

# Serogrupos, serosubtipos, inmunotipos y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores

Leydis Zamora, Isabel Martínez, Mercedes Gutiérrez, Niuris Núñez, Mónica Ginebra, Yanet Climent, Franklin Sotolongo, María Amalia Camaraza

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: lzamora@finlay.edu.cu

Teniendo en cuenta el papel fundamental que desempeñan los portadores asintomáticos de *Neisseria meningitidis* en la transmisión de la enfermedad meningocócica, se hace necesario profundizar en los aspectos relacionados con la caracterización fenotípica de este microorganismo. Con el propósito de contribuir a la identificación de cepas circulantes actualmente en nuestro país, se clasificaron 32 cepas de *N. meningitidis* aisladas en estudiantes del politécnico de oficios electromecánicos "Rodolfo Ramírez Esquivel", de la provincia de Ciego de Avila. La identificación en género, especie y serogrupos, se realizó por métodos convencionales y para la clasificación en serosubtipos e inmunotipos se empleó un ELISA de células enteras con AcM. Se estudió la susceptibilidad antimicrobiana mediante el método de dilución en agar, determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de la penicilina, cloranfenicol, ciprofloxacina, sulfonamida, rifampicina y ceftriaxona. Predominaron las cepas NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (22,8%), el 82% de las cepas fue resistente a la sulfonamida y el 13% mostró sensibilidad disminuida a la penicilina.

**Palabras claves:** Serogrupos, serotipos, subtipos, inmunotipos, susceptibilidad.

## Introducción

La enfermedad meningocócica es una enfermedad infectocontagiosa de distribución mundial que constituye un serio problema de salud, de ahí que se dediquen cuantiosos recursos para evitar la aparición de brotes y epidemias, eventos que cuando se presentan afectan grandes poblaciones humanas, fundamentalmente la infantil.

*Neisseria meningitidis* es el agente etiológico de esta enfermedad y responsable de uno de cada tres casos de las meningitis bacteriana que se reportan en el mundo. En la actualidad quedan aún por conocer aspectos de su epidemiología, patogenia, factores de virulencia, y los relacionados con su persistencia asintomática o diseminación epidémica (1).

Los portadores nasofaríngeos de *N. meningitidis* constituyen el reservorio de este microorganismo y permiten la diseminación de la enfermedad meningocócica por este motivo, las investigaciones encaminadas a conocer la prevalencia de portadores adquieren gran importancia al contribuir al esclarecimiento de la dinámica de transmisión entre este microorganismo y el hospedero susceptible (2).

Identificar los marcadores fenotípicos de las cepas aisladas en portadores constituye uno de

los objetivos fundamentales para conocer las características de las cepas circulantes. Entre estos marcadores se encuentran el serogrupo, serotipo, subtipo, inmunotipo, y la resistencia a la sulfadiazina sódica. El comportamiento de *N. meningitidis* frente a la penicilina (droga de elección en la terapéutica de la enfermedad meningocócica), también adquiere actualmente un papel relevante como marcador (3).

Con este trabajo nos propusimos estudiar los principales marcadores fenotípicos de cepas de *N. meningitidis* aisladas en estudiantes de una Escuela Politécnica perteneciente a la provincia de Ciego de Avila, así como determinar su susceptibilidad frente a los principales agentes antimicrobianos de uso terapéutico y quimioprolifáctico.

## Métodos

Se estudiaron 32 cepas de *N. meningitidis* aisladas en estudiantes con edades comprendidas entre 14 y 17 años, alumnos del politécnico de oficios electromecánicos "Rodolfo Ramírez Esquivel", de la provincia de Ciego de Ávila. Las cepas fueron trasladadas en medio de transporte y conservación (TC) al Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Asistencia Científica Técnica Aplicada (DACTA) del Instituto Finlay.

La identificación en género y especie se realizó mediante las pruebas bioquímicas y enzimáticas convencionales y para la seroagrupación se empleó la aglutinación en lámina con antisueros específicos (4). Los serosubtipos e inmutotipos se determinaron mediante ELISA de células enteras con un Kit comercial de AcM del Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente (RIVM) de acuerdo con la metodología descrita por Abdillahi y Poolman (5).

