

INSTITUTO FINLAY

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

Dra. Isabel Martínez Motas,<sup>1</sup> Dr. Gustavo Sierra González,<sup>2</sup> Lic. Niury Núñez Gutiérrez,<sup>3</sup> Lic. Luis Izquierdo Pérez,<sup>4</sup> Lic. Yanet Climent Ruíz,<sup>5</sup> y Lic. Mayelin Mirabal Sosa<sup>6</sup>

### RESUMEN

Se investigaron los marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores en Cuba durante 20 años (1982-2002). Se identificaron los serogrupos, serotipos, subtipos e inmunotipos de 331 cepas correspondientes a 2 etapas diferentes: epidémica (1982-1992) y posepidémica (1993-2002). En la epidémica predominó el serogrupo B (67,62 %) y las cepas no agrupables (32,28 %). En la posepidémica prevalecieron las cepas no agrupables (79,65 %) y el serogrupo B (17,26 %) ( $p < 0,05$ ). El presente estudio es el primero y único hasta el momento, en investigar cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores antes y después de una campaña nacional masiva de inmunización con VA-MENGOC-BC® (vacuna antimeningocócica cubana contra los serogrupos B y C). Los resultados obtenidos aportan datos valiosos al estudio, prevención y control exitoso de la enfermedad meningocócica en Cuba, así como al desarrollo y la evaluación de esta vacuna.

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

*Neisseria meningitidis*, patógeno exclusivo del hombre y agente etiológico de la enfermedad meningocócica (EM), es un comensal común de la nasofaringe humana. Su permanencia a ese nivel ocasiona el estado de portador asintomático, condición que suele estar presente entre 5 y 40 % de los individuos sanos.<sup>1</sup> 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 las infecciones frecuentemente fatales.<sup>2</sup> A pesar de los avances alcanzados en el diagnóstico y tratamiento de la EM, su morbilidad y mortalidad son elevadas y un

número significativo de sobrevivientes sufren secuelas invalidantes.<sup>1,2</sup> La EM se presenta de forma endémica, hiperendémica, como brotes localizados, epidemias o pandemias, o ambas. Su severidad y tendencia por afectar principalmente a los niños y adultos jóvenes, concentra las investigaciones en aspectos concernientes a los procesos invasivos. Por consiguiente, los estudios referentes a la colonización e identificación de cepas de portadores, son comparativamente menos frecuentes y conllevan a una menor representación de estos aislamientos en aquellos centros que almacenan colecciones de cultivo de *N. meningitidis*, situación que deviene en un obstáculo,

<sup>1</sup> Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Titular.

<sup>2</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Inmunología. Académico Titular.

<sup>3</sup> Máster en Ciencias Bacteriología-Micología. Licenciada en Bioquímica.

<sup>4</sup> Licenciado en Matemática. Investigador Agregado.

<sup>5</sup> Licenciada en Biología. Aspirante a Investigadora.

<sup>6</sup> Licenciada en Matemática.

cuando se requiere de una mejor comprensión e interpretación de la epidemiología de este microorganismo.<sup>3</sup>

Desde la década de los sesenta existen vacunas disponibles de polisacáridos capsulares (PC) contra los serogrupos A, C, Y, W-135, y recientemente, las técnicas de conjugación empleadas en *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, se aplican en la obtención de vacunas contra *N. meningitidis*.<sup>4</sup> Sin embargo, la pobre inmunogenicidad del PC del serogrupo B y su reactividad cruzada con las glicoproteínas presentes en el tejido neural humano, condujo a la obtención de inmunógenos a partir de proteínas de la membrana externa (PME) (Frasch CE. Meningococcal vaccines: past, present and future. Meningococcal disease. ed. Keit Cartwright 1995, John Wiley & Sons Ltd. p. 245-83).<sup>4,5</sup> En estos momentos, la disponibilidad de vacunas contra 5 de los 13 serogrupos descritos hasta la fecha, hace de la identificación de los antígenos superficiales de *N. meningitidis* una herramienta valiosa en el monitoreo de la EM (Frasch CE. Meningococcal vaccines: past, present and future. Meningococcal disease. ed. Keit Cartwright 1995, John Wiley & Sons Ltd. p. 245-83).<sup>4,5</sup> La caracterización serológica incluye: serogrupos, serotipos, subtipos e inmunitipos y se basa en esquemas elaborados a partir de las diferencias estructurales y antigénicas de los componentes superficiales de *N. meningitidis*.<sup>6,7</sup> Cada estructura permite definir un marcador epidemiológico diferente y así el PC determina al serogrupo; las PME de clase 2/3 (PorB) y clase 1 (PorA), los serotipos y subtipos, respectivamente; mientras que, las diferencias en sus lipooligosacáridos (LOS), clasifican los inmunitipos.<sup>7</sup> Este esquema, útil para la identificación de fenotipos virulentos, mejora los estudios de prevalencia de *N. meningitidis* en poblaciones con alta incidencia de EM y es el más extendido y completo sistema de clasificación basado en estructuras moleculares que tienen interés en la respuesta inmune. A pesar de disponer de estos métodos, algunas cepas quedan sin clasificar, particularmente las de portadores. La clasificación serológica puede fallar por la alta diversidad de PorA y PoR, las limitaciones en el panel de AcM disponibles y la fuerte selección, supuestamente impuesta por la respuesta inmune

del huésped y la posibilidad de intercambio de ADN por transformación en esta bacteria.<sup>6,7</sup> El advenimiento de las técnicas moleculares incrementa la información que brinda la caracterización fenotípica, sobre todo, cuando se requiere verificar la identidad genética de cepas aisladas en brotes y epidemias.<sup>8</sup>

