

# Caracterización fenotípica de cepas invasivas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante 20 años

Isabel Martínez, Gustavo Sierra, Niury Núñez, Luis Izquierdo, Yanet Climen, Mayelín Mirabal.

Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. A.P. 16017, C.P.11600, Ciudad de La Habana, Cuba. E-mail: isabelm.motas@infomed.sld.cu; isamartinez@finlay.edu.cu

Se investigaron los marcadores epidemiológicos (serogrupos, serotipos, subtipos, inmunotipos) de 429 cepas invasivas, aisladas en Cuba durante 20 años (1982-2002). Basándonos en el comportamiento de la incidencia de la Enfermedad Meningocócica (EM) en el período investigado, las cepas se distribuyeron en dos etapas: epidémica y postepidémica. La epidémica, comprendió 279 cepas aisladas entre 1982-1992 y la postepidémica, incluyó 150 aislamientos pertenecientes al período comprendido entre 1993-2002. Todas se cultivaron en Agar Mueller Hinton con suero fetal bovino (5%) y se incubaron 24-48 horas, 37 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. La identificación de género, especie y serogrupo, se realizó mediante métodos convencionales; para la caracterización de los sero/subtipos e inmunotipos, se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales. En ambas etapas predominó el serogrupo B (97,90%): epidémica (96,77%) y postepidémica (100%). Sin embargo, el serogrupo C (1,43%) y cepas no agrupables (1,8%), sólo se observaron en aislamientos de la etapa epidémica. Los otros marcadores prevalentes fueron: serotipo 4 (86,48%), subtipo P1.19,15 (78,32%), inmunotipo L3,7,9 (90,2% ), todos mostraron cifras similares en ambos períodos. Predominó el fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 (69,69%), aunque, en la etapa postepidémica (77,34%), el porcentaje fue superior al de la etapa epidémica (65,66%) (p<0,05); además, en las cepas de este período, se observó una mayor diversidad de asociaciones fenotípicas. Los resultados obtenidos de esta caracterización fenotípica de las cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de enfermos aporta datos valiosos al estudio, prevención y control exitoso de la EM en Cuba.

**Palabras clave:** *Neisseria meningitidis*, enfermedad meningocócica, enfermos, marcadores epidemiológicos, fenotipos, vacuna antimeningocócica

## Introducción

Después de transcurrir más de 200 años de investigación sobre el comportamiento de la enfermedad meningocócica (EM), esta entidad clínica constituye aún un problema de salud para muchas regiones del mundo. Su agente etiológico, *Neisseria meningitidis*, coloniza la nasofaringe humana, sin provocar, en la mayoría de los casos, signos clínicos evidentes de infección (1). En períodos endémicos, entre el 5-40% de la población puede ser portadora asintomática y constituir un elemento crucial para la diseminación de este microorganismo. Una minoría de los sujetos colonizados desarrollan alguna de las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad (2). La elevada morbilidad y temibles secuelas que produce la EM obliga a tomar medidas útiles para evitar y controlar la diseminación de brotes y/o epidemias (3).

La caracterización fenotípica de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores, sobre la base de sus marcadores epidemiológicos (serogrupo, serotipo, subtipo e inmunotipo), resulta una medida imprescindible para trazar una política adecuada de prevención, donde la vacunación ocupa un lugar impostergable (3,4). Inicialmente, las diferencias estructurales del polisacárido capsular (PC), permitieron la clasificación de *N. meningitidis* en serogrupos, posteriormente, el estudio de proteínas de membrana externa (PME) y lipooligosacáridos (LOS) posibilitaron la identificación de serotipos, subtipos e inmunotipos, respectivamente (4). Actualmente, la aplicación de los métodos moleculares, detecta las diferencias genéticas entre las cepas circulantes y amplía la información que brindan los métodos fenotípicos (5).

Los serogrupos A, B, C, Y, W-135, ocasionan la mayoría de los casos invasivos (1). La región del África Subsahariana, conocida como “cinturón de la meningitis”, presenta brotes recurrentes por *N. meningitidis* A (6) y recientemente notifican también la emergencia del W-135 (7). En Europa occidental y Estados Unidos prevalecen los serogrupos B y C. Sin embargo, a partir de la década del 90, Estados Unidos muestra el aumento de casos esporádicos y brotes ocasionados por *N. meningitidis* Y (1, 9).

Desde 1916, año a partir del cual se describen los primeros casos de EM en Cuba, hasta 1976, esta entidad clínica tuvo un comportamiento endémico y no constituyó un problema de salud. Sin embargo, en mayo de 1976, se observó el ascenso de casos invasivos y en 1979, predominaban los serogrupo C (50,9%) y B (34,3%), excepto en las provincias de mayor incidencia, donde prevalecía *N. meningitidis* B (10,11). Para controlar esta epidemia, en 1979, se aplicó la vacuna antimeningocócica A-C, en toda la población de 3 meses-19 años, intervención que disminuyó los casos del serogrupo C. Sin embargo, *N. meningitidis* B, ascendió vertiginosamente y la EM se convirtió en el principal problema de salud de Cuba. Se demostró que, en ese momento, el serogrupo B era el principal responsable de la epidemia, con el pico máximo de incidencia en 1983 (14,4 x 100 000 hab.). No obstante, en menores de un año, era superior (120/100 000 hab.) (11, 12, 13, 14). Por la situación epidémica existente y no disponer en ese momento de ningún preparado vacunal contra *N. meningitidis* B, se desarrolló y obtuvo VA-MENGOC-BC®, vacuna contra los serogrupos B y C. Después

de su evaluación, se realizó un ensayo de Fase III en el que participaron siete provincias del país, donde se inmunizaron 106 000 escolares de 10-16 años. La prueba se efectuó de manera randomizada, a doble ciego y con un grupo placebo como control. Los resultados alcanzados demostraron el impacto de VA-MENGOC-BC® entre los adolescentes vacunados (eficacia clínica del 83%), la disminución de la morbilidad en niños de 0-5 años y el descenso de la letalidad (12, 13). Después de transcurrir 20 años de la aplicación de VA-MENGOC-BC® en Cuba y 13 años de su incorporación al Programa Nacional de Inmunización (PNI), la EM no constituye un problema de salud actualmente, muestra cifras endémicas (0,3/100 00 habitantes) y sólo se notifican casos aislados (14).

