

ARTÍCULO ORIGINAL/ARTIGO ORIGINAL

Prevalencia y dinámica de portadores asintomáticos de *Neisseria meningitidis* en estudiantes universitarios de una escuela militar de Ciudad de La Habana

Prevalence and dynamics of asymptomatic carriers of *Neisseria meningitidis* in university students at a military school in the City of Havana

Niury Núñez Gutiérrez¹, Isabel Martínez Motas², Luis Izquierdo Pérez³, Mayelin Mirabal Sosa⁴, Gustavo Sierra González⁵

¹Lic. Bioquímica. MsC. Bacteriología - Micología. Instituto Finlay. Centro de Investigación - Producción de Vacunas, Ciudad de La Habana, Cuba. ²PhD. Médico Especialista de 2º Grado en Microbiología. Investigador Titular. Instituto Finlay. Centro de Investigación - Producción de Vacunas, Ciudad de La Habana, Cuba.

³Lic. Matemática. Investigador Agregado. Instituto Finlay. Centro de Investigación - Producción de Vacunas, Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴Lic. Matemática. Instituto Finlay. Centro de Investigación - Producción de Vacunas, Ciudad de La Habana, Cuba. ⁵PhD. Médico Especialista de 2º Grado en Inmunología. Investigador Titular. Académico Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. Instituto Finlay. Centro de Investigación - Producción de Vacunas, Ciudad de La Habana, Cuba.

Conflicto de intereses: ninguno

Rev. Panam Infectol 2006;8(1):9-17

Recibido el 12/9/2005.

Aceptado para publicación el 8/2/2006.

Resumen

Los estudios de portadores proporcionan datos útiles para el seguimiento epidemiológico de la enfermedad meningocócica. Las evidencias indican que un aumento del índice de portadores de *N. meningitidis* suele preceder y acompañar a brotes y epidemias. *Neisseria meningitidis* es un patógeno humano estricto y muchos casos invasivos ocurren sin el contacto previo con otros enfermos, luego los portadores asintomáticos deben ser la principal fuente de infección. Para conocer la prevalencia y dinámica de portadores en estudiantes universitarios de una escuela militar de Ciudad de La Habana, durante un período de baja endemidad (marzo-junio, 1999), se realizó un estudio longitudinal observacional durante cuatro meses, en 163 alumnos. En todos se tomó, el primer lunes de cada mes, exudado de la nasofaringe posterior, según el método convencional del hisopado y siembra en medio de cultivo selectivo. Además, se elaboró una encuesta para analizar los posibles factores de riesgo que favorecen al estado de portador. *N. meningitidis* se identificó por técnicas convencionales, los sero/subtipos e inmunotipos se clasificaron por ELISA de células enteras con anticuerpos monoclonales. Se observó una prevalencia de portadores del 32% y una dinámica caracterizada por el predominio de portadores persistentes (61%). Los fenotipos NA:NT:P1.NST:L3.7.9 (25%), NA:NT:13:L3,7,9 (19%) fueron los más frecuentes y sólo el 7.6% resultó B4:P1.15:L3.7.9, fenotipo causal de la epidemia ocurrida en Cuba. La reducción del índice de portadores de la cepa epidémica, así como la ausencia del serogrupo C, está relacionada con la inmunización masiva realizada en Cuba con VA-MENGOC-BC, entre 1987-90 y con su incorporación al Programa Nacional de Inmunizaciones, desde 1991.

Palabras clave: *Neisseria meningitidis*, enfermedad meningocócica, portadores, asintomáticos, prevalencia, dinámica, factores de riesgo

Abstract

Carrier studies provide data of extraordinary value for the epidemiological follow-up of the meningococcal disease. There are proven relations between the strains detected in carriers and patients in the same regions or localities. An increase in the number of carriers usually precedes and accompanies outbreaks and epidemics. Taking into account that *N. meningitidis* is a strict human pathogen and that many cases occur without a previous contact with other patients, the main source of infection should be the asymptomatic carriers. A longitudinal observational study was made during 4 months in 163 students in order to find the prevalence and dynamics of carriers in a university military school in the City of Havana, during a period of low incidence of the disease (March-June, 1999). Nasopharyngeal swabs were taken according to the conventional method and culture in selected culture media. Additionally, a survey was elaborated to analyze the possible risk factors that favour the state of carriers. *N. meningitidis* was identified by conventional techniques, sero/subtypes and immunotypes were classified by ELISA with monoclonal antibodies. There was a carrier prevalence of 32%, with a dynamic characterized by the predominance of persistent carriers (61%), phenotypes NA:NT:P1.NST:L3.7.9 (25%), NA:NT:P1.13:L3.7.9 (19%), and only 7.6% was B4:P1.15:L3.7.9, the phenotype that caused the epidemic occurred in Cuba. The reduction in the number of carriers of this epidemic strain, as well as the absence of serogroup C, is related with the massive immunization carried out in Cuba with VA-MENGOC-BC from 1987-90 and later, 1991 its incorporation to the National Immunization Program.