Hasta 1976, la EM en Cuba mostró un comportamiento endémico; a partir de esa fecha, ascendió a expensas de casos producidos por los serogrupos C (50,9 %) y B (34,3 %). En 1979, la situación epidémica existente (incidencia de 5,6/100 000 habitantes), motivó la inmunización con A-C en toda la población menor de 20 años. Posteriormente, *N. meningitidis* B se elevó vertiginosamente, mostró su máxima incidencia en 1983 (14,3/100 000 habitantes) y se convirtió en el principal problema de salud de la década de los ochenta.<sup>5,9</sup> Por no existir en ese momento una vacuna contra el serogrupo B, comenzaron las investigaciones que permitieron posteriormente obtener la vacuna VA-MENGOC-BC®, constituida por un complejo de vesículas purificadas de la membrana externa de *N. meningitidis* B y PC purificado del serogrupo C, adsorbido en gel de hidróxido de aluminio.<sup>5</sup> La vacuna se aplicó en forma de campaña (1987-1990), en individuos de 3 meses-24 años y se incorporó en 1991 al Programa Nacional de Inmunización (PNI). VA-MENGOC-BC® mostró una eficacia entre 83 y 98 % y logró controlar la epidemia.<sup>5,9,10</sup> En 2004, la incidencia de EM fue de 0,3/100 000 habitantes.<sup>11</sup>

Por disponer de una colección de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en etapas con una conducta epidemiológica diferente, comparar los cambios fenotípicos ocurridos en cepas obtenidas entre 1982-2002, aportó una valiosa información sobre la dinámica de la EM en Cuba y al mismo tiempo, se pudo comprobar el impacto de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, entre las cepas investigadas.

## MÉTODOS

### *Cepas de N. meningitidis* investigadas

Entre 1982-2002, el Laboratorio de Microbiología del Instituto Finlay, recibió 331 cepas

de *N. meningitidis* aisladas de portadores en diferentes regiones del país. Estas cepas se caracterizaron, liofilizaron y almacenaron para estudios posteriores. En el momento de su recepción se identificaron en género, especie y serogrupo, según métodos convencionales;<sup>12</sup> posteriormente, se determinaron los serotipos, subtipos e inmunotipos. Para su estudio, las cepas se cultivaron en placas Petri de Agar Mueller Hinton (Merck) más suero fetal bovino 5 % (Hyclone), se incubaron en atmósfera húmeda durante 24-48 h, a una temperatura de 37 °C y la presencia de 5 % de CO<sub>2</sub>; posteriormente, se realizó la lectura.

### Caracterización fenotípica

El seroagrupamiento se hizo por aglutinación en lámina portaobjetos con antisueros comerciales de *N. meningitidis* A, B, C, X, Y, Z y W-135 (Difco).<sup>12</sup> Mientras que, para la caracterización de serotipos, subtipos e inmunotipos, se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales (AcM).<sup>13</sup> En la identificación de serotipos/subtipos se empleó el panel de AcM del RIVM (siglas en inglés del Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente de Holanda), que incluyó 6 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, y P1.16). Además, se utilizó el AcMP1.19 del NIBSC (siglas en inglés del Instituto Nacional para Control Biológico y Estándares del Reino Unido); en la detección de inmunotipos, se emplearon los AcM: L3,7,9; L8 y L10 (NIBSC). Las cepas que no reaccionaron de forma positiva frente a los antisueros de serogrupo y AcM de serotipos, subtipos e inmunotipos, se clasificaron como NA, NT, NST y no inmunotipable (NIT), respectivamente.

Con el objetivo de comparar los cambios fenotípicos de las cepas estudiadas y sobre la base del comportamiento epidemiológico de la EM en el período 1982-2002, estas se distribuyeron en 2 etapas (epidémica y posepidémica). Para su distribución, se tomó en cuenta la incidencia de EM en los años analizados.<sup>11</sup> Las cepas de la etapa epidémica se aislaron entre 1982-1992 (incidencia 12,8-1,3/100 000 habitantes). Mientras que, en la

posepidémica, se incluyeron aislamientos del período comprendido entre 1993-2002 (incidencia 0,9-0,3/100 000 habitantes).<sup>11</sup> Para su identificación en el texto, se utilizó la nomenclatura siguiente: PEE (portadores de la etapa epidémica) y PEPE (portadores de la etapa posepidémica). 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
PEE (1982-1992)	105
PEPE (1993-2002)	226
Total	331

PEE: portadores etapa epidémica, PEPE: portadores etapa posepidémica.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se calcularon proporciones, frecuencias absolutas y relativas. Además, se utilizó el test de chi cuadrado o el test exacto de Fisher para el análisis de tablas de contingencia. Para proporciones de interés, se calcularon los intervalos de confianza por el método aproximado de Wilson. Se consideró significativo cuando se obtuvo un resultado con un valor de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### DISTRIBUCIÓN DE SEROGRUPOS

Entre las 331 cepas de *N. meningitidis* investigadas, 110 (33,23 %) pertenecieron al serogrupo B y 214 (64,65 %) resultaron NA. Otros serogrupos se identificaron con porcentajes bajos: W-135 (1,52 %), Y (0,30 %) y Z (0,30 %) (tabla 2). Al analizar la distribución de los serogrupos en PEE y PEPE, se observó diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ), al comparar los resultados del serogrupo B y cepas NA. El serogrupo B prevaleció en PEE (67,62 %) y descendió en PEPE (17,26 %). Sin embargo, en PEPE predominaron las NA (79,65 %), cepas que en PEE resultaron significativamente inferior (32,38 %). Los serogrupos W-135 (2,21 %), Y (0,44 %) y Z (0,44 %), solo se identificaron en PEPE.

**TABLA 2.** Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica y posepidémica, según serogrupos. Cuba, 1982-2002

Serogrupos	PEE		PEPE		Total	
	N	%	N	%	N	%
B*	71	67,62	39	17,26	110	33,23
NA*	34	32,38	180	79,65	214	64,65
W-135	0	0,0	5	2,21	5	1,52
Y	0	0,0	1	0,44	1	0,30
Z	0	0,0	1	0,44	1	0,30
Total	105	100	226	100	331	100

\*  $p < 0,05$  entre cepas PEE y PEPE

PEE: portadores etapa epidémica, PEPE: portadores etapa posepidémica, NA: no agrupable.