Los cambios ocurridos en el comportamiento de la EM con la aplicación de la vacuna cubana nos motivó a identificar los marcadores epidemiológicos de las cepas invasivas recibidas en el Instituto Finlay durante 20 años (1982-2002). Los resultados obtenidos, junto al análisis de los mismos profundizan en el conocimiento de la dinámica epidemiológica de las cepas circulantes en Cuba y resultan imprescindibles para el estudio integral de la EM en este país.

## Materiales y métodos

### Cepas de *N. meningitidis*

Entre 1982-2002, el Laboratorio de Microbiología del Instituto Finlay recibió 429 cepas de *N. meningitidis* aisladas de casos clínicos invasivos en diferentes regiones del país. Estas cepas se caracterizaron, liofilizaron y almacenaron para estudios posteriores en el Departamento de Colecciones de Cultivo del Instituto Finlay. En el momento de su recepción se identificaron en género, especie y serogrupo, según métodos convencionales (15); posteriormente se clasificaron los serotipos, subtipos e inmunotipos (16). Para su estudio las cepas se cultivaron en placas Petri de Agar Mueller Hinton (Merck), más suero fetal bovino al 5% (Hyclone), se incubaron 24-48 h a 37 °C, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y posteriormente se realizó la lectura.

### Clasificación serológica

*N. meningitidis* se clasificó en serogrupos por aglutinación en lámina portaobjetos con antisueros comerciales: A, B, C, X, Y, Z y W-135 (Difco) (15). Mientras que, para la identificación de serotipos, subtipos e inmunotipos se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales (AcM) (16). Para la clasificación de los sero/subtipos se empleó el panel comercial de AcM del RIVM (Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente, de Holanda), que incluyó seis AcM de serotipos (1, 2a, 2b, 4, 14, 15) y 13 de subtipos (P1.1, P1.2, P1.4, P1.5, P1.6, P1.7, P1.9, P1.10, P1.12, P1.13, P1.14, P1.15, P1.16). Además, se utilizó el AcM P1.19 del NIBSC (Instituto Nacional para Control Biológico y Estándares, del Reino Unido); para la identificación de los inmunotipos se emplearon los AcM: L3,7,9; L8 y L10, del NIBSC. Las cepas que no mostraron reacción positiva

frente a los antisueros de serogrupos y AcM de sero/subtipos e inmunotipos se clasificaron como *N. meningitidis* no agrupable (NA), no tipable (NT), no subtipable (NST) y no inmunotipable (NIT), respectivamente.

Basándonos en el comportamiento epidemiológico de la EM durante el período comprendido entre 1982-2002 (14) las cepas de este trabajo se distribuyeron en dos etapas: epidémica y postepidémica. Las del período epidémico correspondieron a cepas aisladas entre 1982-1992 (incidencia de EM entre 12,8-1,3/100 000 hab.). Mientras que, la postepidémica incluyó aislamientos de casos invasivos ocurridos entre 1993-2002 (incidencia de EM entre 0,9-0,3/ 100 000 habitantes) (14). Para su identificación en el texto se utilizó la siguiente nomenclatura: EEE (enfermos de la etapa epidémica) y EEPE (enfermos de la etapa postepidémica). Su número y distribución por años y etapas se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Distribución y número de cepas de *N. meningitidis* investigadas (1982-2002)**

| Etapas           | No. Cepas Estudiadas |
|------------------|----------------------|
| EEE (1982-1992)  | 279                  |
| EEPE (1993-2002) | 150                  |
| Total            | 429                  |

### Análisis estadístico

Se calcularon proporciones, frecuencias absolutas y relativas. Además, se utilizó el test  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher para el análisis de tablas de contingencia. Para proporciones de interés, se calcularon intervalos de confianza por el método aproximado de Wilson.

## Resultados

**Distribución de serogrupos:** Entre las 429 cepas *N. meningitidis* investigadas prevaleció el serogrupo B (97,90%), mostrando porcentajes similares en ambas etapas: EEE (96,77%) y EEPE (100%). Mientras que el serogrupo C (1,43%) y cepas NA (1,80%), sólo se observaron en casos de EEE y con cifras muy bajas (Tabla 2).

**Tabla 2. Cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según serogrupos (1982-2002)**

|       | EEE |       | EEPE |       | Total |       |
|-------|-----|-------|------|-------|-------|-------|
|       | N   | %     | N    | %     | N     | %     |
| B     | 270 | 96,77 | 150  | 100   | 420   | 97,90 |
| C     | 4   | 1,43  | 0,0  | 0,0   | 4     | 0,94  |
| NA    | 5   | 1,80  | 0,0  | 0,0   | 5     | 1,16  |
| Total | 279 | 100,0 | 150  | 100,0 | 429   | 100,0 |

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica

EEPE = Enfermos etapa postepidémica

NA = No agrupable

**Distribución de serotipos:** Predominó el serotipo 4 (86,48%), también con porcentajes similares en EEE (85,66%) y EEPE (88,0%) (Tabla 3). El serotipo 15 (7,46%) y cepas NT (6,06%) les siguieron en orden de frecuencia, aunque en EEE, estos mostraron cifras ligeramente superiores (7,89 y 6,45%), respectivamente.