Key words: *Neisseria meningitidis*, meningococcal disease, asymptomatic carriers, prevalence, dynamics, risk factors.

Introducción

Neisseria meningitidis, agente etiológico de la enfermedad meningocócica (EM), es un comensal obligado del hombre, coloniza la mucosa nasofaríngea y ocasiona el estado de portador asintomático. La mayoría de los individuos colonizados no presentan manifestaciones clínicas invasivas. No obstante, una minoría puede desarrollar meningoencefalitis, meningococemia, u otro cuadro clínico⁽¹⁾.

Las medidas aplicables para la prevención y control de la EM son la quimioprofilaxis e inmunoprofilaxis, ambas pueden desempeñar un papel importante en el control de los portadores^(2,3). Sin embargo, la emergencia de cepas resistentes cifra en la inmunoprofilaxis la esperanza del control efectivo de esta entidad clínica^(1,3).

Los portadores se reconocen desde 1890, el papel que desempeñan y su relación con los casos clínicos invasivos no está aún totalmente definido. Sin embargo, el estudio de los mismos facilita datos de extraordinario valor para el seguimiento epidemiológico de la EM. Existen relaciones probadas entre las cepas aisladas de enfermos y portadores, así como un aumento del índice de portadores en etapas epidémicas y pre-epidémicas, con su disminución en períodos inter-epidémicos, junto a una pérdida de los factores de virulencia de cepas de portadores aisladas en este etapa^(1,2). Presumiblemente, los portadores constituyen el principal vehículo de transmisión de *N. meningitidis*, al ser este microorganismo un patógeno humano estricto y producir casos invasivos, sin el antecedente previo de un contacto con otro enfermo; la fuente de infección, sin dudas, la constituye el portador asintomático^(1,2). Este también puede actuar como un elemento inmunizante, capaz de generar anticuerpos protectores^(1,2,3). Conocer la prevalencia y marcadores epidemiológicos de cepas aisladas de portadores permite comprender mejor la epidemiología de la EM, hacer una selección adecuada de los quimioprofilácticos a suministrar entre los contactos de casos clínicos y puede demostrar también el efecto de las vacunas disponibles en poblaciones inmunizadas^(1,2,3,4).

Durante etapas endémicas, la prevalencia de portadores fluctúa entre el 5-40%⁽⁴⁾, cifra que puede ser más elevada en instituciones cerradas, pequeñas comunidades étnicas y contactos de casos clínicos invasivos^(1,2,5). La duración del estado de portador puede ser crónica, perdurar varios meses, intermitente o transitoria⁽¹⁾.

Debido a la ausencia de una vacuna eficaz contra *N. meningitidis* serogrupo B, al comienzo de la epidemia de EM en Cuba, y constituir esta enfermedad el principal problema de salud en la década del 80, se desarrolló y evaluó, entre 1982-89, la vacuna antimeningocócica cubana contra los serogrupos B y C (VA-MENGOC-BC). En 1989 se realizó una campaña de vacunación a la población de tres meses a 24 años; en 1991, se incorporó al Programa Nacional de Inmunización (PNI) y a partir de esa fecha, todos los lactantes reciben dos dosis (a los tres y cinco meses de edad)⁽⁶⁾. La amplia cobertura alcanzada jugó un papel decisivo en la reducción y control de la epidemia de Cuba^(6,7,8); actualmente, sólo se notifican casos aislados (incidencia 0.3/100 000 habitantes). Después de 13 años de la incorporación de VA-MENGOC-BC al PNI, resulta de gran interés realizar estudios de portadores en diferentes grupos de riesgo. Este trabajo se realizó con el objetivo de conocer la prevalencia y dinámica de la portación de *N. meningitidis*, los factores de riesgo asociados y los fenotipos más frecuentes en estudian-

tes universitarios de una escuela militar, vacunados con VA-MENGOC-BC.

Pacientes, materiales y métodos

Se realizó un estudio longitudinal observacional de portadores de *N. meningitidis* durante los meses de marzo, abril, mayo y junio del año 1999, previa aprobación del Comité de Ética del Instituto Finlay y el consentimiento informado de los participantes. Su diseño y ejecución cumplió con los principios éticos para las investigaciones médicas en los seres humanos, contenidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, con los enunciados aprobados en la 52ª Asamblea General celebrada en Edimburgo, Escocia, en octubre del 2000⁽⁹⁾.

De los 285 estudiantes universitarios, matriculados en una escuela militar de Ciudad de La Habana y con edades comprendidas entre 17-22 años, 163 cumplieron con los criterios de inclusión: voluntariedad, permanencia en la institución durante toda la investigación y no estar bajo tratamiento con antimicrobianos, inmunosupresores, u otros medicamentos que pudieran interferir con los resultados del estudio, siete días antes de tomar la muestra.