### DISTRIBUCIÓN DE SEROTIPOS

Predominaron las cepas NT (55,59 %), seguidas de los serotipos 4 (30,82 %) y 15 (10,57 %); el resto mostró porcentajes bajos: 14 (2,12 %), 1 (0,60 %) y 2b (0,30 %) (tabla 3). El serotipo 4 prevaleció en PEE (70,48 %) y descendió en PEPE (12,39 %) ( $p < 0,05$ ). Se observaron también cambios en las cepas NT. El porcentaje de aislamientos NT de PEPE (70,80 %), sobrepasó la cifra identificada en PEE (22,86 %) ( $p < 0,05$ ) y el serotipo 15, mostró diferencias estadísticamente significativas al comparar los resultados de ambas etapas: PEE (4,76 %) y PEPE (13,27 %).

**TABLA 3.** Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica y posepidémica, según serotipos. Cuba, 1982-2002

Serotipos	PEE		PEPE		Total	
	N	%	N	%	N	%
NT*	24	22,86	160	70,80	184	55,59
1	1	0,95	1	0,44	2	0,60
4	74	70,48	28	12,39	102	30,82
2b	1	0,95	0	0,0	1	0,30
14	0	0,0	7	3,10	7	2,12
15	5	4,76	30	13,27	35	10,57
Total	105	100	226	100	331	100

\*  $p < 0,05$  entre cepas de PEE y PEPE

PEE: portadores etapa epidémica, PEPE: portadores etapa posepidémica, NA: no agrupable, NT: no tipable.

### DISTRIBUCIÓN DE SUBTIPOS

Prevalecieron las cepas P1.NST (29,31 %), P1.19,15 (22,96 %), P1.13 (12,69 %) y P1.6 (10,88 %). El resto de los subtipos mostró

porcentajes por debajo de 5 % (tabla 4). Se detectaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre las cepas P1.NST; P1.19.15 y P1.13. En PEE predominó el subtipo P1.19.15 (61,91 %), este disminuyó significativamente en PEPE (4,87 %). Mientras que, en PEPE, las cepas P1.NST (34,96 %), mostraron un porcentaje superior al identificado en PEE (17,14 %) y el subtipo P1.13 en PEPE (16,81 %), aumentó respecto a la cifra detectada en PEE (3,84 %) ( $p < 0,05$ ).

**TABLA 4.** Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica y posepidémica, según subtipos. Cuba, 1982-2002

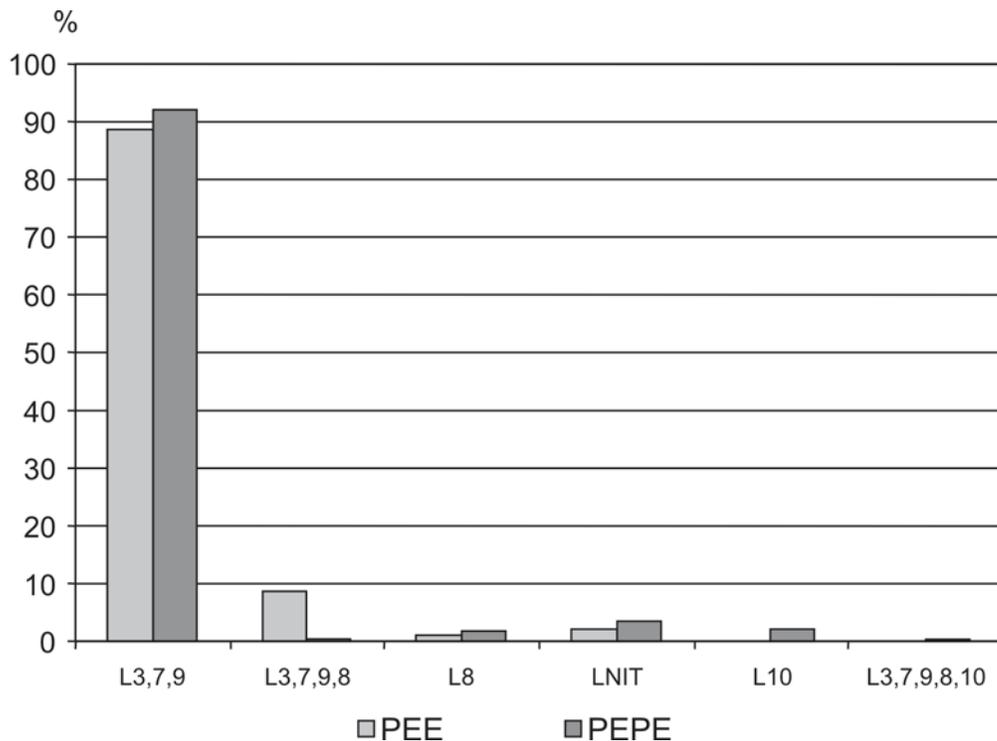
Subtipos	PEE		PEPE		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%
P1,NST*	18	17,14	79	34,96	97	29,31
P1,4	0	0,0	12	5,31	12	3,63
P1,5	0	0,0	8	3,54	8	2,42
P1,6	8	7,62	28	12,39	36	10,88
P1,7	0	0,0	15	6,64	15	4,53
P1,7,1	1	0,95	0	0,0	1	0,30
P1,7,10	0	0,0	1	0,44	1	0,30
P1,7,13	0	0,0	1	0,44	1	0,30
P1,10	0	0,0	1	0,44	1	0,30
P1,10,4	0	0,0	1	0,44	1	0,30
P1,12	1	0,95	10	4,43	11	3,32
P1,13*	4	3,82	38	16,81	42	12,69
P1,14	0	0,0	7	3,10	7	2,12
P1,15	3	2,85	12	5,31	15	4,53
P1,19	5	4,76	1	0,44	6	1,81
P1,19,15*	65	61,91	11	4,87	76	22,96
P1,10,13	0	0,0	1	0,44	1	0,30
Total	105	100	226	100	331	100

\*  $p < 0,05$  entre cepas de PEE y PEPE

PEE: portadores etapa pre-epidémica, PEPE: portadores etapa posepidémica, NST: no subtipable.