**Distribución de subtipos:** En ambos períodos prevaleció el subtipo P1.19.15 (78,32%), con una distribución semejante en EEE (78,49%) y EEPE (78,0%). Le siguieron en orden de frecuencia las cepas NST

(7,47%); el resto de los subtipos mostraron porcentajes bajos, aunque las cepas de EEE mostraron una mayor diversidad de subtipos (Tabla 4).

**Distribución de inmunotipos:** La Figura 1, muestra el predominio del inmunotipo L3,7,9, con un porcentaje superior en EEPE (98,66%); L8 se detectó sólo en cepas de EEE (1,80%), grupo donde el número de aislamientos NIT fue ligeramente superior (2,86%).

**Tabla 3. Cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según serotipos**

|       | EEE |        | EEPE |        | Total |        |
|-------|-----|--------|------|--------|-------|--------|
|       | No  | %      | No   | %      | No    | %      |
| NT    | 18  | 6,45   | 8    | 5,33   | 26    | 6,06   |
| 4     | 239 | 85,66  | 132  | 88,0   | 371   | 86,48  |
| 15    | 22  | 7,89   | 10   | 6,67   | 32    | 7,46   |
| Total | 279 | 100,00 | 150  | 100,00 | 429   | 100,00 |

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; EEPE = Enfermos etapa postepidémica; NA = No agrupable; NT = No tipable

**Tabla 4. Cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según subtipos**

|          | EEE |        | EEPE |        | Total |        |
|----------|-----|--------|------|--------|-------|--------|
|          | No  | %      | No   | %      | No    | %      |
| P1.19,15 | 219 | 78,49  | 117  | 78,0   | 336   | 78,32  |
| P1.NST   | 17  | 6,10   | 15   | 10,0   | 32    | 7,47   |
| P1.12,15 | 4   | 1,43   | 4    | 2,66   | 8     | 1,86   |
| P1.5,2   | 7   | 2,50   | 4    | 2,66   | 11    | 2,57   |
| P1.15    | 10  | 3,58   | 4    | 2,66   | 14    | 3,27   |
| P1.4     | 1   | 0,36   | 1    | 0,67   | 2     | 0,46   |
| P1.16    | 3   | 1,08   | 2    | 1,34   | 5     | 1,17   |
| P1.5,13  | 1   | 0,36   | 1    | 0,67   | 2     | 0,46   |
| P1.13    | 1   | 0,36   | 1    | 0,67   | 2     | 0,46   |
| P1.12,16 | 1   | 0,36   | 1    | 0,67   | 2     | 0,46   |
| P1.7,19  | 1   | 0,36   | 0    | 0,0    | 1     | 0,23   |
| P1.6     | 1   | 0,36   | 0    | 0,0    | 1     | 0,23   |
| P1.19    | 6   | 2,15   | 0    | 0,0    | 6     | 1,40   |
| P1.7,15  | 4   | 1,43   | 0    | 0,0    | 4     | 0,93   |
| P1.2     | 1   | 0,36   | 0    | 0,0    | 1     | 0,23   |
| P1.5     | 1   | 0,36   | 0    | 0,0    | 1     | 0,23   |
| P1.19,13 | 1   | 0,36   | 0    | 0,0    | 1     | 0,23   |
| Total    | 279 | 100,00 | 150  | 100,00 | 429   | 100,00 |

Leyenda: EEE = Enfermos etapa postepidémica; EEPE = Enfermos etapa postepidémica; NST = No subtipable

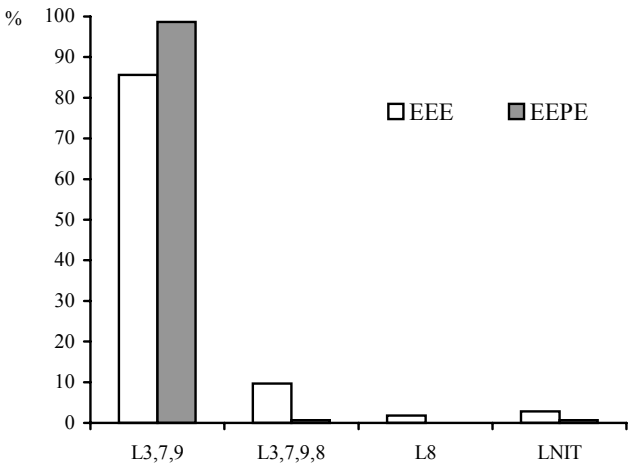


Figura 1. Cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según inmunotipos

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; EEPE= Enfermos etapa postepidémica; NIT = No inmunotipable

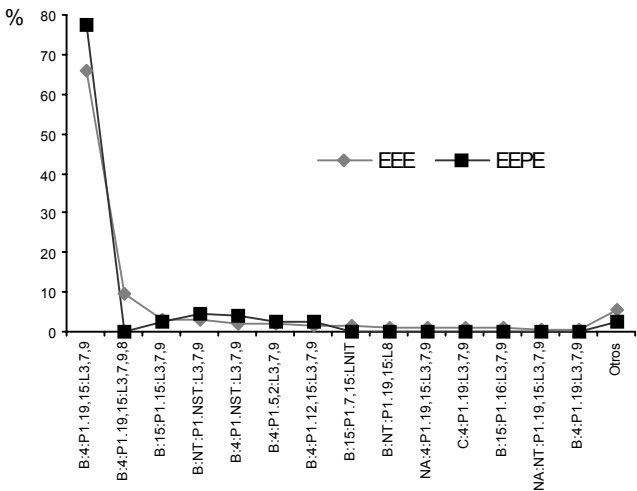


Figura 2. Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según fenotipos

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; EEPE = Enfermos etapa postepidémica; NIT=No inmunotipable