Definición operacional de las variables estudiadas

Para cumplimentar los objetivos del trabajo respecto a los factores de riesgo o variables que influyen sobre el estado de portador, todos los estudiantes llenaron una encuesta. Se utilizaron las siguientes definiciones operacionales:

1. Estado de portador

Portador ocasional: Alumno con un sólo aislamiento de *N. meningitidis* en los cuatro meses; portador intermitente: Alumno con dos aislamientos de *N. meningitidis* en los cuatro meses y portador persistente: Alumno con aislamiento de *N. meningitidis* en tres ó cuatro de los meses investigados.

2. Hábito de fumar

Fumador: Alumno que consumía cualquier cantidad de cigarrillos al día; no fumador: Alumno sin exposición activa al cigarro; fumador pasivo: Alumno que convivía con al menos un fumador.

3. Hacinamiento

Para los alumnos internos: Si en el dormitorio, la distancia entre literas era menor a un metro y para los externos: Si compartían el dormitorio con más de dos personas.

4. Infección respiratoria aguda reciente (IRAR):

Alumno con síntomas respiratorios un mes anterior a la toma de muestra y que remitieron espontáneamente.

5. Consumo de bebidas alcohólicas

Abstinentes total: Alumno que nunca consumía bebidas alcohólicas; bebedor excepcional: Alumno que

consumía bebidas alcohólicas en cantidades limitadas y situaciones especiales; bebedor social: Alumno que consumía bebidas alcohólicas sin transgredir las formas sociales; alcohólico: Alumno dependiente o adicto a las bebidas alcohólicas y que mostraba una forma acumulativa de conductas asociadas al consumo de las mismas.

Amigdalectomía: Alumno con extirpación quirúrgica de las amígdalas.

Exudado nasofaríngeo

Se realizó exudado de la nasofaringe posterior con hisopo de algodón estéril. Inmediatamente, éste se sembró en placas de Agar Mueller Hinton (Merck) con suero fetal bovino al 5% (Hyclone) y suplemento inhibidor VCN (bioMérieux), compuesto por: vancomicina (3 µg/mL), colistina (750 µg/mL) y nistatina (150 µg/mL). En un lapso de tiempo no mayor a las dos horas, las placas inoculadas se trasladaron al Laboratorio de Microbiología del Instituto Finlay, donde se estiraron e incubaron a 37°C y atmósfera húmeda con un 5-10% de CO₂. La lectura se realizó a las 24 y 48 horas de incubación. Se hizo exudado nasofaríngeo a 163 estudiantes; a cada uno se les tomó un cultivo el primer lunes de cada mes, durante los meses de marzo, abril, mayo, junio de 1999. Se realizaron y procesaron un total de 652 muestras.

Identificación y caracterización de las cepas de *N. meningitidis*

A partir de cada exudado, se aislaron las colonias con características culturales similares a *N. meningitidis* y se identificó género y especie, según los métodos convencionales⁽¹⁰⁾. El seroagrupamiento se realizó por aglutinación en lámina con antisueros serogrupo específicos: A, B, C, X, Y, Z, y W135 (Difco)⁽¹⁰⁾. Posteriormente, para la identificación de serotipos, subtipos e inmunotipos, se empleó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales (AcM)⁽¹¹⁾. Para el sero/subtipaje se disponía del paquete comercial del RIVM (Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente de Holanda), con 6 AcM de serotipo y 13 de subtipos. En el inmunotipaje, se emplearon los AcM: L3,7,9; L8 y L10, producidos por el NIBSC (Instituto Nacional para el Control Biológico y Estándares del Reino Unido).

Análisis estadístico

En el análisis estadístico se aplicó: El test Chi-cuadrado, para evaluar de forma aislada el impacto de cada supuesto factor de riesgo; estimación por intervalos de confianza para proporciones, según el método aproximado de Wilson; y regresión logística, para analizar los posibles factores de riesgo de manera conjunta.

Tabla 1. Prevalencia de portadores de *N. meningitidis* en 163 estudiantes, según el número de casos positivos y porcentajes detectados, en cada uno de los meses investigados

Meses Muestreados	Alumnos Investigados	Portadores <i>N. meningitidis</i>		Intervalo de Confianza	
		No	%	LI	LS
Marzo	163	44	26.99	20.76668	34.28046
Abril	163	44	26.99	20.76668	34.28046
Mayo	163	32	19.63	14.26344	26.39879
Junio	163	33	20.24	14.79483	27.06615

Leyenda: LI = Límite inferior; LS = Límite superior

Resultados

Entre los 163 individuos investigados cada mes, el 32% resultó ser portador de *N. meningitidis*, porcentaje que incluyó a todos los estudiantes en los cuales se aisló e identificó este microorganismo. De los 44 alumnos que cursaban el primer año académico, el 41% (IC 95%:27.7%-55.6%) fueron portadores. Mientras que, en los 119 estudiantes del tercer año, sólo el 28% (IC 95%:21.2%-37.3%) mostró dicha condición.