### DISTRIBUCIÓN DE INMUNOTIPOS

Predominó el inmunotipo L3,7,9: PEE (88,57 %) y PEPE (91,59 %). La asociación L3,7,9,8 fue mayor en PEE (8,57 %) y aunque, L8 y L10, exhibieron porcentajes bajos, fueron más frecuentes en PEPE (1,78 y 2,21 %), respectivamente. Se identificaron cifras bajas de cepas NIT en ambos grupos: PEE (1,91 %) y PEPE (3,54 %) (fig. 1).



PEE: portadores etapa epidémica, PEPE: portadores etapa posepidémica, LNIT: no inmunotípable.

Fig. 1. Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica y posepidémica, según inmunotipos. Cuba, 1982-2002

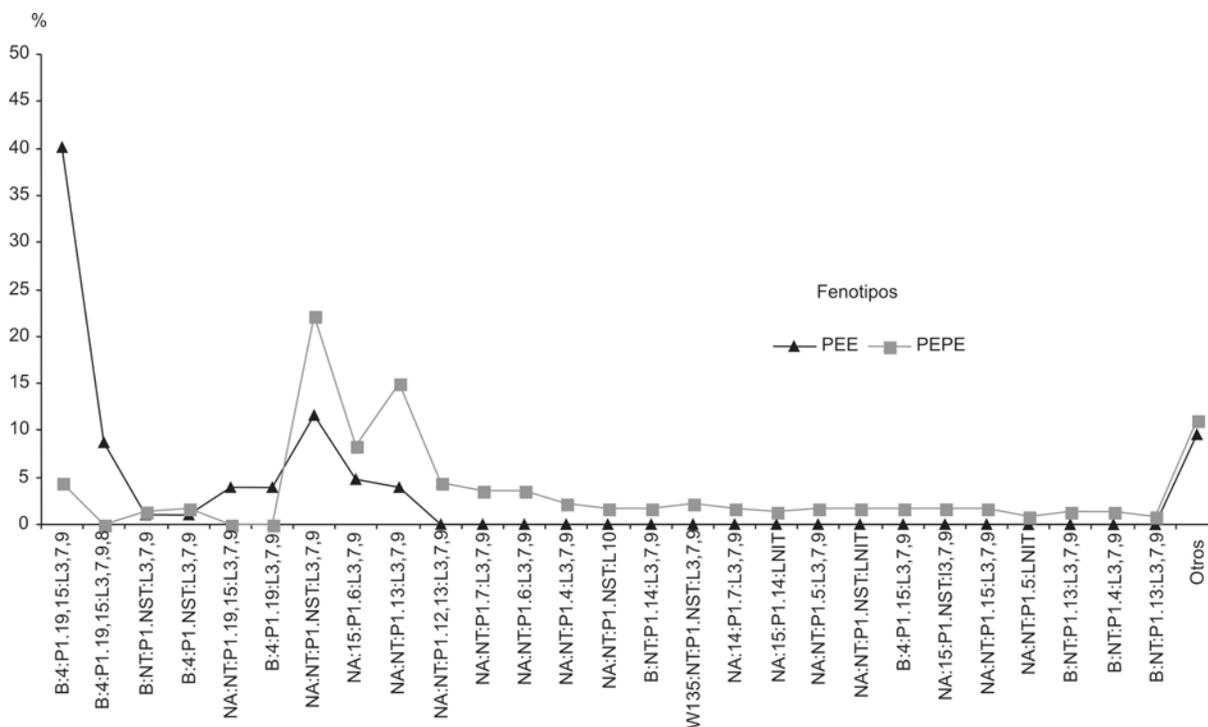


Fig. 2. Fenotipos detectados en cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica y posepidémica. Cuba, 1982-2002

## DISTRIBUCIÓN DE FENOTIPOS

Los fenotipos se muestran en la figura 2. En PEE predominó el B:4:P1.19,15:L3,7,9 (40,08 %), asociación que descendió a 4,43 % en PEPE ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, en PEPE prevalecieron las cepas NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (22,12 %), fenotipo que en PEE mostró un porcentaje inferior (11,54 %). Es de destacar que en PEPE existió una mayor heterogeneidad de asociaciones fenotípicas entre las cepas detectadas. En el término “otros”, se incluyeron los fenotipos identificados en un solo aislamiento (tabla 5).

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

Fenotipos etapa epidémica	Fenotipos etapa posepidémica
1. B:NT:P1.NST:L3,7,9	1. B:14:P1.NST:L3,7,9
2. B:4:P1.NST:L3,7,9	2. NA:4:P1.19:L3,7,9
3. B:NT:P1.15:L3,7,9	3. NA:NT:P1.12,13:L3,7,9
4. NA:2b:P1.NST:L3,7,9	4. NA:15:P1.14:L3,7,9
5. B:NT:P1.6:L3,7,9	5. B:4:P1.7:L3,7,9
6. NA:4:P1.NST:L3,7,9	6. NA:NT:P1.NST:L3,7,9,10
7. NA:NT:P1.12:L3,7,9	7. NA:15:P1.19:L3,7,9
8. NA:1:P1.7,1:L3,7,9	8. Y:NT:2.L3,7,9
9. B:4:P1.19:L8	9. NA:NT:P1.10:L3,7,9
10. NA:NT:P1.19:L3,7,9	10. NA:4:P1.13:L3,7,9
	11. NA:14:P1.7,10:L3,7,9
	12. B:4:P1.4:L8
	13. B:NT:4:P1.6:L3,7,9
	14. NA:NT:P1.10,4:L3,7,9
	15. NA:4:P1.4:L10
	16. NA:NT:P1.10:L3,7,9
	17. NA:14:P1.NST:LNIT
	18. NA:4:P1.7:L10
	19. B:15:P1.NST:L3,7,9
	20. NA:1:P1.5:L3,7,9
	21. NA:4:P1.5:L3,7,9
	22. NA:NT:P1.7,10:L3,7,9
	23. Z:NT:P1.NST:L3,7,9
	24. NA:4:P1.19,15:L3,7,9
	25. B:4:P1.15:L3,7,9,8
Total = 10 Cepas	Total = 25 Cepas