Tabla 5. Fenotipos identificados en una sola cepa de *N. meningitidis*, reflejados en la Figura 2 con el término “otros”

| Fenotipos EEE            | Fenotipos EEPE          |
|--------------------------|-------------------------|
| 1) B:4:P1.4:L3,7,9       | 1) B:4:P1.4:L3,7,9      |
| 2) B:4:P1.5,13:L3,7,9    | 2) B:NT:P1.5,13:L3,7,9  |
| 3) B:15:P1.13:L3,7,9     | 3) B:15:P1.12,16:L3,7,9 |
| 4) B:15:P1.12,16:L3,7,9  | 4) B:15:P1.13:L3,7,9    |
| 5) B:15:P1.7,19:LNIT     |                         |
| 6) B:15:P1.6:L3,7,9      |                         |
| 7) C:NT:P1.15:L3,7,9     |                         |
| 8) B:15:P1.2:L8          |                         |
| 9) B:4:P1.19:LNIT        |                         |
| 10) B:4:P1.NST:L8        |                         |
| 11) B:NT:P1.15:L3,7,9    |                         |
| 12) B:4:P1.19:L3,7,9     |                         |
| 13) B:4:P1.19:L3,7,9,8   |                         |
| 14) B:NT:P1.5:L3,7,9     |                         |
| 15) B:NT:P1.19,13:L3,7,9 |                         |
| Total: 15 cepas          | Total: 4 cepas          |

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; EEPE = Enfermos etapa postepidémica; NIT = No inmunotipable

Distribución de fenotipos: En las cepas investigadas predominó el fenotipo B:4:P1.19.15:L3.7.9 (69,69%). Al comparar ambas etapas, el 65,66% se identificó en EEE, mientras que, en cepas de EEPE (77,34%), el porcentaje fue superior ( $p<0,05$ ). Las cepas de EEE mostraron una mayor diversidad de asociaciones fenotípicas y en el término “otros”, se incluyeron aquellos fenotipos identificados en una sola cepa (Tabla 5).

Discusión

A partir de 1805, que se conoce la EM, se describen en el mundo numerosas epidemias con diferentes grados de intensidad y permanencia. En dependencia de las condiciones que pueden constituir factores contribuyentes en el desenlace de la EM, la incidencia de casos varía desde menos de 1/100 000 hab. hasta más de 500/100 000 (1). Generalmente, las epidemias se producen por un genotipo particular de cepas, estas expresan polisacáridos de serogrupos asociados principalmente con casos invasivos y una vez que las mismas se inician se pueden prolongar durante periodos variables (pocas semanas, muchos años) y hasta dispersarse globalmente (17). La interacción de *N. meningitidis* con su hospedero es notable y varía desde una colonización asintomática de la nasofaringe (condición que afecta virtualmente a todas las poblaciones), hasta infecciones devastadoras, frecuentemente fatales (1, 2).



La caracterización de cepas de *N. meningitidis* sobre la base de los serogrupos, sero/subtipos e inmunotipos, constituye una valiosa herramienta para el análisis de brotes epidémicos, así como para evaluar la eficacia de vacunas. La identificación de estos marcadores epidemiológicos contribuye a mejorar el conocimiento de las tendencias epidemiológicas de la EM y resultan imprescindibles para el estudio integral de la misma (3,4). Más del 90% de las cepas aisladas de enfermos son capsuladas. La cápsula, compuesta por polisacáridos representa un importante factor de virulencia y sirve de base para la clasificación de *N. meningitidis* en serogrupos. De estos los más frecuentemente vinculados a infecciones sistémicas son: A, B, C, Y, W-135 (1).

En las últimas décadas, *N. meningitidis* B causó brotes epidémicos en Islandia, Noruega, Bélgica, España y Nueva Zelanda, señalándose como la causa más común de EM en el noroeste de Europa (8). Mientras que en América, además de Cuba, se declararon brotes epidémicos en Brasil, Chile, Estados Unidos, Argentina y Uruguay, entre otros (18, 19, 20, 21, 22).

Este trabajo detectó un franco predominio del serogrupo B. Resultados similares señalan otros trabajos realizados en Cuba (10, 11, 23, 24, 25, 26). El serogrupo B se observó en más del 90% de las cepas invasivas de la década del 80 y prevaleció también en cepas de portadores investigadas en ese período (11). Recientemente, una investigación del Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri” (IPK), lo señaló en el 100% de las cepas invasivas recibidas en el IPK, entre 1993-1999 (27).

El serogrupo C se observó en un número reducido de EEE, resultado que pudo estar influenciado por la campaña de inmunización masiva realizada en 1979 con la vacuna A-C (bioMérieux), en la población cubana comprendida entre los 6 meses-19 años de edad. Desde el inicio de la epidemia en Cuba y hasta la inmunización masiva con A-C prevaleció el serogrupo C (50,9%), seguido del B (34,3%). Posteriormente, se produjo el franco ascenso y predominio del B, convirtiéndose la EM en el principal problema de salud de Cuba durante toda la década del 80 (10,11). Debido a la situación epidémica existente y no disponer en ese momento de ningún preparado vacunal contra *N. meningitidis* B, se desarrolló y obtuvo la vacuna antimeningocócica cubana (VA-MENGOC-BC®), la cual, luego de su evaluación, aplicación e incorporación al PNI, controló la epidemia de Cuba (11, 12, 13). Estudios posteriores evidenciaron el descenso mantenido de la EM (incluidos los niños menores de 1 año), por el efecto de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, en contraposición con países en que solo realizaron campañas puntuales de vacunación y por consiguiente, posteriormente observaron un incremento de casos ocasionados por el mismo agente (28).