La susceptibilidad antimicrobiana a la penicilina, sulfadiacina, cloranfenicol, rifampicina, ceftriaxona y ciprofloxacina se determinó por el método de dilución en placas de agar determinando las CMI para cada antimicrobiano según las normas establecidas por el Comité Nacional de Estándares de Laboratorios Clínicos (NCCLS) (6).

Se interpretó como CMI, la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se emplearon las categorías de sensible (S), sensibilidad intermedia (SI) y resistente (R), según los rangos descritos por la NCCLS para cada antimicrobiano investigado (6).

## Resultados

En todas las cepas se comprobó la presencia de diplococos gramnegativos arriñonados, actividad citocromo-oxidasa, catalasa,  $\gamma$ -glutamyl aminopeptidasa, así como la producción de ácido a partir de los azúcares glucosa y maltosa.

Predominaron las cepas no agrupables (NA) seguidas por el serogrupo B; 26 cepas (81,3%) resultaron NA; 5 (15,6%) serogrupo B y una cepa (3,1%) resultó serogrupo Z.

La mitad de los aislamientos (50%) resultaron no tipables (NT), mientras que el 25% perteneció al serotipo 4 (21,9% al 15%) y una cepa (3,1%) serotipo 1.

Respecto a los subtipos se observó un comportamiento variable. Hubo un 31,2% de cepas no subtipables (NST) y el resto mostró los siguientes resultados: P1.4 (3,1%); P1.5 (15,6%); P1.6 (6,3%); P1.7 (9,4%); P1.7,13 (3,1 %); P1.12 (3,1%); P1.13 (6,3%); P1.14 (9,4%) y P1.15 (12,5%).

De acuerdo con los determinantes de lipopolisacáridos (LPS), el mayor porcentaje de cepas reaccionó con el complejo L3,7,9 (68,7%)

y en el resto se detectaron porcentajes más bajos. El 15,6% resultó no inmutotipable (NIT), el 6,3% L10, al igual que la combinación L3,7,9,8 y una cepa (3,1%) resultó L3,7,9,10.

Prevalció la combinación fenotípica NA:NT:P1.1.NST:L:3,7,9 y se detectó una gran variedad de otras combinaciones (Tabla 1).

**Tabla 1. Serogrupos, serosubtipos e inmutotipos detectados en cepas de *N. meningitidis* aisladas en portadores**

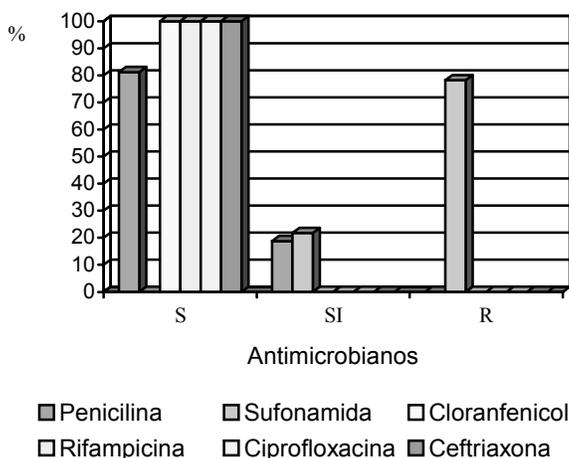
Caracterización	No. de cepas	Porcentajes (%)
NA:4:P1.4L10	1	3,1
NA:NT:P1.1.NST:LNIT	2	6,2
NA:15:P1.14:LNIT	3	9,4
NA:NT:P1.12:L3,7,9	1	3,1
NA:4:P1.7:L10	1	3,1
B:15:P1.NST:L3,7,9	1	3,1
NA:1:P1.5:L3,7,9	1	3,1
NA:NT:P1.5:L3,7,9	2	6,2
NA:4:P1.5:L3,7,9	1	3,1
	4	12,5
NA:NT:P1.NST:L3,7,9	1	3,1
NA:15:P1.NST:L3,7,9		
B:4:P1.NST:L3,7,9	1	3,1
NA:NT:P1.7:L3,7,9	2	6,2
	1	3,1
NA:NT:P1.5:L3,7,9,10		
NA:15:P1.6:L3,7,9	2	6,2
	1	3,1
NA:NT:P1.7,13:L3,7,9		
NA:NT:P1.13:L3,7,9	2	6,2
Z:NT: P1.NST:L3,7,9	1	3,1
B:4:P1.15:L3,7,9	1	3,1
NA:4:P1.15:L3,7,9	1	3,1
B:4:P1.15:L:3,7,9,8	1	3,1

B:4:P1.15:L3,7,9,8	1	3,1
--------------------	---	-----

Al analizar la susceptibilidad a los antimicrobianos detectamos que 26 cepas (81,2%) fueron S a la penicilina (CMI  $\leq$  0,063  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 6 (18,8%) mostraron SI (CMI = 0,125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y no hubo

cepas R. Frente a la sulfonamida predominaron las cepas R (78,2%) (CMI  $>$  25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 21,8% mostró SI (CMI = 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y no hubo cepas S. Al resto de los antimicrobianos las cepas se mostraron sensibles (Gráfico 1).