## DISCUSIÓN

A partir de 1885, fecha en que se reconoció el primer caso de EM en el mundo, se han descrito numerosas epidemias con diversos grados de variación e intensidad.<sup>2</sup> La tasa de incidencia anual fluctúa entre menos de 1/100 000 habitantes - 500/100 000 y cuando las epidemias se presentan, pueden extenderse durante pocas semanas, varios años y hasta dispersarse globalmente.<sup>14</sup> En

respuesta a la epidemia de EM de Cuba causada por *N. meningitidis* B en la década de los ochenta, se obtuvo VA-MENGOC-BC®, vacuna elaborada a partir de vesículas de PME de la cepa CU385/83 (B:4:P1.19,15:L3,7,9) y PC del serogrupo C. Su aplicación en forma de campaña y posterior incorporación al PNI, controló esta epidemia. En el 2004, la incidencia de EM fue inferior (0,3/100 000 habitantes) a la que se registró al inicio de la epidemia (0,8/100 000 habitantes).<sup>11</sup> Aislamientos clínicos de esa etapa mostraron que 62,6 % de las cepas prevalentes (B:4:P1.15) pertenecieron al complejo clonal ET-5 (Martínez Motas I. *Neisseria meningitidis*: Contribución al transporte - conservación y caracterización de cepas aisladas en Cuba [1982-2002]. [Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas]. 2004. Instituto de Medicina Tropical, La Habana.), también identificado en Europa y América Latina.<sup>14,15</sup>

*N. meningitidis* coloniza la nasofaringe humana, lugar donde suele actuar como un visitante inofensivo, incapaz de ocasionar, en la mayoría de los casos, signos clínicos de infección.<sup>1</sup> Sin embargo, una minoría de la población colonizada puede desarrollar procesos infecciosos graves que se manifiestan de forma endémica, hiperendémica, como brotes, epidemias o pandemias, o ambas.<sup>8</sup> A pesar de la importancia que se reconoce a los portadores en la biología de *N. meningitidis* y la idea que, cambios en la prevalencia de portadores con cepas de algunos fenotipos y complejos clonales, son responsables de variaciones en la epidemiología de la EM, la relación entre los portadores y casos invasivos, no está totalmente definida.<sup>1,2</sup>

Al comparar PEE y PEPE se evidenciaron cambios en las cepas estudiadas. El inicio de la epidemia de EM de Cuba se caracterizó por el predominio de los serogrupos C y B, situación que motivó la aplicación de la vacuna de polisacárido A-C.<sup>9</sup> Luego de esa intervención, el serogrupo B ascendió vertiginosamente y la EM se convirtió en el principal problema de salud. La situación epidémica de los años ochenta justificó el predominio del serogrupo B en PEE. Estudios realizados en Cuba durante ese período, mostraron su prevalencia en enfermos (98,7 %) y portadores (81 %).<sup>9</sup> Al no existir en ese momento una vacuna

contra *N. meningitidis* B, se iniciaron investigaciones para desarrollar un candidato vacunal contra este microorganismo pero por la pobre inmunogenicidad de su PC, las estrategias se dirigieron a la obtención de inmunógenos a partir de PME, de ahí la importancia de su caracterización. PorA y PorB son antígenos proteicos capaces de inducir la formación de anticuerpos protectores y han demostrado su efectividad en ensayos clínicos (Frasch CE. Meningococcal vaccines: past, present and future. Meningococcal disease. ed. Keit Cartwright 1995, John Wiley & Sons Ltd. p. 245-83).<sup>5</sup> VA-MENGOC-BC® constituye un ejemplo de vacuna elaborada a partir de PME.<sup>5,10</sup>

Durante el inicio y desarrollo de la epidemia de EM en Cuba, países como Noruega, Francia y España, notificaron brotes causados por el serogrupo B,<sup>14,16</sup> estudios de portadores realizados en Francia (61 %) y España (58 %), mostraron su superioridad.<sup>17,18</sup> La EM por *N. meningitidis* B, representó un problema de salud para otras regiones de América Latina. Brasil sufrió en la década de los setenta una de las mayores epidemias del mundo producida por los serogrupos A y C. Sin embargo, a partir de 1986, el serogrupo B fue responsable de 80 % de los casos invasivos.<sup>19</sup> Al concluir los años ochenta, Chile, Argentina, Colombia y EE.UU., registraron su ascenso.<sup>20-22</sup>

