>4</sup> National Institute for Public Health. Oslo, Noruega.

<sup>5</sup> Facultad de Biología. Universidad de La Habana, Cuba.

Para estudiar la variabilidad genética y estructura poblacional de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en brotes y epidemias se utilizan actualmente marcadores genotípicos, que brindan una información más completa sobre la epidemiología de la enfermedad meningocócica (EM) y complementan la caracterización obtenida por otros marcadores utilizados tradicionalmente. El seguimiento epidemiológico de esta enfermedad es una importante tarea a desarrollar por el Instituto Finlay. Con este propósito se estudiaron 91 cepas epidémicas aisladas en el transcurso de los años 1985 a 1992. La identificación de género, especie y serogrupos se realizó por técnicas convencionales y en la clasificación de serosubtipos se empleó un ELISA de células enteras con anticuerpos monoclonales (AcMs). Se estudió además la sensibilidad y resistencia antimicrobiana a penicilina, cloranfenicol, sulfadiacina sódica, ciprofloxacina, rifampicina y ceftriaxona y se investigó por primera vez en nuestro país, el estudio de 14 enzimas obtenidas de lisados de las cepas. Se encontraron 26 tipos electroforéticos (ETs) entre las cepas cubanas, con predominio de los complejos ET-5 (67,0%) y A4 (3,3%). Sólo se detectó al serogrupo B, con predominio de los serotipos 4 (67,0%) y 15 (27,5%), junto a los subtipos P1.15, P1.10 y P1.16. La susceptibilidad intermedia (SI) a penicilina y resistencia (R) a sulfadiacina sódica fue del 80,0% y 42,8% respectivamente, al resto de las drogas todas las cepas se mostraron sensibles.

**Palabras claves:** *Neisseria meningitidis*, serogrupos, serotipos, subtipos, tipos electroforéticos, susceptibilidad antimicrobiana

## Introducción

Entre las enfermedades infecciosas que afectan actualmente a la humanidad, no cabe dudas de que la Enfermedad Meningocócica (EM) ocupa un lugar importante. Debido a la gravedad de su cuadro clínico, evolución severa, secuelas invalidantes y elevado número de muertes, el control y prevención de esta infección son aspectos vitales a tomar en cuenta frente a un brote o epidemia (1).

Por lo anteriormente expuesto, es preciso tomar medidas que permitan la vigilancia, control y prevención de esta infección bacteriana. Tomando en consideración el valor de sus marcadores epidemiológicos, el diagnóstico y caracterización de las cepas de *N. meningitidis* constituyen aspectos fundamentales. Esto permitirá trazar políticas adecuadas de prevención, donde la inmunización ocupa un lugar impostergable.

Inicialmente, *N. meningitidis* se clasificó en serogrupos, sobre la base de las características inmunológicas de sus polisacáridos capsulares. Posteriormente, el estudio de las proteínas de membrana externa (OMPs) y diferencias inmunológicas de sus lipo-oligosacáridos permitió establecer los serosubtipos e inmunotipos respectivamente (2). Además de estos marcadores, los patrones de sensibilidad y resistencia a drogas antimicrobianas útiles en el tratamiento y

prevención de esta enfermedad, constituyen aspectos esenciales a conocer ante un brote o epidemia de EM (3).

Estos marcadores adolecen de utilidad cuando se intentan detectar diferencias genotípicas entre las cepas aisladas; por lo que el desarrollo de técnicas capaces de detectar estas diferencias, adquiere gran importancia en la epidemiología moderna (4). En este sentido, los estudios de polimorfismo enzimático basados en la diferente movilidad electroforética de un grupo de enzimas citoplasmáticas, que se relacionan de manera directa con la variación de sus respectivos genes estructurales, brindan una información más completa sobre la variabilidad genética de las cepas aisladas (4).