Al analizar la dinámica del estado de portador durante los cuatro meses investigados (tabla 1), los porcentajes de prevalencia resultaron similares. El mayor número se detectó en los meses de marzo y abril (44 estudiantes). Mientras que, en mayo y junio, existió una ligera disminución del número de portadores de *N. meningitidis* (32 y 33 estudiantes), respectivamente. Sin embargo, esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

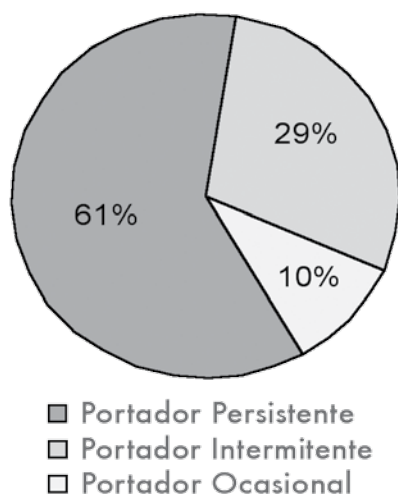


Figura 1. Dinámica del estado de portador de *N. meningitidis* en los 163 estudiantes investigados

Al analizar la dinámica del estado de portador, del total de estudiantes identificados como portadores de *N. meningitidis*, el 90.4% mantuvo esta condición por más de una ocasión (IC 95%:79.4%-95.9%), es decir, prácticamente mantuvieron esta condición durante todo el período investigado.

Según la dinámica del estado de portador (figura 1), predominaron los portadores persistentes (61%), mientras que los intermitentes (29%) y ocasionales (10%) se identificaron en un porcentaje menor.

Los marcadores epidemiológicos se muestran en la tabla 2. Predominaron las cepas no agrupables (79%), no tipables (79%), no subtipables (36%) y el inmunitipo L3,7,9 (94%), con una mayor diversidad entre los subtipos identificados.

Las asociaciones fenotípicas fueron diversas (tabla 3), prevalecieron las cepas NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (25%), NA:NT:P1.13:L3,7,9 (19.2%) y las B:4:P1.15:L3,7,9 (7.6%). El resto, mostró porcentajes inferiores.

Tomando en cuenta la dinámica del estado de portador y la distribución fenotípica, las cepas NA:NT:P1.NST:L3,7,9 y NA:NT:P1.13:L3,7,9 fueron las más frecuentes entre los portadores persistentes, intermitentes y ocasionales. Sin embargo, el fenotipo B:4:P1.15:L3,7,9 no se aisló en los portadores ocasionales (tabla 3).

En ninguno de los parámetros analizados como posibles factores de riesgo para el estado de portador de *N. meningitidis* (hábito de fumar, consumo de bebidas alcohólicas, hacinamiento, antecedente de IRA y amigdalectomía) se demostró una asociación estadísticamente significativa ($P > 0.05$) (tabla 4). Resultados similares se obtuvieron al asociar la dinámica del estado de portador con los factores de riesgo investigados.

Discusión

Se detectó una prevalencia de portadores de *N. meningitidis* similar a la descrita en poblaciones mili-

Tabla 2. Marcadores fenotípicos entre las cepas de *N. meningitidis* aisladas

Marcadores fenotípicos	Clasificación	Nº aislamientos	%
Serogrupos	NA	41	79
	B	9	17
	W135	2	4
	Total:	52	Total: 100
Serotipos	NT	41	79
	15	5	10
	4	4	8
	14	2	4
	Total:	52	Total: 100
Subtipos	P1.NST	19	36
	P1.13	11	21
	P1.15	9	17
	P1.6	4	8
	P1.7	3	6
	P1.4	2	4
	P1.5	1	2
	P1.12	3	6
	Total:	52	Total: 100
Inmunotipos	L3,7,9	49	94
	NIT	2	4
	L10	1	2
	Total:	52	Total: 100

Leyenda: NA = No agrupable; NT = No tipable; NST = No subtipable y NIT = No inmunotipable

tares de otros países^(12,13,14). Sin embargo, estudios de portadores realizados anteriormente en Cuba notificaron porcentajes más bajos. Esos trabajos se ejecutaron en grupos donde las cifras de portadores suelen ser inferiores y ninguno correspondió a una población con características similares a la nuestra⁽⁶⁾. Al estar estos estudiantes militares sometidos a condiciones de vida que propician una mayor interacción social (maniobras militares, acampadas, movilizaciones, entre otras), se incrementa la transmisión de *N. meningitidis* entre los mismos.