Aunque en nuestra investigación el número de cepas pertenecientes al serogrupo C fue bajo y éste no se detecta en Cuba desde hace algunos años, *N. meningitidis* C constituye un importante agente causal de EM en diversas regiones del mundo; actualmente, cepas de *N. meningitidis* B y C representan el 95% de los casos invasivos de Europa (8).

Durante la epidemia de Cuba otros países notificaron el ascenso de casos con EM. En Europa, esta entidad clínica se vinculó estrechamente con el serogrupo B y países como Noruega, Francia y

España (17, 29, 30), por citar algunos, mostraron su prevalencia, aunque al inicio de la década del 90, España notificó el ascenso del serogrupo C (31). En América Latina: Brasil, Chile, Argentina, Colombia y Estados Unidos mostraron cambios epidemiológicos importantes. Brasil, que sufrió una de las epidemias más severas del mundo causada por los serogrupos A y C, a partir de 1986, el 80% de los procesos invasivos fueron producidos por *N. meningitidis* B (18); posteriormente, Chile, Argentina, Colombia y Estados Unidos notificaron también su ascenso (19, 21, 32, 33).

En este trabajo no se observaron otros serogrupos descritos frecuentemente en casos esporádicos y epidemias. Sin embargo, los serogrupos A y W-135, se destacan principalmente en África y Asia (1). *N. meningitidis* A, responsable de epidemias y pandemias, es el agente etiológico más importante de EM en África, sobre todo, en los países que integran el denominado “cinturón de la meningitis”, región donde el serogrupo A ocasiona epidemias explosivas y periódicas (6). Sin embargo, actualmente es poco frecuente en Europa y Norteamérica (8). El serogrupo A no se notifica en Cuba desde hace varios años, al inicio de la epidemia se aisló en un número reducido de casos (11). En este momento el serogrupo W-135 se describe como agente etiológico de EM entre peregrinos musulmanes y sus contactos, sobre todo, después de la visita anual a La Meca, Arabia Saudita. El número de enfermos con *N. meningitidis* W-135, ascendió en Europa y desde los brotes ocurridos en los últimos años, su incidencia se vigila estrechamente (1,7). El serogrupo W-135 tampoco se observó entre las cepas invasivas de Cuba, aunque se ha identificado en un porcentaje reducido de portadores (11). El serogrupo Y, tampoco observado entre las cepas de nuestro trabajo, se convirtió a partir de la década del 90, en uno de los agentes causales más frecuentes de EM en Estados Unidos (9).

El desarrollo y obtención de AcM dirigidos contra las PME de *N. meningitidis* (PorA, PorB) y LOS, permiten estudios de serotipificación e inmunotipificación, respectivamente, lo que contribuye a mejorar el conocimiento de las tendencias epidemiológicas de la EM (3,4). Nuestro trabajo detectó similitud entre los sero/subtipos observados en EEE y EEPE. Después de 1979, el fenotipo B:4:P1.19,15, resultó el de mayor circulación en Cuba (11,12,13,24,25,26,27). Sin embargo, países como Noruega y Nueva Zelanda, entre otros, señalan otros fenotipos como más frecuentes (8, 17, 34). Desde 1991, Nueva Zelanda notificó el ascenso de casos clínicos invasivos producidos por cepas B:4:P1.7b,4. Al serotipo 4 correspondió el 73% de las cepas identificadas entre 1989-99 y actualmente, evalúan una vacuna obtenida a partir de la cepa prevalente en el país (B:4:P1.7b,4) (34). Mientras que, al inicio de la década del 70, Noruega señaló al fenotipo B:15:P1.7,16, como el principal agente etiológico de su epidemia. Al igual que en Cuba, desarrollaron y obtuvieron una vacuna a partir de la cepa prevalente (B:15:P1.7,16). La vacuna se administró entre 1989 y 1991 en escolares de 14 a 16 años, estimándose la efectividad en el 57,2%. Las investigaciones con la vacuna aún continúan y se recomienda para la inmunización de adultos con riesgo ocupacional (35).

Al comparar los sero/subtipos detectados en este trabajo con asociaciones fenotípicas descritas en otras regiones de América

Latina, constatamos que a partir de 1982 la incidencia de EM resultó crítica en Chile, a expensas del fenotipo B:15:P1.3 (19). También en Argentina, Uruguay Brasil y Colombia, notificaron el ascenso de casos invasivos producidos por el serogrupo B (21, 22, 28, 32). En Argentina fue frecuente el fenotipo B:2b:P1.10; Uruguay mostró un número considerable de casos ocasionados por cepas B:2b:P1.10. Sin embargo, en el 2001 la situación se tornó diferente y surgieron brotes en Canelones y Montevideo, los que tuvieron como agente etiológico principal al fenotipo B:4:P1.19,15, seguido por cepas B:4:P1.16 y B:4:P1.7, situación que se controló satisfactoriamente con la aplicación de VA-MENGOC-BC® (22). Coincidiendo con los datos de Cuba, Colombia señaló como prevalente al fenotipo B:4:P1.15 (32) y Brasil enfrentó desde 1988, brotes por este fenotipo (28). También en Oregón, Estados Unidos, la EM alcanzó cifras elevadas entre 1992-1994, el 86% pertenecieron al complejo clonal ET-5, con los serotipos 4 y 15, el subtipo P1.7,16 y el inmunotipo L3,7,9,8,10, como los más frecuentes (33). El 69% de un grupo de cepas aisladas durante la epidemia de Cuba pertenecieron al complejo clonal ET-5, este predominio, pudiera explicar la severidad de nuestra epidemia (36).

En las cepas de EEPE, predominó *N. meningitidis* B y no se identificó al serogrupo C. Estudios de portadores realizados recientemente en Cuba, en dos instituciones infantiles, mostraron la ausencia de los serogrupos B y C (37,38), hallazgo que pudiera estar relacionado con el efecto producido por la inmunización sistemática y mantenida con VA-MENGOC-BC®.