La caracterización completa de cepas epidémicas es una información imprescindible en el momento de enfocar estrategias de producción y desarrollo de vacunas, pues se dispone así del dominio de la dinámica epidemiológica del agente causal, la que en el momento necesario permitirá valorar alternativas que respondan a las características de las cepas predominantes.

Tomando en consideración estos antecedentes, se profundizó en la caracterización de cepas aisladas en la epidemia de nuestro país, mediante el estudio de diferentes marcadores: serogrupos, serosubtipos, sensibilidad y resistencia a

diferentes drogas antimicrobianas, determinación de ETs y la asociación entre todos estos marcadores epidemiológicos.

## Materiales y Métodos

**Cepas:** se estudiaron 91 cepas de meningococo aisladas de casos clínicos notificados durante el período de 1985-1992. Todas pertenecían a la Colección de Cultivos Finlay y se conservaban liofilizadas.

En el estudio isoenzimático se utilizaron cepas patrones caracterizadas por la Dra. Dominique A. Caugant, del Instituto Nacional de Salud Pública de Oslo, Noruega. Como patrón del complejo ET-5 se emplearon las cepas C264/85 y C67/89; mientras que para los complejos ET-37 y A-4 se utilizaron las cepas A35/92, A64/92 y A33/93, A39/93, respectivamente. Se trabajó también con cepas recomendadas en la realización del ELISA de células enteras con AcMs y estudios de susceptibilidad antimicrobiana por dilución en agar (5,6).

**Identificación y confirmación:** Se hizo por tinción de Gram, producción de citocromo-oxidasa y catalasa, utilización de azúcares (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, fructosa, manitol), detección de la actividad  $\gamma$ -glutamyl-aminopeptidasa (*biomérieux*) y  $\beta$ -galactosidasa (ONPG) (7). La determinación de serogrupos se llevó a cabo por aglutinación en láminas con antiseros comerciales (Difco) y el serosubtipado se realizó por ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con AcMs (5).

**Susceptibilidad antimicrobiana:** Se estudió la sensibilidad y resistencia mediante el método de dilución en placas de agar, determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a penicilina, cloranfenicol, ceftriaxona, rifampicina, ciprofloxacina y sulfadiacina sódica, de acuerdo con la metodología del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) (6).

Se interpretó como CMI, la menor dilución de la droga capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se emplearon las categorías de sensible (S), susceptibilidad intermedia (SI) y resistente (R) de acuerdo con los rangos establecidos por la NCCLS (6).

**Determinación de ETs por estudios de isoenzimas:** El método de preparación de los extractos enzimáticos, electroforesis en gel de almidón y tinción específica de las 14 enzimas se realizó de acuerdo con Zelander y colaboradores (8). Se estudiaron las enzimas siguientes: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P), peptidasas (PEP), isocitrato deshidrogenasa (IDH), aconitasa (ACO), glutamato deshidrogenasa-NAD (GD1), alcohol deshidrogenasa (ADH), fumarasa (FUM), fosfatasa alcalina (ALK), indofenol oxidasa 1 (IP1), indofenol oxidasa 2 (IP2), adenilato kinasa (ADK) y deshidrogenasa desconocida (UDH).

**Lectura de los geles:** La movilidad electroforética se observó visualmente, comparando la movilidad relativa de los

electromorfos (alelos) para cada enzima. Cada alelo se numeró en orden decreciente de migración anódica, intercalando entre los extractos a estudiar, lisados de cepas con variante de electromorfo conocida para una enzima específica. Cada cepa se caracterizó por la combinación de electromorfos de las enzimas estudiadas, los que configuran un tipo electroforético (ET). Por tanto, cada ET agrupó las cepas que presentaron idéntica movilidad electroforética en todas las enzimas (8).

**Análisis de los resultados:** Los datos se expusieron en tablas de contingencia y se empleó como estimadores la media aritmética y proporciones, así como indicadores propios de la diversidad genética. Para las pruebas de comparación se utilizó el método  $\chi^2$  y los niveles de significación se situaron entre 0,05 y 0,01.