En este trabajo no se identificó al serogrupo C, ausencia quizás vinculada con la aplicación masiva de la vacuna A-C y posterior inmunización con VA-MENGOC-BC®. Después de aplicar la vacuna A-C, el serogrupo C disminuyó de 44,6 % en 1979, a 7,2 % en 1980 y en los últimos años, no se aísla de casos invasivos; estudios de portadores realizados recientemente, ratifican su ausencia (Martínez Motas I. *Neisseria meningitidis*: Contribución al transporte - conservación y caracterización de cepas aisladas en Cuba [1982-2002] [Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Médicas] 2004. Instituto de Medicina Tropical, La Habana.) (Álvarez N, Martínez I, Sotolongo F, Gutiérrez M, Zamora L, Izquierdo L, et al. *Neisseria meningitidis* carriers in a day-care center in the city of Havana. In: Abstracts of the 13<sup>th</sup> International Pathogenic *Neisseria* Conference. September 1-6. Oslo, Norway, 2002:329).<sup>23</sup> Sin embargo, a diferencia

de la situación de Cuba, a partir de la década de los noventa otros países notifican su ascenso,<sup>8,24</sup> y en algunos, las altas tasas de incidencia de EM causada por *N. meningitidis* C condujeron a programas de inmunización contra este serogrupo.<sup>25-27</sup> En España, antes de 1994, el serogrupo C representaba menos de 2 %; entre 1996 y 1997, ascendió (70 %) y motivó la inmunización con A-C.<sup>28</sup> Posteriormente, algunas comunidades notificaron el descenso de la cepa epidémica (C:2b:P1.5,2), pero en 2001, surgió un nuevo fenotipo (B:2a:P1.5) y la situación epidemiológica se interpretó como un evento de *switching* (cambio) capsular.<sup>29</sup> En ese período, un estudio de portadores en Gran Canaria mostró predominio del serogrupo B<sup>30</sup> y en Galicia, a pesar de la alta incidencia del serogrupo C, el número de portadores de la cepa epidémica (C:2b:P1.5,2) fue bajo.<sup>25</sup>

Otros trabajos refieren el descenso de portadores del serogrupo C después de realizar campañas de inmunización contra este serogrupo.<sup>28</sup> Actualmente, la disponibilidad de vacunas conjugadas muestran un mayor impacto sobre el estado de portador.<sup>28,31</sup> El Reino Unido señaló una reducción de 66 % de portadores del serogrupo C entre adolescentes, un año después de aplicar la vacuna conjugada contra este serogrupo; tampoco constataron evidencias de *switching* capsular.<sup>26,31</sup> El presente trabajo identificó sobre todo en PEPE, el predominio de *N. meningitidis* NA. Cepas con estas características incluyen a meningococos que no se reconocen con los antisueros de serogrupo empleados o a cepas que carecen del gen de expresión de la cápsula, o ambos. Las cepas NA pueden integrar más de la tercera parte de los aislamientos detectados en portadores. Un trabajo realizado recientemente, notificó que 16,4 % de cepas NA perdió los genes responsables de la síntesis, modificación y transporte del PC.<sup>32</sup> Hoy día, la epidemiología molecular permite investigar los procesos genéticos que anulan la expresión del PC, posibilita conocer aún más a las poblaciones NA y aporta datos útiles para interpretar la biología y patogenia del meningococo.<sup>1,3</sup> El predominio de cepas NA, evidencia un efecto favorable para el control de la EM y pudiera expresar el impacto de las vacunas sobre el estado de portador. En regiones donde no se aplican programas

sistemáticos de vacunación contra *N. meningitidis*, la EM muestra un comportamiento epidemiológico diferente.<sup>33</sup>

El porcentaje de los serogrupos W-135, Y y Z, fue bajo. Sin embargo, *N. meningitidis* Y y W-135 ocasionan casos esporádicos y brotes en otros países.<sup>2,8,34</sup> En la década de los noventa, el serogrupo Y resultó uno de los agentes etiológicos principales de EM en EE. UU.;<sup>2</sup> y recientemente, en un trabajo realizado con una colección de cepas de portadores aisladas entre 1991-2000, en tres países diferentes (Noruega, Grecia, República Checa), el serogrupo Y se ubicó en el tercer lugar de frecuencia.<sup>8</sup> Cepas de *N. meningitidis* W-135, pertenecientes al complejo clonal ET-37 fueron responsables de brotes de EM ocurridos en 2000 y 2001, vinculados con la visita del mundo islámico a La Meca, Arabia Saudita. Sin embargo, un estudio de portadores realizado durante el peregrinaje de 2003, mostró un porcentaje bajo de portadores, el predominio de cepas NA y un número reducido de individuos portaron al serogrupo W-135.<sup>34</sup> Este hallazgo, que contrastó con resultados anteriores, pudo estar quizás influenciado por la inmunización que exigen actualmente para visitar La Meca, o por la administración profiláctica de antimicrobianos a personas que regresan a los países con una alta incidencia de EM.

El serotipo 4, asociado frecuentemente al serogrupo B y al subtipo 15 (B:4:P1.15), predominó en PEE y disminuyó significativamente en PEPE. El fenotipo B:4:P1.15, principal agente etiológico de la epidemia de EM en Cuba,<sup>5,9,10</sup> produjo también brotes en Europa y América Latina.<sup>18,19,22</sup>

A partir de la década de los noventa, cepas del serogrupo B asociadas al sero/subtipo 4:P1.4, ocasionan una morbilidad y mortalidad elevadas en Holanda, Australia y Nueva Zelanda.<sup>35-37</sup> El fenotipo B:4:P1.7b,4 perteneciente al complejo clonal ST-41/ST-44, linaje III, causa una epidemia en Nueva Zelanda (incidencia 17,4/100 000). La situación existente motivó el desarrollo de una vacuna contra la cepa epidémica prevalente; actualmente se inmuniza a la población de riesgo y evalúan su efecto.<sup>37</sup> Un estudio de portadores realizado en Nueva Zelanda, entre contactos familiares de casos clínicos, detectó porcentajes bajos del serogrupo B (11,3 %). Sus autores concluyeron que los resultados obtenidos reflejaron

la baja transmisión y alta virulencia de la cepa epidémica.<sup>38</sup>

En PEPE aumentó el serotipo 15. Su asociación con el serogrupo B se ha notificado en cepas epidemiológicas de España (B:15:P1.15),<sup>18</sup> Noruega (B:15:P1.7,16)<sup>14</sup> y Chile (B:15:P1.3).<sup>20</sup> No obstante, en este trabajo, el serotipo 15 se identificó principalmente asociado con cepas NA, no virulentas o de muy baja virulencia.