El porcentaje de portadores coincide también con el descrito en personas cuya edad oscila entre 15-24 años, grupo donde señalan las cifras más elevadas (24-37%)^(15,16,17). Sin embargo, los niños pequeños y adultos mayores de 24 años muestran tasas inferiores al 10%^(1,5). Estudios de portadores realizados en Cuba, en niños de un círculo infantil y una escuela primaria de Ciudad de La Habana, señalan porcentajes del

4.3 y 6.9%, respectivamente^(18,19).

En individuos que ingresan por primera vez a la universidad o unidades militares, se notifica un ascenso rápido del número de portadores^(1,5). Este incremento se presenta durante el primer mes del curso académico y principalmente sucede en la primera semana de clases⁽²⁰⁾. Aunque nuestro trabajo no se realizó al inicio del curso académico, el número de portadores entre los alumnos del primer año superó la cifra detectada en los del tercer año (grupo mayoritario en este estudio). La diferencia entre ambos grupos pudo estar favorecida por los cambios de vida que enfrentan los jóvenes al iniciar estudios superiores o al incorporarse a un régimen militar.

En nuestro estudio, la mayoría de los portadores pertenecieron a la clasificación de persistente, es decir, mantuvieron esta condición durante el período investigado. La duración del estado de portador de *N. meningitidis* no está totalmente definida. Algunos estiman que puede variar entre 1-12 meses y mostrar diferencias según los serogrupos circulantes⁽²⁾. En europeos y americanos la duración media del estado de portador se estimó entre 9-10 meses^(5,21,22), en nigerianos resultó de 3 meses⁽²³⁾ y entre alemanes adolescentes el promedio fue de 10 semanas⁽²⁴⁾. En portadores de *N. meningitidis* A, se describen altas tasas de adquisición y una corta permanencia de este serogrupo en la nasofaringe⁽²²⁾. Mientras que en portadores del serogrupo B señalan bajas tasas de adquisición y una permanencia mayor de 12 meses, discrepancia quizás influenciada por la diferencia existente en el poder inmunizante de ambos serogrupos^(22,25).

En reclutas que iniciaron su vida militar en Dinamarca, después de transcurrir los tres primeros meses de convivencia, observaron variaciones en la detección de portadores ya desde el primer mes de su incorporación al campamento militar, el 20% de los no-portadores adquirieron la condición de portador asintomático⁽²⁶⁾.

La técnica del hisopado de la nasofaringe y los métodos de laboratorio empleados pueden influir en la tasa e intermitencia de los portadores. Los estudios puntuales no aportan datos acerca del tiempo de portación, mientras que los hisopados repetidos en un mismo individuo dan idea de su persistencia, sin estar exentos de dificultades en cuanto al diseño e interpretación^(5,27). Para algunos, la sensibilidad del cultivo de la nasofaringe, empleando el método convencional del hisopado y siembra en un medio selectivo, oscila entre el 60-83%⁽²⁸⁾. Otros consideran que el método convencional subestima la cantidad de portadores a identificar, recomendando la incorporación de otros métodos que posibiliten mayores porcentajes de detección^(1,27,29).

Tabla 3. Asociaciones fenotípicas de cepas de *N. meningitidis*, según la dinámica del estado de portador

Fenotipos	Portador Persistente		Portador Intermitente		Portador Ocasional	
	No	%	No	%	No.	%
NA:NT:P1.NST:L3,7,9	9	28.1	3	20	2	40
NA:NT:P1.13:L3,7,9	6	18.7	3	20	1	20
B:4:P1.15:L3,7,9	3	9.4	1	6.6	0	0
NA:NT:P1.12:L3,7,9	2	6.25	0	0	1	20
NA:15:P1.6:L3,7,9	2	6.25	2	13.3	0	0
B:NT:P1.15:L3,7,9	0	0	1	6.6	0	0
W135:NT:P1.NST:L3,7,9	0	0	2	13.3	0	0
NA:15:P1.6L:3,7,9	0	0	0	0	0	0
NA:NT:P1.7L:3,7,9	1	3.1	1	6.6	0	0
NA:NT:P1.15:L:3,7,9	2	6.25	1	6.6	0	0
B:NT:P1.4:L3,7,9	1	3.1	0	0	0	0
NA:15:P1.NST:L3,7,9	0	0	1	6.6	0	0
NA:NT:P1.4:L3,7,9	1	3.1	0	0	0	0
NA:14:P1.7:L3,7,9	1	3.1	0	0	0	0
NA:NT:P1.NST:L10	0	0	0	0	0	0
NA:NT:P1.NST:NIT	1	3.1	0	0	1	20
B:NT:P1.14:L3,7,9	1	3.1	0	0	0	0
NA:14:P1.NST:L3,7,9	1	3.1	0	0	0	0
B:NT:P1.13:L 3,7,9	1	3.1	0	0	0	0
NA:NT: P1.5:L3,7,9	0	0	0	0	0	0
Total	32	100	15	100	5	100

Leyenda: NA = No agruable; NT = No tipable; NST = No subtipable y NIT = No inmunotipable

La caracterización fenotípica sobre la base de los marcadores epidemiológicos de *N. meningitidis* resulta fundamental para investigar cepas de enfermos y portadores^(1,2). Este trabajo mostró un franco predominio de cepas NA, diferente al observado en cepas de portadores aisladas en Cuba durante la etapa epidémica^(6,30,31).