La diversidad genética se calculó empleando los paquetes estadísticos: ETDIV versión 2,2, desarrollado por el Dr. Whittam, del Departamento de Biología de la Universidad Estatal de Pennsylvania (8), donado por la Dra. Caugant y el paquete estadístico Estela versión 3,01, desarrollado por el Dr. Gaspar Loren de la Universidad de Barcelona (9), donado por el propio autor. El índice de asociación (IA) se calculó según Smith y colaboradores (10).

## Resultados

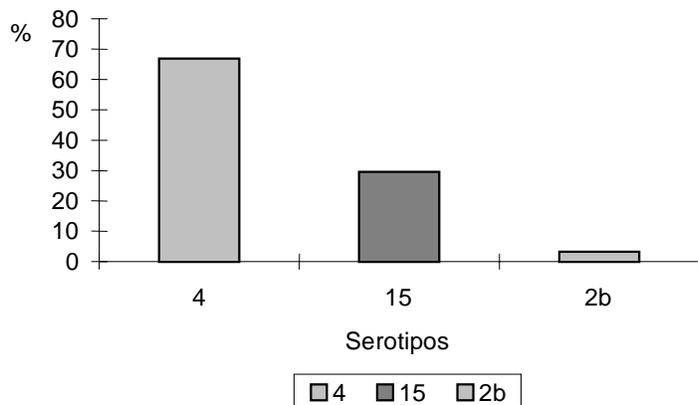
En todas las cepas (100%), se comprobó la presencia de actividad citocromo-oxidasa, catalasa,  $\gamma$ -glutamyl-aminopeptidasa, producción de ácido a partir de glucosa y maltosa y reacción positiva con el antisuero correspondiente al serogrupo B.

Al realizar la identificación de serosubtipos por ELISA de células enteras con AcMs se encontró la distribución siguiente: 61 cepas (67,0%) resultaron serotipo 4; 27 (29,6%) correspondieron al serotipo 15, y 3 cepas (3,2%) se identificaron como 2b (Figura 1). Mientras que en la clasificación de subtipos predominó el P1.15 (94,5%). (Tabla 1).

**Tabla 1. Subtipos detectados por ELISA de células enteras con AcMs de 91 cepas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**

Subtipos	n	%
P1.15	86	94,5
P1.10	3	3,3
P1.16	1	1,1
P1.SNT	1	1,1
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>100</b>

**Figura 1. Serotipos detectados por ELISA de células enteras con AcMs de 91 cepas epidémicas de *N. Meningitidis*. Cuba, 1985-1992**



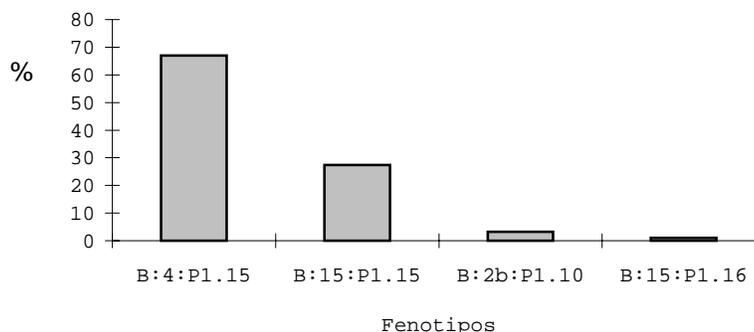
La asociación serosubtipo más frecuente fue la correspondiente al fenotipo B:4:P1.15. A éste correspondieron 61 cepas (67,0%), seguido del B:15: P1.15 (27,4%). Las cepas clasificadas como B: 2b:P1.10 y B: 15:P1.16 obtuvieron porcentajes bajos (Figura 2).