**Figura 1. Susceptibilidad de cepas de *N. meningitidis* frente a los antimicrobianos estudiados**



Al analizar los serotipos observamos correspondencia con los resultados obtenidos por Martínez y colaboradores en su estudio realizado en 1998 a adultos jóvenes de una escuela militar, donde un elevado porcentaje de cepas resultan NT y detectan bajos porcentajes de los serotipos 4, 14 y 15 (10). El serotipo 4 en Cuba predominó en cepas aisladas de enfermos y portadores de la etapa epidémica. La variabilidad encontrada entre los subtipos y el predominio de cepas NST se reporta también en Cuba por Martínez en las cepas de portadores investigadas (10). Sin embargo, Caro y colaboradores detectan en cepas aisladas en Cuba entre 1985-1992, sólo 4 subtipos diferentes (P1.15; P1.10; P1.16 y P1.NST), con el predominio del P1.15, pero, es importante señalar que su trabajo se basa fundamentalmente en cepas aisladas de casos clínicos del período epidémico (11). Con respecto a los inmunotipos, aunque detectamos un elevado porcentaje de cepas que reaccionaron con el complejo L3,7,9 algunos autores reportan un predominio de los inmunotipos L1 y L8 en cepas de portadores (12), esta diferencia pudiera explicarse teniendo en cuenta que los

meningococos frecuentemente expresan varios inmunotipos y que esta expresión se ve influenciada por las condiciones de crecimiento de las cepas (13).

Al analizar la susceptibilidad antimicrobiana existió un predominio de cepas S a la penicilina, aunque hubo cepas con SI. En Cuba, la penicilina constituye el antimicrobiano de elección en el tratamiento de la enfermedad meningocócica, por esta razón se debe seguir investigando *in vitro* el comportamiento de las cepas frente a este agente, ya que la presión selectiva puede condicionar la emergencia de cepas resistentes a este antimicrobiano. En Cuba también se ha detectado el predominio de cepas R a la sulfonamida, sin embargo, trabajos realizados recientemente señalan una tendencia en la disminución de los niveles de resistencia (14). En cepas aisladas durante la epidemia en Cuba, el porcentaje de R sobrepasa el 80%, sin embargo, aislamientos recientes muestran porcentajes inferiores (14). Al resto de los antimicrobianos investigados las cepas se mostraron S. No obstante recientemente, la resistencia de *N. meningitidis* al cloranfenicol emerge y se debe a

## Discusión

Estudios realizados en Cuba durante 1979 reflejan un predominio del serogrupo B (7), situación que persiste en el período epidémico (8). Investigaciones de portadores realizadas posterior a la vacunación con VA-MENGOC-BC® comienzan a mostrar una situación diferente, en estos predominan las cepas NA, se detectan pocos aislamientos del serogrupo B y no se aísla el serogrupo C (9). El predominio de cepas NA en nuestro estudio, pudiera estar relacionado con una mayor circulación de cepas no virulentas durante los períodos endémicos.

la producción de cloranfenicol acetiltransferasa. La rifampicina por el elevado porcentaje de erradicación que produce entre los portadores nasofaríngeos está entre los quimioprofilácticos recomendados, aunque desde la década pasada algunos investigadores señalan cepas resistentes (15). Desde hace algunos años las cefalosporinas de tercera generación se emplean en el tratamiento y profilaxis de la enfermedad meningocócica y hasta la fecha, al igual que nuestros resultados, muchos países reportan cepas muy sensibles (16). La ciprofloxacina por alcanzar altas concentraciones en saliva y amígdalas, es capaz de erradicar con una sola dosis el 97% de los portadores asintomáticos, propiedad que la sitúa actualmente como un buen quimioprofiláctico (17).