La heterogeneidad y variabilidad entre las cepas aisladas corresponden con lo descrito por otros investigadores^(1,5,14). Por haber realizado este trabajo, en la etapa posterior a la aplicación masiva de VA-MENGOC-BC y en una etapa de baja endemividad, el fenotipo B:4:P1.15:L3,7,9 se constató en un número reducido de estudiantes; cepas B:4:P1.15:L3,7,9 y pertenecientes al complejo clonal ET-5, resultaron el principal agente etiológico de la epidemia ocurrida en Cuba durante la década del 80^(8,18,31,32).

La efectividad de VA-MENGOC-BC, junto a la alta cobertura nacional alcanzada y su aplicación sistemá-

tica a lactantes desde 1991, como parte del PNI, logró el control exitoso de la EM en Cuba^(6,7). Desde hace varios años la incidencia es muy baja y sólo se notifican casos aislados⁽⁸⁾. El predominio de cepas NA sugiere que el efecto ejercido por VA-MENGOC-BC pudo contribuir a la pérdida de los atributos de virulencia en las cepas circulantes, ejerciendo un efecto favorable en el control de la EM^(7,18,30). En este trabajo, sólo un reducido número de cepas correspondió al fenotipo epidémico (B:4:P1.15:L3,7,9).

No se detectó al serogrupo C, ni tampoco lo señalan otros estudios realizados en Cuba durante este período endémico. Su ausencia debe estar vinculada con la aplicación de VA-MENGOC-BC; su administración pudo contribuir a eliminar la circulación del serogrupo C, en enfermos y portadores^(18,19,30,31). Esto no se consiguió después de la inmunización con la vacuna A +C de polisacáridos.

Estudios de portadores realizados en otros países identifican a las cepas NA entre las más frecuentes. La mayoría se comportan probablemente como comensales del tracto respiratorio superior y no expresan polisacárido capsular (PC)⁽¹⁶⁾. Debido a que la invasión en un huésped inmunocompetente depende de la expresión del PC, particularmente de los serogrupos: A, B o C, las cepas que no expresan PC (o expresan otros) poseen limitado potencial patogénico. Esto probablemente reporta un beneficio, propiciando un efecto de refuerzo al sistema inmune a través de la expresión de otras estructuras inmunológicas de superficie⁽⁵⁾. Además, el alto grado de diversidad genética de las poblaciones de *N. meningitidis* se atribuye a su capacidad para expresar nuevos genotipos a través del proceso de recombinación genética^(4,5,16,33). En investigaciones realizadas en Cuba, el predominio de cepas NA resultó mayor en los trabajos de portadores realizados en la etapa posterior a la inmunización masiva con la vacuna antimeningocócica cubana^(18,19,30,31).

El serogrupo W135 se identificó en un número reducido de alumnos. Sin embargo, actualmente, se notifica como agente etiológico frecuente de EM en

Tabla 4. Factores de riesgo y su relación con la condición del estado de portador de *N. meningitidis*, según los métodos estadísticos aplicados

Factor de Riesgo	Portador		No Portador		Total	χ^2	RL
	Nº	%	Nº	%		p	p
Fumador	17	36.16	30	63.83	47	0.58	0.3262
No fumador	35	30.17	81	69.85	116		
Fumador pasivo	27	30.68	61	69.3	88	0.85	0.7136
No fumador pasivo	25	33.3	50	66.6	75		
Hacinamiento	32	36	57	64	89	0.29	0.2778
No-hacinamiento	20	27	54	73	74		
Presencia de IRAR	40	36	71	64	111	0.14	0.1799
Ausencia de IRAR	12	23	40	77	52		
Consumo bebidas alcohólicas	6	30	14	70	20	0.95	0.941
No consumo bebidas alcohólicas	46	32.2	97	67.8	143		
Amigdalectomía	5	38.5	8	61.5	13	0.82	0.542
No amigdalectomía	47	31.3	103	68.7	150		

Leyenda χ^2 = Chi cuadrado; RL = Regresión logística; IRAR = Infección respiratoria aguda reciente

varios países, vinculado fundamentalmente con la peregrinación de los musulmanes a la Meca. Debido al mayor intercambio y convenios de colaboración existentes entre las diversas regiones del mundo, se recomienda estar atento a su circulación, con vistas a tomar las medidas pertinentes y controlar la aparición de brotes y epidemias⁽³⁴⁾.