Al comparar los resultados de EEPE, con algunos trabajos de caracterización fenotípica en cepas de América Latina, vemos que brotes ocurridos recientemente en Ecuador señalan como más frecuentes a los serogrupos C y W-135 (39). Mientras que, entre 1996-1997, España mostró una situación epidemiológica interesante. El serogrupo C, que integraba menos del 2% antes de 1994, ascendió al 70% y la decisión de inmunizar con A-C en las Comunidades Autónomas, originó que en el 2002 la cepa de la onda epidémica (C:2b:P1.5,2), descendiera al 21,8%. Sin embargo, en el 2001 surgió el fenotipo B:2a:P1.5; esta situación hizo pensar en un cambio capsular “switching”, suceso que puede ocurrir después de aplicar programas de vacunación que provocan protección serogrupo específica. Las nuevas cepas parecen mantener el potencial epidémico de las precursoras y se convierten en un importante factor de virulencia (31). En Cantabria, tras la vacunación contra el serogrupo C, se consiguió su eliminación, sin embargo, paralelamente se incrementó el serogrupo B. A esta situación parece haber contribuido la difusión por el País Vasco y Cantabria, a partir del 2001, de la cepa B:2a:P1.5, procedente de este “switching” o recombinación capsular entre el serogrupo B y C (40). Otros países como Francia, Inglaterra, Gales, Escocia e Irlanda del Norte, observaron el incremento de casos invasivos por *N. meningitidis* C (8). En 1999, el Reino Unido aplicó en menores de 18 años, la vacuna conjugada contra el serogrupo C. Posteriormente, comprobó una reducción del 66% de portadores de este serogrupo C entre la población inmunizada (41). Italia, corroboró entre 1999-2001, el predominio de los serogrupos B (75%) y C (24%) (45), pero en la etapa del 2002-2003, este último se elevó al 42,5%, señalando la

transferencia horizontal de los genes (siaD), implicados en el “switching” capsular (42).

El número de cepas investigadas en EEPE fue inferior al de EEE, situación relacionada con la reducción de casos invasivos y el control de la epidemia de Cuba. La amplia cobertura nacional alcanzada, junto a la aplicación sistemática y mantenida de VA-MENGOC-BC®, redujo el número de casos; actualmente sólo se notifican casos aislados (0.3/100 000 habitantes) (13, 14).

Nuestro trabajo detectó similitud entre los sero/subtipos de EEE y EEPE. Después de la inmunización con la vacuna A-C, el fenotipo B:4:P1.19,15, resultó el de mayor circulación en Cuba (11). La ausencia de nuevos serogrupos y sero/subtipos epidemiológicos entre EEPE, junto a los resultados señalados en estudios de portadores, hablan a favor del impacto y efectividad de VA-MENGOC-BC®, y particularmente de su amplio espectro contra diferentes sero/subtipos del serogrupo B (12, 21, 43).

La pobre inmunogenicidad del PC del serogrupo B hace que la estrategia de protección contra la EM se dirija a la obtención de vacunas compuestas por antígenos no capsulares, de ahí la importancia de caracterizar las PME. Las vacunas compuestas por estos antígenos, inducen la formación de anticuerpos protectores y han demostrado su efectividad en ensayos clínicos (12), y VA-MENGOC-BC® constituye un ejemplo de este tipo de preparado vacunal. Su aplicación ha controlado también brotes epidémicos de otros países (22,32).

Actualmente, la estructura química de la mayoría de los inmunitipos de *N. meningitidis* ha sido esclarecida. Su heterogeneidad se observa frecuentemente, señalándose que puede estar vinculada con las diferentes condiciones de crecimiento de este microorganismo (44). Algunos estudios revelan que L3,7,9, se asocia con aproximadamente el 80% de las cepas invasivas, mientras que L8, se vincula más frecuente con los portadores (45). Se señala también que L8 es más sensible a la actividad bactericida del suero (44).

A pesar de los avances alcanzados en el desarrollo de los antimicrobianos y nuevas vacunas contra *N. meningitidis*, la EM es aún un problema de salud para varias regiones del mundo. Si bien actualmente se conocen muchos aspectos sobre las características de las cepas circulantes, se plantean todavía interrogantes. Sin dudas, deben existir factores dependientes del huésped, cepas y condiciones ambientales, responsables del comportamiento diferente que presenta la EM. El desarrollo de técnicas moleculares como el “Multilocus Sequence Typing” (MLST), junto con la clasificación antigénica clásica, han permitido la asignación de diferentes aislamientos a determinadas líneas evolutivas o clusters poblacionales y algunas de ellas se han identificado como líneas hipervirulentas (45). Recientemente, 131 cepas invasivas de Cuba, aisladas entre 1983-2003, se caracterizaron genéticamente por MLST. La mayoría, perteneció a la secuencia tipo 33 (ST-33), una subvariante del complejo clonal ST-32, agente causal de EM endémica y epidémica desde la década del 70 en diversas regiones (46).

Existen aún problemas en el mundo acerca del conocimiento, diagnóstico, prevención, control y tratamiento de la EM. Entre éstos

se encuentran: la sensibilidad que tienen algunas poblaciones a enfermar, su naturaleza epidémica esporádica, los mecanismos responsables de la erradicación del portador, las razones para la naturaleza fulminante de la EM y los problemas relacionados con la capacidad de las vacunas disponibles para el control de brotes y epidemias. Hasta que se respondan éstas y muchas otras interrogantes, la EM constituirá un flagelo entre las poblaciones humanas. La realización de estudios que analicen paralelamente las cepas aisladas de enfermos y portadores, así como, la investigación de la virulencia de las cepas epidémicas, constituirán en el futuro, herramientas básicas para comprender mejor la epidemiología de la EM y poner en marcha medidas útiles para su control. La incorporación de nuevos métodos de caracterización, ofrecerá una mayor información sobre la genética y relación biológica existente entre las poblaciones de *N. meningitidis*. La vigilancia y caracterización sistemática de las cepas invasivas son esenciales para monitorear este microorganismo y permitirá detectar la emergencia de nuevas cepas.