Se constató un porcentaje alto de cepas R a sulfadiacina sódica (80,2%), el que al relacionarlo con los ETs, mostró el mayor número de cepas dentro del complejo ET-5 (90,2%), en el cluster A-4 un 66,7% y a otros ETs el 59,3% (Figura 3).

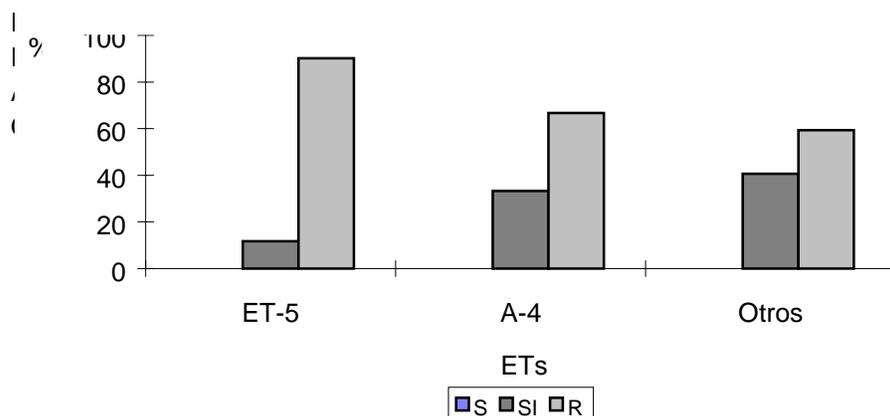
El comportamiento frente a las seis drogas investigadas se presenta en la (Figura 4). Exceptuando penicilina y sulfadiacina sódica, las cepas se mostraron muy sensibles al resto de las drogas.

Por primera vez en Cuba se realizó la caracterización de cepas epidémicas por la técnica de electroforesis de isoenzimas. Al complejo clonal ET-5 perteneció el 67,0% de las cepas, correspondiendo la mayoría de ellas a cepas R a sulfadiacina sódica (Tabla 2). Mientras que, en el cluster A-4, sólo se detectó un 3,3% y el resto perteneció a ETs no asociados a ninguno de los tipos predominantes, éstos se denominaron "otros" y mostraron gran diferencia en el perfil alélico de las 14 enzimas investigadas.

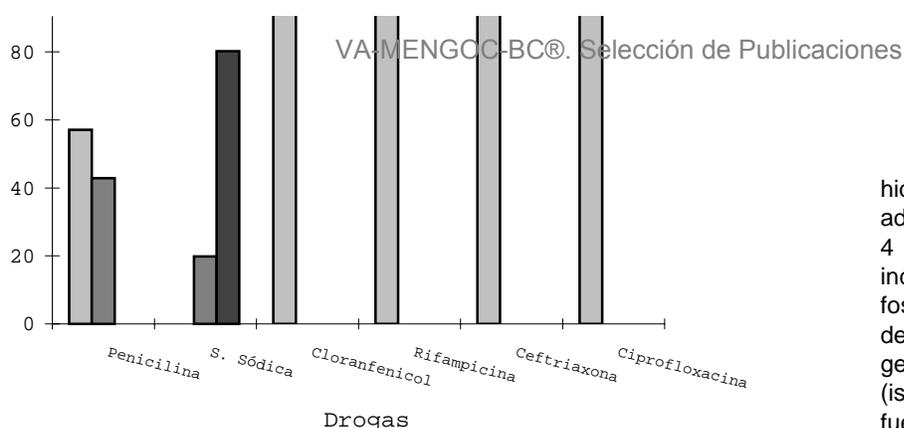
**Figura 2. Fenotipos de 91 cepas epidémicas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**



**Figura 3. Resistencia a sulfadiacina sódica y tipos electroforéticos (ETs) de 91 cepas epidémicas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**