Se identificaron también los serotipos 4, 15 y 14, aunque con cifras muy inferiores a las cepas NT. Sin embargo, la asociación del serotipo 4 con el serogrupo B ha sido muy frecuente en Cuba entre cepas invasivas aisladas en la etapa epidémica y post-epidémica^(6,31,32). En España y Francia, el serotipo 4 se asocia frecuentemente a cepas del serogrupo B^(35,36). A diferencia de la poca variabilidad detectada entre los serogrupos y serotipos de las cepas identificadas en este trabajo, los subtipos mostraron una gran diversidad, similar a la descrita en otros trabajos realizados en Cuba⁽³¹⁾ y otros países⁽³⁶⁾.

El número de cepas no inmunotipables (NIT) fue bajo. Algunos autores coinciden en señalar a los inmunotipos L8, L3,7,9 y L1, entre los más frecuentes⁽³⁷⁾. Otros estudios llevados a cabo en Cuba señalan al inmunotipo L3,7,9 como uno de los habituales tanto en enfermos como en portadores^(18,19,30,31).

Tomando en cuenta el análisis de las variables que influyen sobre el estado de portador, se conoce que, entre los fumadores activos y pasivos, se incrementa de forma significativa la colonización nasofaríngea por *N. meningitidis*. El hábito de fumar disminuye los niveles de IgA en la saliva, afecta la flora bucal,

e interfiere con la acción ciliar de las células de la mucosa respiratoria, reduciendo así las defensas locales frente a los gérmenes patógenos^(5,17,36,38). Los estudiantes incluidos en este trabajo no clasificaron como fumadores moderados, ni severos, grupos donde se describen las mayores posibilidades de colonización por *N. meningitidis*^(36,38).

Aunque, en nuestro estudio no se evidenció, el hacinamiento se asocia con un aumento de portadores y la ocurrencia de brotes de EM, sobre todo en aquellos individuos que conviven en unidades militares, escuelas con régimen de internado, prisiones y comunidades cerradas o semicerradas^(1,2). El hacinamiento que frecuentemente existe en las unidades militares aumenta la posibilidad del contacto con las secreciones salivales de los portadores sanos, y por tanto, la posibilidad de colonización por *N. meningitidis* resulta mayor^(1,5,36,38).

No existió relación entre la IRAR y el estado de portador, aunque algunos trabajos muestran resultados significativos cuando asocian la prevalencia de portadores con el antecedente de haber padecido una infección respiratoria aguda de etiología viral^(5,39).

Todas aquellas circunstancias que depriman al sistema inmune, tales como la malnutrición y el alcoholismo, entre otras, aumentan la susceptibilidad del huésped a la invasión por *N. meningitidis*, y a su vez, limitan la duración y extensión de la respuesta inmunológica frente a los determinantes antigénicos del microorganismo^(1,2,5,36). El no existir diferencias significativas entre portadores y el consumo de bebidas

alcohólicas pudo deberse a que la mayoría de los estudiantes investigados pertenecieron al grupo de no consumidores de alcohol.

Tampoco fue significativo el antecedente de amigdalectomía y el estado de portador. Algunos investigadores han observado que en individuos con extirpación quirúrgica de las amígdalas aumentó la colonización por *N. meningitidis* en los primeros tres meses posteriores a esta medida terapéutica. Comportamiento quizás relacionado con una disminución transitoria de la IgA, después de una amigdalectomía^(5,40).

Si bien actualmente se conocen muchos aspectos de los portadores asintomáticos de *N. meningitidis*, existen aún interrogantes. El desarrollo de técnicas moleculares y la realización de estudios que paralelamente analicen las cepas de enfermos y portadores, así como su virulencia, constituirán en el futuro herramientas básicas para comprender mejor la epidemiología de la EM y poner en marcha medidas útiles para su control⁽²⁾. La incorporación de los nuevos métodos moleculares aportará mayor información sobre la genética y relación biológica existente entre las poblaciones de *N. meningitidis*.