## Referencias

- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001;344:1378-88.
- Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004;53:821-32.
- Pichichero ME. Meningococcal conjugate vaccines. *Expert Opin Biol Ther*. 2005;5: 1475-89.
- 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.
- Maiden M, Bygraves JA, Fell E, Morell G, Russell JE, Urwin R et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140-5.
- Robbins JB, Schneerson R, Gotschlich EC, Mohammed I, Nasidi A, Chippaux JP et al. Meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa: the case for mass and routine vaccination with available polysaccharide vaccines. *Bull World Health Organ* 2003;81:745-50.
- Forgor AA, Leimkugel J, Hodgson A, Bugri A, Dangy GP, Gagneux S et al. Emergence of W-135 meningococcal meningitis in Ghana. *Trop Med Int Health* 2005;10:1229-34.
- EU-MenNet. Impact of meningococcal epidemiology and population biology on public health in Europe. Final Report. 2001-2005.
- Racoosin JA, Whitney CG, Conover CS, Díaz PS. Serogroup Y meningococci disease in Chicago, 1991-1997. *JAMA* 1998;280:2094-98.
- Terry Molinert, Demina AA; Valcarcel Novo M. Epidemiological characteristics of meningococcal infection in Cuba. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1986;2:54-9.2.
- Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. 1st ed. Ciencia Médicas, Ciudad Habana, Cuba;1991.
- Sierra GV, Campa HC, Valcárcel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195-07.
- Pérez Rodríguez A, Dickinson F, Baly A, Martínez R. The epideml impact of antimeningococcal vaccination in Cuba. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94:433-40.
- Estadísticas de Salud de Cuba. Anuario Estadístico de Salud 2004. Incidencia y mortalidad por enfermedad meningocócica.1980-2004. Disponible en: <http://bvs.sld.cu/anuario/tablas/ANUARIOCU1.1-1262.htm>
- Knapp JS, Koumans EH. Neisseria and Branhamella. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. ASM Press, Washington D.C, 1999; p. 586-603.
- Abdillahi H, Poolman JT. Whole cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Letters* 1987;48:367-71.
- Caugant DA, Froholm LO, Bovre K, Holtén E, Frøsch CE, Mocca LF et al. Intercontinental spread of a genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4927-31.
- Sacchi CT, Pessoa LL, Ramos SR, Milagres LG, Camargo MCC, Hidalgo NTR et al. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in São Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-5 complex. *J Clin Microbiol* 1992;30:1734-8.
- Castillo L, Maldonado A, García J, Silva W, Ulloa MT, Valenzuela MT et al. Caracterización de *Neisseria meningitidis* aisladas de infecciones sistémicas. Chile 1992-1993. *Rev Med Chile* 1994;122:760-67.
- Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Lefkowitz L, Cartter ML, Danila R et al. The changing epidemiology of meningococcal disease in the United States, 1992-1996. *J Infect Dis*. 1999;180:1894-901.
- Requeira M, Palmeiro S, Gutiérrez M, Malberty A, Sotolongo F, García AM. Estudio de cepas de *Neisseria meningitidis* circulantes en la Argentina 1991-1993 y ensayo de sueros de vacunados con una vacuna antimeningocócica de origen cubano contra cepas de los diferentes serotipos y subtipos causantes de enfermedad. *Rev Hosp Niños Buenos Aires* 1994; XXXVI (158/159):242-46.
- Pérez GM, Picón MT, Galazka CT, Quian RJ, Gutiérrez RS, Ferrari CA et al. Enfermedad invasiva meningocócica en Uruguay. Informe epidemiológico y recomendaciones, mayo 2002. *Rev Med Uruguay* 2002;18:83-8.
- Martínez I, Patton AS, Sotolongo F, Llop A, Sosa J. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B. *ACTA CIENTIFICA SVBE* 1994;3:4-37.
- Gutiérrez VM, Caro AE, Martínez MI, Nuñez N, Sotolongo PF, Ginebra M. Epidemiological markers of epidemic strains of *Neisseria meningitidis* isolated in Cuba. In: *Proceeding of the 13th International Pathogenic Neisseria Conference*. Oslo, Norway, 2002:348.
- Alea GV, Martínez MI, Sotolongo PF, Nuñez N, Gutiérrez VM, Zamora ML, et al. Phenotypes of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba. In: *Proceeding of the 13th International Pathogenic Neisseria Conference*. Oslo, Norway, 2002:328.
- Gálguera M, Gutiérrez M, Caro E, Rodríguez L, Sotolongo F, Sierra G et al. Studies of serogroup B strains of *Neisseria meningitidis*: main causal agent of the meningococcal disease in Cuba after 1980. In: *Conde Glez CJ, Morse SP. Rice, F. Sparling, Calderón E. Pathobiology and Immunology of Neisseriaceae. International Pathogenic Neisseria Conference*. Cuernavaca, México, 1994:222-225.