**Figura 4. Susceptibilidad antimicrobiana de 91 cepas epidémicas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**



**Tabla 2. ETs de 91 cepas epidémicas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**

ET	n	%
ET-5	61	67,0
A-4	3	3,3
Otros	27	26,7
<b>Total</b>	<b>91</b>	<b>100,0</b>

En las 91 cepas caracterizadas por electroforesis de isoenzimas, las 14 enzimas fueron polimórficas: de 3 alelos (aconitasa, glutamato des-

hidrogenasa-1, indofenol oxidasa-2, adenilato kinasa, U-deshidrogenasa); 4 alelos (enzima málico, fumarasa, indofenol oxidasa-1); 5 alelos (glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa-2, alcohol deshidrogenasa); 7 alelos (pectidasa) y 8 alelos (isocitrato deshidrogenasa), ésta última fue la de mayor variabilidad. La media de alelos por locus fue de 4,4 y para la enzima alcohol deshidrogenasa se encontró la mayor frecuencia de alelos nulos (0,77), seguidos de la pectidasa y fumarasa (0,38).

El análisis de los perfiles electroforéticos se analizó y dio como resultado 26 ETs (Tabla 3). Entre estos, la media de diversidad genética ( $H$ ) por locus fue de 0,573 con un error estándar de 0,035. Este valor expresó la probabilidad de que dos ETs seleccionados aleatoriamente tuvieran diferentes electromorfos para una enzima dada. Entre los aislamientos, la diversidad genética fue de 0,343 con un error de 0,02.

**Tabla 3. Variantes alélicas para 14 enzimas y ETs de 91 cepas epidémicas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**

ET	Aisl. Ref.	n	ME	G6P	PEP	IDH	AC	GD1	GD2	ADH	FUM	ALK	IP1	IP2	ADK	UDH
1	206/92	1	1	1	1	8	4	2	3	2	1	1	2	3	2	3
2	103/91	1	1	1	2	1	4	1	0	2	3	4	1	3	2	3
3	E41/89	1	1	1	7	8	4	2	3	1	1	1	2	3	2	3
4	019/85	51	1	1	7	8	4	2	3	2	1	1	2	3	2	3
5	420/85	5	1	1	7	8	4	2	3	2	1	1	2	5	2	3
6	194/92	1	1	1	7	1	2	4	2	3	2	1	1	2	3	2
7	196/92	1	1	2	1	3	1	2	4	2	1	2	2	3	2	3
8	233/89	1	1	3	4	3	4	1	3	2	1	2	2	3	2	4
9	119/91	1	1	3	4	4	4	1	3	2	1	2	2	5	2	4
10	193/91	1	1	3	4	5	2	2	3	2	1	1	2	3	2	3
11	198/92	1	1	3	5	6	4	2	3	2	1	2	2	3	2	3
12	057/89	1	1	3	5	9	4	1	3	2	1	3	2	3	2	3
13	328/90	1	1	3	7	9	4	2	3	2	2	8	2	3	2	3
14	156/85	2	1	4	4	3	2	1	2	0	1	3	2	3	2	3
15	327/90	2	2	1	7	8	4	2	3	2	1	1	2	3	2	3
16	177/92	2	3	3	2	8	4	1	3	0	1	3	2	3	2	3
17	176/92	2	3	3	4	5	2	1	3	2	1	1	2	3	2	3
18	121/85	1	3	3	4	5	2	2	3	2	1	1	2	5	2	3
19	131/89	1	3	3	4	5	2	1	3	2	1	3	2	3	2	2
20	498/91	3	3	3	4	9	4	1	3	2	1	8	2	3	2	3
21	180/92	3	3	3	4	1	2	4	1	3	2	1	3	2	3	2
22	10/89	3	3	3	4	1	2	4	1	3	2	1	3	2	5	2
23	174/92	2	3	3	4	1	2	4	3	3	2	1	3	2	5	2
24	202/92	1	3	4	4	1	2	4	2	4	2	1	8	2	3	2
25	171/92	1	4	3	0	7	4	1	3	2	1	3	2	3	2	2
26	324/89	1	4	5	9	8	4	2	3	1	0	4	2	3	3	3

El análisis de cluster reveló que en 85 cepas, hubo divergencia a una distancia menor de 0,45, lo que indicó que las cepas tienen relación genética estrecha. El índice de asociación fue de 1,741.