Al inicio de la década de los setenta, Noruega señaló al fenotipo B:15:P1.7,16 como el principal agente etiológico de su epidemia;<sup>14</sup> y al igual que Cuba, obtuvo una vacuna a partir de la cepa prevalente (B:15:P1.7,16). La vacuna que se aplicó en escolares de 14-16 años durante el período de 1989-1991, mostró una efectividad de 57,2 %, produjo una ligera reducción de portadores entre los vacunados y se recomendó para la inmunización de adultos con riesgo ocupacional.<sup>39</sup>

Aunque el serotipo 14 se observó solo en PEPE y con un porcentaje bajo, una investigación del Instituto Pasteur con cepas aisladas de portadores lo ubicó entre los más frecuentes,<sup>17</sup> y a partir de 1995, integra el fenotipo B:14:P1.13, asociado principalmente con casos invasivos ocurridos en el nordeste de Italia.<sup>40</sup>

En este trabajo se identificó el predominio del inmunotipo L3,7,9. Sin embargo, otros autores refieren la frecuente asociación de este inmunotipo con cepas aisladas a partir de casos invasivos. Un estudio realizado con cepas de enfermos y portadores (todas del complejo ET-5) mostró al inmunotipo L3,7,9 en 97 % de las muestras clínicas. Mientras que, entre cepas de portadores, el porcentaje de L3,7,9 descendió a 43 % y aumentó el porcentaje de L8.<sup>41</sup>

Luego de analizar los cambios significativos observados en cepas de PEE y PEPE, estos pudieran estar íntimamente relacionados con la aplicación de VA-MENGOC-BC®; la inmunización sistemática y mantenida desde 1991, logró el control exitoso de la EM en Cuba. Es de destacar la disminución significativa de la cepa epidémica (B:4:P1.19,15:L3,7,9) entre PEPE, la ausencia de *N. meningitidis* C durante el período analizado, así como el predominio de cepas no epidemiológicas en PEPE. Estos resultados hablan a favor del impacto ejercido por la vacuna cubana entre las cepas de portadores y de su protección

de amplio espectro contra diferentes sero/subtipos del serogrupo B. Ensayos realizados en modelos animales y estudios de anticuerpos bactericidas en sueros de sujetos inmunizados, demostraron que VA-MENGOC-BC® brinda protección contra diferentes serotipos/subtipos de *N. meningitidis* B, diferentes a los de la cepa CU 385/83, aunque no igualmente contra todos.<sup>5,38,42</sup> Se debe tener en cuenta que en Cuba se utilizó un esquema de vacunación de 2 dosis, separadas entre 6 y 8 semanas una de la otra; diseñada así por haberse generado bajo la presión de una epidemia.<sup>5</sup> Estudios recientes han demostrado que los esquemas de 3 dosis logran una mayor eficacia serológica, incluso frente a cepas heterólogas.<sup>43,44</sup> Un esquema de 3 dosis y refuerzo, como el empleado para otras vacunas, pudiera completar el buen trabajo ya realizado contra la EM en Cuba, la cual además, tiene la ventaja de haber sido una epidemia eminentemente clonal, e incluso pudiera impactar de manera más definitiva entre los portadores sanos.

Se puede concluir que, identificar y conocer los marcadores epidemiológicos circulantes entre las cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores asintomáticos en Cuba durante 20 años, resultó una actividad imprescindible y de gran valor para realizar una mejor interpretación epidemiológica de la EM y posibilitó también evaluar indirectamente, el impacto de VA-MENGOC-BC®. Disponer de un mejor diagnóstico e identificación de las cepas circulantes, proporciona datos importantes para el enfoque de nuevas estrategias de producción y mejoramiento de preparados vacunales contra la EM. La continuación de trabajos similares y aplicación de métodos moleculares, permitirá un mejor conocimiento de la dinámica de las cepas circulantes, para en caso necesario, valorar alternativas en la incorporación de nuevos antígenos que respondan a las cepas prevalentes.

#### Characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from carriers in Cuba during 20 years

##### SUMMARY

The epidemiological markers of *Neisseria meningitidis* strains isolated from carriers in Cuba for 20 years (1982-2002) were investigated. There were identified the serogroups, serotypes,

subtypes and immunotypes of 331 strains corresponding to 2 different stages: epidemic (1982-1992) and postepidemic (1993-2002). A predominance of serogroup B (67.62 %) and of non-groupable strains (32.28 %) was observed in the epidemic stage, whereas the non-groupable strains (79.65 %) and the serogroup B (17.26 %) ( $p < 0,05$ ) prevailed in the postepidemic stage. This study is the first and the only one up to now that investigates *Neisseria meningitidis* strains isolated from carriers before and after a national mass campaign of immunization with VA-MENGOC-BC® (Cuban antimeningococcal vaccine against the serogroups B and C). The results obtained offered valuable data to the study, prevention and successful control of the meningococcal disease in Cuba, as well as to the development and evaluation of this vaccine.

**Key words:** *Neisseria meningitidis*, asymptomatic carriers, epidemiological markers, phenotypes, antimeningococcal vaccine.

##### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. J Med Microbiol 2004;53:821-32.
2. Rosenstein EN, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM Meningococcal disease. N Engl J Med 2001;344:1378-86.
3. Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S., Musilek M, Kriz P et al. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. J Clin Microbiol. 2000; 38:4492-8.
4. Pichichero ME. Meningococcal conjugate vaccines. Expert Opin Biol Ther 2005;5:1475-89.
5. 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;14:195-207.
6. Frasch CE, Zollinger WD, Poolman JT. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. Rev Infect Dis 1985;7:504-10.
7. Kuipers B, van den Dobbelaars G, Wedege E, van Alphen L. Serological characterization. In: Pollard AJ, Maiden MC, eds. Meningococcal disease: methods and protocols. Totowa (NJ): Humana Press; 2001. p. 131-45.
8. Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou J, Kalmusova J, Musilek M, et al. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. J Clin Microbiol 2004;42:5144-53.
9. Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. Ira. ed. La Habana: Ed. Ciencias Médicas; 1991.
10. Pérez Rodríguez A, Dickinson F, Baly A, Martínez R. The epidemiological impact of antimeningococcal vaccination in Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:433-40.
11. 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>
12. Knapp JS, Koumans EH. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. eds. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington D.C.:ASM Press; 1999; p. 586-603.
13. Abdillahi H, Poolman JT. Whole cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. FEMS Microbiol Lett 1987;48:367-71.