## Referencias

- Gotschlich EC. Meningococcal meningitis. In: Bacterial Vaccines. New York. Ed. R. Germanier; 1990: 237-255.
- Broome CV. The carrier state: *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother*. 1986; 18 (Suppl A): 25-34.
- Pérez CA, Pérez AMC, Sáez-Nieto JA. Genetic transformation of penicillin susceptible. *Neisseria meningitidis* with *Neisseria perflava/sicca* moderately resistant to penicillin and pen A gene sequences of transformantes. *Rev Esp Quimiot*. 1997.
- Sotolongo F, Patton AS, Martínez I, Sampedro MC, Marberty JA, García AM et al. *Neisseria meningitidis*. Aspectos teórico - prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 3era. ed. La Habana: Ediciones Finlay; 1994.
- Abdillahi H, Poolman JT. Whole cells ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Letters*. 1987; 48:367-371.
- NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standard. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that Grow Aerobically. American National Standards Institute. 1999.
- Valcarcel NM. Prevalencia de *Neisseria meningitidis* en portadores escolares y niños de círculos infantiles del municipio Artemisa. [Trabajo para optar por el título de Especialista de 1er grado en Epidemiología]. Ciudad de La Habana. 1979.
- Valcárcel M, Rodríguez R, Terry H. *La Enfermedad Meningocócica en Cuba. Cronología de una Epidemia*. 1ra ed. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas de Cuba; 1991:319-397.
- Fernández CJA. Cinética de la actividad bactericida sérica y los isotipos IgA e IgM estimulados por los componentes inmunogénicos de la vacuna meningocócica VA-MENGOC-BC®. [Trabajo de Terminación de residencia en Inmunología]. Ciudad de La Habana; 1994.
- Martínez I, Matute I, Gutiérrez M, Núñez N, Sotolongo F, García D, et al. Ensayo de un diseño metodológico para la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis*. *VacchiMonitor*. 1999; 8(12):2-9.
- Caro E, Martínez I, Gutiérrez M, Núñez N, Rodríguez L, Sotolongo F, et al. Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante el período 1985-1992. *VacchiMonitor*. 2000;9(1):5-11.
- Acanda Pozo ME. Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales [Trabajo para optar por el título de Máster en Microbiología. Perfil Bacteriología-Micología]. Ciudad de La Habana; 1997.
- Sholten RJPM. Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by whole cell ELISA with monoclonal antibodies. *J Med Microbiol*. 1994; 41 (4): 236-243.
- Martínez I, García D, Sotolongo F, Gutiérrez M, Matute I, Nuñez N, et al. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. *VacchiMonitor*. 2000; 9(2):7-13
- Blondeau JM, Ashton M, Isaacson Y, Anderson C, Ducasse G. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin in Saskatchewan, Canada. *J. Clin. Microbiol*. 1995; 33:1784-1786.
- Palmeiro S, Almiron M, Regueira M. Prevalencia de sero/subtipos de *Neisseria meningitidis* en Argentina entre 1994-1995. XIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Buenos Aires, Argentina. 1996:212-213.
- Gaunt PN, Lambert BE. Single dose ciprofloxacin for the eradication of pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. *J. Antimicrob. Chemother*. 1988; 21:489-496.

**Serogroups, serosubtypes, immunotypes and susceptibility antimicrobial of *Neisseria meningitidis* strains isolated from carriers****Abstract**

Considering the fundamental role played by asymptomatic *Neisseria meningitidis* carriers in the transmission of the meningococcal disease, it is necessary to study the issues related to the phenotypical characterization of this microorganism more deeply. With the purpose of contributing to the identification of the strains present circulating in our country, 32 strains of *N. meningitidis* isolated in students from a Polytechnical Institute in the Province of Ciego de Avila were classified. The identification by genus, species and serogroups was carried out by conventional methods and for the classification into sero/subtypes and immunotypes a whole-cell ELISA with Mabs was used. The antimicrobial susceptibility was studied by the agar dilution method, determining the MIC for penicillin, cloramphenicol, ciprofloxacin, sulfonamide, rifampicin and ceftriaxone. The NA:NT:P1.NST:L3,7,9 strains predominated at (22,8%). An 82% of the strains was sulfonamide resistant, and 13% showed decreased sensitivity to penicillin.

**Keywords:** Serogroups, serotypes, subtypes, immunotypes, susceptibility