**Tabla 4. Serotipos y subtipos en complejos clonales de 91 cepas epidémicas de *N. meningitidis*. Cuba, 1985-1992**

ETs	Serotipo	Subtipo	Número	%
A-4	2b	P1.10	3	3,3
	4	P1.15	57	62,6
ET-5	15	P1.15	3	3,3
		P1.16	1	1,1
Otros	4	P1.16	3	3,3
	15	P1.15	23	25,3
		P1.NT	1	1,1
<b>Total</b>			<b>91</b>	<b>100</b>

## Discusión

En Cuba, después de la inmunización masiva con la vacuna francesa A-C, se detectó el predominio de *N. meningitidis* grupo B. (11). En este trabajo se incluyeron cepas aisladas en distintas regiones durante 1985-1992, conservadas por liofilización en la Subcolección 1 de la Colección de Cultivos Finlay. En la mayoría de las cepas aisladas durante esa etapa, se conocía el serogrupo y patrones electroforéticos de sus OMPs (12), pero se desconocía el comportamiento de estas cepas en relación con estudios isoenzimáticos y la asociación de los ETs a la clasificación de serosubtipos y a los patrones de sensibilidad y resistencia a drogas antimicrobianas.

Todas las cepas resultaron serogrupo B y aunque su número no constituyó una representación estadística del total de cepas aisladas en esa etapa, se puede pensar de que estas sean una muestra elocuente del predominio del grupo B durante el período prevacunal de VA-MENGOC-BC® (11). Posterior a la vacunación hubo reducción de la incidencia de EM en nuestro país, la que mostró tasas de 0,6 y 0,4 /100000 habitantes en 1997 y 1998 respectivamente (13).

Desde la etapa de inmunización con VA-MENGOC-BC®, no se aíslan cepas de *N. meningitidis* serogrupo C. Sin embargo, es necesario conocer si éste aún persiste en portadores y qué nivel de incidencia tiene actualmente. Recientemente se realizó un estudio longitudinal de portadores, durante cuatro meses consecutivos, a 163 adultos jóvenes matriculados en una escuela militar de Ciudad de La Habana y en el mismo no se detectaron cepas serogrupo C (14).

Desde que comenzó en nuestro país el predominio del serogrupo B, este se asoció fundamentalmente al patrón electroforético tipo IV descrito por Frash (2). En aquel período no se disponía de AcMs para la clasificación de serosubtipos. Cuando comenzó en Cuba el estudio de cepas por ELISA de células enteras con AcMs, se comprobó la correspondencia de este tipo electroforético con el AcM serotipo 4 (12).

El serotipo 4 se describe como agente etiológico de un número importante de casos clínicos de EM en diferentes partes del mundo. Entre estos se encuentran España y Brasil (15). La asociación del serotipo 4 al subtipo 15 predominó en Cuba durante la etapa epidémica (12), y así se constató en este trabajo. Por ser nuestro país una isla, su condición geográfica puede propiciar una circulación homogénea de cepas. No obstante, se requiere conocer lo que sucede actualmente.

Hubo cepas con SI a penicilina, fenómeno ya descrito en otros trabajos realizados en Cuba (16). Este hallazgo se ha convertido en un hecho universal y creciente, desde que cepas con estas características se notificaron en España (17). La SI a penicilina adquiere importancia clínica por la posible aparición de fallos terapéuticos que puede traer aparejado.