14. Caugant DA, Frohølm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LS, et al. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol* 1987;53:389-94.
  15. Diermayer D, Hedberg K, Hoesly F, 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.
  16. Caugant D. Populations genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. *APMIS* 1998;106:505-25.
  17. 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.
  18. Vázquez JA. Infección meningocócica. Informe del Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo. Años 1989-1992. *Bol Epidemiol Microbiol* 1993;1:209-11.
  19. Sacchi CT, Lemos AP, Popovic T, de Moraes JC, Whitney AM, Melles CE, et al. Serotypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: Overview and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2001;39:2897-903.
  20. 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;122:760-7.
  21. 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;118:295-301.
  22. Tondella ML, Popovic T, Rosenteins NE, Lake DB, Carlone GM, Mayer LW, et al. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serotypes and serotypes circulating in the United States. *J Clin Microbiol* 2000;38:3323-8.
  23. 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.
  24. Antignac A, Ducos-Galand M, Guiyoule A, Pires R, Alonso JM, Taha MK. *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive infections in France (1999-2002): phenotypes and antibiotic susceptibility patterns. *Clin Infect Dis* 2003;37:912-20.
  25. Fernández S, Arreaza L, Santiago I, Malvar A, Berrón S, Vázquez JA, et al. Carriage of a new epidemic strain of *Neisseria meningitidis* with the incidence of meningococcal disease in Galicia, Spain. *Epidemiol Infect* 1999;123:349-57.
  26. Maiden MCJ, Stuart JM, Bramley JC, MacLennan JM, Gray S, Andrew N. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococcal C conjugate polysaccharide vaccination. *Lancet* 2002;359:1829-31.
  27. Navarro JA. La inmunización frente a *Neisseria meningitidis* serogrupo C con vacuna conjugada: siete años de experiencia. *Rev Pediatr Aten Primaria* 2006;8:65-86.
  28. Fernández S, Arreaza L, Santiago I, Malvar A, Berrón S, Vázquez JA, et al. Impact of meningococcal vaccination with combined serogroups A and C polysaccharide vaccine on carriage of *Neisseria meningitidis* C. *J Med Microbiol* 2003;52:75-7.
  29. Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L, Berrón 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;51:102-6.
  30. García A, Bordes A, Lafarga B, Vázquez J, López E, García P, et al. Encuesta de portadores de *Neisseria meningitidis* en el área de salud de Gran Canaria. *Rev Esp Salud Pública* 2000;74:419-24.
  31. Balmer P, Borrow R, Miller E. Impact of meningococcal C conjugate vaccine in the UK. *J Med Microbiol* 2002;51:717-22.
  32. Claus H, Maiden MC, Maag R, Frosch M, Vogel U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology* 2002;148:1813-9.
  33. 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.
  34. Balkhy HH, Memish ZA, Almunef MA, Osoba AO. *Neisseria meningitidis* W-135 carriage during the Hajj season 2003. *Scand J Infect Dis* 2004;36:264-8.
  35. Australian Meningococcal Surveillance Programme. Annual report of the Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2002. *Commun Dis Intell* 2003;27:196-208.
  36. Devoy AF, Dyet KH, Martin DR. Stability of PorA during a meningococcal disease epidemic. *J Clin Microbiol* 2005;43:832-37.
  37. Ameratunga S, Macmillan A, Stewart J, Scott D, Mulholland K, Crengle S, et al. Evaluating the post-licensure effectiveness of a group B meningococcal vaccine in New Zealand: a multi-faceted strategy. *Vaccine* 2005;23:2231-4.
  38. Simmons G, Martin DR, Stewart J, Jones N, Calder L, Bremner D. Carriage of *Neisseria meningitidis* among household contacts of patients with meningococcal disease in New Zealand. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:237-42.
  39. 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;14:17:2377-83.
  40. Mastrantonio P, Stefanelli P, Fazio C, Sofia T, Neri A, La Rosa G, et al. Serotype distribution, antibiotic susceptibility, and genetic relatedness of *Neisseria meningitidis* strains recently isolated in Italy. *Cin Infect Dis* 2003;36:422-8.
  41. 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;3:219-24.
  42. Morley SL, Cole MJ, Ison CA, Camaraza MA, Sotolongo F, Anwar N, et al. Immunogenicity of a serogroup B meningococcal vaccine against multiple *Neisseria meningitidis* strains in infants. *Pediatr Infect Dis J* 2001;20:1054-61.
  43. Tappero JW, Lagos R, Ballesteros AM, Plikaytis B, Williams D, Dykes J, et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer-membrane protein meningococcal vaccines: a randomized controlled trial in Chile. *JAMA* 1999;281:1520-7.
  44. Perkins BA, Jonsdottir K, Briem H, Griffiths E, Plikaytis BD, Hoiby EA, et al. Immunogenicity of two efficacious outer membrane protein-based serogroup B meningococcal vaccines among young adults in Iceland. *J Infect Dis* 1998;177:683-91.
- Recibido: 25 de enero de 2006. Aprobado: 5 de mayo de 2006.  
 Dra. Isabel Martínez Motas. Instituto "Finlay". Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. AP 16017, CP11600, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: isabelm.motas@ifomed.sld.cu