27. Sosa J, Llanes R, Guzmán D, Quintana I, Flores M, Gutierrez O. Typing and susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Cuba (1993-1999). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:523-25.
28. Sacchi CT, de Lemos AP, Camargo MC, Whitney AM, Melles CE, Solari CA. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 4 in Sao Paulo, Brazil, 1990 to 1996. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40:65-70.
29. Vazquez JA, Marcos C, Berron S. Sero/subtyping of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Spain. *Epidemiol Infect* 1994;113:267-74.
30. Riou JY, Poolman JT, Auriol J, Lompres F, Guibourdenche M. Sero-subtyping of group B, C Y and A meningococci isolated in France 1988. *Ann Biol Clin* 1990;48:227-32.
31. Alcala B, Salcedo C, Arreaza L, Berron S, de la Fuente L, Vázquez JA. The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. *J Med Microbiol* 2002;51:1102-6.
32. Echeverry ML, Malberty JA, Galeano ML, Sotolongo PF, Galguera MA, Montoya BC et al. Respuesta inmune humoral al polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C en un ensayo de vacunación antimeningocócica BC en Antioquia, Colombia. *Bol Oficina Sanit Panam* 1995;118 :295-01.
33. Diermayer M, Hedberg K, Hoesly FC, Fischer M, Perkins B, Reeves M et al. Epidemic serogroup B meningococcal disease in Oregon: the evolving epidemiology of the ET-5 strain. *JAMA* 1999;281:1493-7.
34. Martín DR, Walker SJ, Baker MG, Lennon D. New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B4:P1.4. *J Infect Dis* 1998;177:257-9.
35. Fischer M, Carlone GM, Holst J, Williams D, Stephens DS, Perkins BA. *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane vesicle vaccine in adults with occupational risk for meningococcal disease. *Vaccine* 1999;17:2377-83.
36. Caro E, Martínez I, Gutiérrez M, Núñez N, Sotolongo F, Bravo J et al. Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante el período 1985-1992. *VacciMonitor* 2000; 9(1):5-11.
37. Martínez I, López O, Sotolongo F, Mirabal M, Bencomo A. Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de una escuela primaria. *Rev Cub Med Tropical* 2003;55:162-8.
38. Martínez I, Álvarez N, Sotolongo F, Izquierdo L, Núñez N. Portadores de *Neisseria meningitidis* en un círculo infantil de Ciudad de La Habana. *Reseñas en Quimioterapia Latinoamericana* 2003;11:93-99.
39. Pesantes C. Meningococo y enfermedad meningocócica: Revisión a propósito de los brotes epidémicos en Guayaquil-Ecuador. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología, La Habana, Cuba 2002.
40. González de Aledo, Vilorio L. Serosubtipos de meningococo B causantes de enfermedad invasiva en Cantabria y concordancia con la cepa de la vacuna cubana. *Gac Sanit* 2004;18:45-9.
41. Maiden MC, Stuart JM. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococci C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet* 2002;359:289-91.
42. Stefanelli P, Fazio C, Neri A, Sofia T, Mastrantonio P. First report of capsule replacement among electrophoretic type 37 *Neisseria meningitidis* strains in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41: 5783-86.
43. Morley SL, Cole MJ, Ison CA, Camaraza MA, Sotolongo F, Anwar N et al. Immunogenicity of a serogroup vaccine against multiple *Neisseria meningitidis* strains in infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1054-61.
44. Brandtzaeg P, Bjerre A, Øvstebø R, Brusletto B, Joø G, Kierulf P. *Neisseria meningitidis* lipopolysaccharides in human pathology. *J Endotoxin Res.* 2001;7:401-20.
45. Jones DM, Borrow R, Fox AJ, Gray S, Cartwright KA, Poolman JT. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1992;13:219-24.
46. Maiden M, Bygraves JA, Fell E, Morell G, Russell JE, Urwin R et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140-5.46.
47. Climent Y, Pajon R, Maiden MCJ, Sotolongo F, Martínez I, Urwin R. Genetic and antigenic diversity among disease causing meningococci isolated before and after mass immunisation in Cuba. In: Meningitis and septicaemia in children and adults: Burden of illness, management and prospects for prevention. Proceedings of the Meetings 23-24 November 2005, Royal Society of Medicine, London, UK, organized by Meningitis Research Foundation; 2005::53.

## Phenotypic characterization of invasive strains of *Neisseria meningitidis* isolated in Cuba during 20 years

### Abstract

The epidemiological markers (sero-groups, sero-types, sub-types, immuno-types) of 429 invasive strains isolated in Cuba during 20 years (1982-2002) were investigated. Based on the behavior of the Meningococcal Disease (MD) incidence in the investigated period, the strains were distributed in two stages: epidemic and post-epidemic. The epidemic stage involved 279 strains isolated between 1982 and 1992 and the post-epidemic one included 150 isolations carried out between 1993 and 2002. All of them were seeded in Mueller Hinton Agar with fetal bovine serum (5%) and incubated for 24-48 hours, 37 °C, in humid atmosphere with 5% of CO<sub>2</sub>. The identification of sex, species and sero-group was performed using conventional methods; characterization of sero/sub-types and immuno-types was carried out using the immuno-enzimatic test (ELISA) of whole cells with monoclonal antibodies. Serogroup B (97,90%) prevailed in both stages: epidemic (96.77%) and post-epidemic (100%). However, sero-group C (1.43%) and non-grouping strains (1,8%) were only observed in the isolations of the epidemic stage. The other prevailing markers were: serotype 4 (86.48%), subtype P1.19,15 (78.32%), immuno-type L3,7,9 (90.2%) which showed similar figures in both periods. Phenotype B:4:P1.19,15: L3,7,9 (69,69%) prevailed, although, in the post-epidemic stage (77.34%), the percentage was higher than that of the epidemic one (65.66%) (p<0.05). A higher diversity of phenotypic associations was also observed in the strains of this period. Results obtained from this phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from ill persons provide valuable data to the study, prevention and successful control of the MD in Cuba.

**Keywords:** *Neisseria meningitidis*, meningococcal disease, ill persons, epidemiological markers, phenotypes, meningococcal vaccine