En otros trabajos realizados en Cuba, se hace referencia al alto porcentaje de cepas R a sulfadiacina sódica y su relación al fenotipo B:4:P1.15 en cepas aisladas durante la epidemia (16), pero se desconocía su relación con resultados obtenidos por estudios isoenzimáticos. En el caso específico de Cuba, circula predominantemente el complejo ET-5 y en este se describe una fuerte asociación con altos niveles de resistencia a sulfadiacina (18). Actualmente, más del 90% de cepas pertenecientes al complejo ET-5 muestran resistencia a esta droga (15).

El cambio en la política de antimicrobianos en la profilaxis de la EM, podría condicionar la reaparición de cepas sensibles a sulfadiacina sódica. Por tanto, es imprescindible continuar el estudio de este marcador, ya que la mayoría de los reportes que anteceden a la dispersión de este clon se refieren a cepas sensibles (19).

Hasta la fecha, en Cuba se utilizaron métodos de tipificación basados en caracteres fenotípicos, los cuales tienen carácter limitado cuando se necesita estudiar la estructura genética de una población bacteriana, o cambios ocurridos durante brotes y epidemias (4).

En este trabajo predominó el complejo ET-5, correspondiendo la mayoría a cepas R a sulfadiacina sódica. Hasta la fecha, no se había realizado un estudio de cepas epidémicas por este método de tipaje molecular. Si bien, se había descrito este complejo clonal en 7 cepas epidémicas remitidas al Instituto Nacional de Oslo, Noruega (20), hasta el presente no se había verificado su predominio en un grupo grande de aislamientos.

Las cepas serogrupo B, pertenecientes al complejo ET-5, no se habían detectado antes de la década del 70. Desde esa etapa, han sido responsable de un número elevado de casos de EM en muchos países (20, 21).

El cluster A-4 ha sido también responsable de brotes epidémicos y se describe como un clon perteneciente fundamentalmente al serogrupo B y serotipo 2b, aislado en Estados Unidos y Africa del Sur (20).

Hasta el momento, se desconocía con exactitud las características de las cepas aisladas en Cuba sobre la base

de un análisis integral, que relacionara los tradicionales marcadores fenotípicos con métodos modernos en el estudio epidemiológico de enfermedades infecciosas. La información obtenida mediante estudios isoenzimáticos, permite establecer los nexos genéticos, además de dar a conocer la estructura de la población investigada, ofrece la posibilidad de estudiar, sobre la base de un análisis que supera los marcadores fenotípicos, las diferencias entre aislamientos muy cercanos genéticamente (4).

Quedan aún por esclarecer muchos aspectos de la EM. Relacionar los conocimientos existentes con los que brindan las técnicas modernas de epidemiología molecular, no sólo evidencian una dialéctica en el desarrollo científico, sino también una necesidad ineludible en el intento de responder interrogantes sobre esta enfermedad.

Continuar profundizando en su estudio constituye un reto y tarea permanente, junto al desarrollo de nuevos preparados vacunales y mejoramiento de los ya existentes, para garantizar el control eficaz de brotes y reaparición de nuevas epidemias.

## Referencias

1. WHO. Control of Epidemic Meningococcal Disease. *WHO Practical Guidelines*. Second Edition. Geneva, 1998.
2. Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotypes antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis*. 1985; 7:504.
3. Saéz-Nieto JA. Resistencia a antimicrobianos en meningococo. *Boletín Microbiológico Semanal*. LNRM. Majadahonda. 1989:11-12.
4. Caugant DA. Populations genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS*. 1998;106:505-525.
5. Abdillahi H and Poolman JT. Wole-Cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Letters*. 1987;48: 367-371.
6. National Committee from Clinical Laboratory Standard. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Americans National Standards Institute, 1997.
7. Sotolongo F, Patton AS, Martínez I, Sampedro MC, Malberty JA, García AM et al. *Neisseria meningitidis*. Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Serie Monográfica. Ediciones Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba. 1995.
8. Selander RK, Caugant DA, Ochamn H, Musser JM, Gilmour MN, Whittan TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial populations genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986;51:873-884.
9. Fusté MC, Pineda MA, Palomar JM, Viñas M, Loren JG. Clonality of multidrug resistant nontypeable strains of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1996; 2760-2765.
10. Smith MJ, Smith NH, O' Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:8988-8992.
11. Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La Enfermedad Meningocócica en Cuba, Cronología de una epidemia. *ECIMED*. Cuba, 1991.
12. Martínez I, Patton AS, Sotolongo F, Llop A, Sosa J. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B. *Acta Científica SVBE*. 1996;3(1):31-34.
13. MINSAP. Principales indicadores y otros datos de salud. Programa de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles. MINSAP. Ciudad de La Habana, Cuba. 1998:21-23.
14. Ivón M. Ensayo de una nueva metodología en la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis*. Trabajo para optar por el Título de Especialista de Primer Grado en Microbiología, IPK-Instituto Finlay, La Habana, Cuba. 1998.
15. Caugant DA, Froholm LO, Selander RK, Bovre K. Sulfonamide resistance in *Neisseria meningitidis* isolates of clones of ET-5 complex. *APMIS*:9. 1987:425-428.
16. Martínez I, Patton AS, Sotolongo F, Llop A, Sosa J. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* serogrupo B. *Acta Científica SVBE*. 1994;3(1):31-34.
17. Saéz-Nieto JA, Lujan R, Sonsoles B, Campos J, Viñas M, Fusté C et al. Epidemiology and molecular basis of penicillin resistant *Neisseria meningitidis* in Spain: A 5-year history (1985-1989). *CID*. 1992;14:394-402.

18. Caugant DA, Bol P, Hoyby EA, Zanen HC, Froholm LO. Clones of serogroup B *Neisseria meningitidis* causing systemic disease in The Netherlands, 1958-1986. *J. Infect. Dis.* 1990;162:867-874.
19. Jackson LA and Wenger JD. Laboratory based surveillance for meningococcal disease in selected areas, United States, 1989-1991. *MMWR.* 1993;42:21-30.
20. Caugant DA, Mocca LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype and outer membrane protein patten. *J. Bacteriol.* 1987; 169:2781-2791.
21. Caugant DA, Froholm LO, Sacchi CT, Selander RK. Genetic structure and epidemiology of serogroup B *Neisseria meningitidis*. In: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiensen B. eds. *Neisseriae 1990*. Berlin: Walter de Gruyter. 1991:37-42.

## Epidemiological markers of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba during the 1985-1992 period

### Abstract

Genotypic markers, that give a more complete information on the epidemiology of meningococcal disease (MD) and complement the characterization obtained with the other traditional markers, are used to study the genetic variability and population structure of *Neisseria meningitidis* strains isolated in outbursts and epidemics. The epidemiological follow-up of the disease is an important task carried out by Finlay Institute. For this purpose 91 epidemic strains isolated from 1985 to 1992 were studied. The identification by genus, species and serogroups was carried out by conventional techniques and, for the classification in sero/subtypes, a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies (AcMs) was used. Sensitivity and resistance against penicillin, chloramphenicol, sodium sulphadiazine, ciproflaxin, rifampin and ceftriaxone and the study of 14 enzymes obtained from strain lysates was carried out for the first time in our country. Among the Cuban strains 26 electrophoretic types (ETs) were found with complexes ET-5 (67,0%) and A4 (3,3%) prevailing. Only serogroup B was detected with predominance of serotypes 4 (67,0%) and 15 (27,5%), together with subtypes P1.15, P1.10 and P1.16. Moderate susceptibility (MS) to penicillin and resistance (R) to sodium sulphadiazine were respectively of 80,0 and 42,8%. All strains were sensitive to the rest of the drugs.

**Key words:** *Neisseria meningitidis*, serogroups, serotypes, subtypes, electrophoretic t