Referencias

1. Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. J Med Microbiol 2004;53:821-32.
2. Arreaza L, Vázquez J. Portadores de meningococo: un enigma a finales del siglo XX. Enfer Infect Microbiol Clin 2000;18:352-355.
3. 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.
4. 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;42:5146-53.
5. Cartwright KAV. Meningococcal carriage and disease. In: Meningococcal Disease, Edited by Cartwright K. Chichester, UK: Wiley & Sons, Ltd; 1995; p. 115- 46.
6. Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. 1st ed. Ciencia Médicas, Ciudad Habana, Cuba; 1991.
7. Sierra GV, Campa HC, Valcarcel NM, Garcia 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.
8. Perez Rodriguez A, Dickinson F, Baly A, Martínez R. The epidemiological impact of antimeningococcal vaccination in Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94:433-40.
9. World Medical Association, Declaration of Helsinki: Recommendation Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects. Adopted by the 18th World Medical Assembly, Helsinki, Finland, June 1964. Amended by the 29th World Medical Assembly, Tokyo, Japan, October 1975; the 35th World Medical Assembly, Venice, Italy, October 1983; the 41th World Medical Assembly, Hong Kong, September 1989, the 48th General Assembly, Somerset West, republic of South Africa, October 1996 and the 52th General Assembly, Edinburgh, Scotland, October 2000.
10. Knapp JS, Koumans EH. *Neisseria* and *Branhamella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH. ed. Manual of Clinical Microbiology. 7th ed. ASM Press, Washington D.C, 1999; p. 586-603.
11. Abdillahi H, Poolman JT. Typing of group-B *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies in the whole-cell ELISA. J Med Microbiol 1981;26:177-80.
12. Caugant DC, Høiby EA, Rosenqvist E, Frøholm LO y Selander RK. Transmission of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis. Epidemiol Infect 1992;109:241-253.
13. Djupesland P, Bjune G, Aanosen NO, Borchgrevink HM, Mundal R, Høiby EA. Systemic meningococcal disease in the Norwegian Army. Nord Med 1990;105:179-81.
14. Tyski S, Grzybowska W, Dulny G, Berthelsen L, and Lind I. Phenotypical and genotypical characterization of *Neisseria meningitidis* carriers strains isolated from Polish recruits in 1998. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001;20:350-353.
15. Blackwell CC, Weir DM, James VS, Todd WT, Banatvala N, Chaudhuri AK et al. Secretor status, smoking and carriage of *Neisseria meningitidis*. Epidemiol Infect 1990;104:203-09.
16. Caugant DA, Høiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. J Clin Microbiol 1994;32:323-30.
17. Kremastinou J, Tzanakaki G, Levidiotou S, Markou F, Themeli E, Voyiatzi A et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in northern Greece. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;24:39:23-9.
18. Alvarez GN, Martinez MI, Sotolongo PF, Gutierrez VM, Zamora ML, Izquierdo L et al. *Neisseria meningitidis* carriers in a day-care center in the city of Havana. In: Abstracts of the 13th International Pathogenic Neisseria Conference. September 1-6. Oslo, Norway, 2002:329.
19. 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.
20. Neal KR, Nguyen Van Tam JS, Jeffrey N, Slack RC, Madeley RJ, Ait-Tahar K, et al. Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross-sectional study. BMJ 2000;320:846-9.
21. De Wals P, Gilquin C, de Maeyer S, Bouckaert A, Noel A, Lechal MF et al Longitudinal study of asymptomatic meningococcal carriage in two Belgian populations of school-children. J Infect 1983;6:147-56.
22. Greenfield S, Sheehe PR, Feldman HA. Meningococcal

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 CO₂. 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 CO₂ 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 χ^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

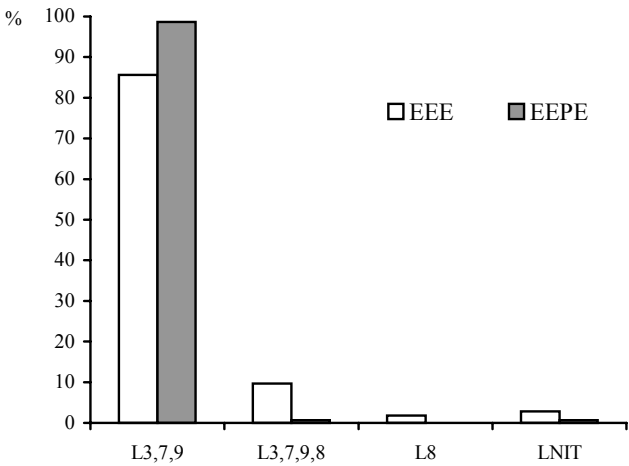


Figura 1. Cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según inmunotipos

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

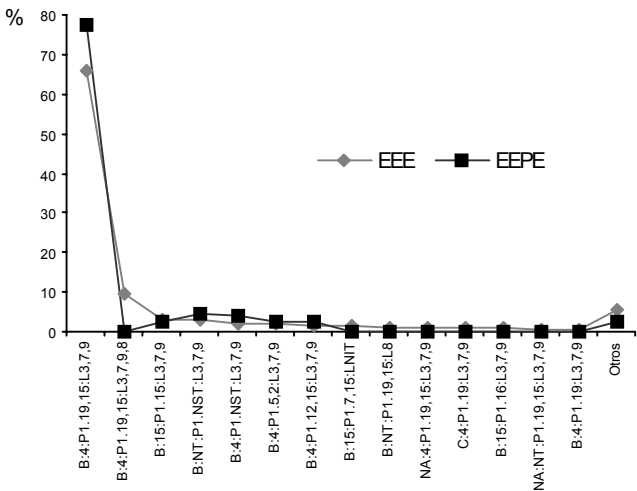


Figura 2. Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica y postepidémica, según fenotipos

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 Oregon, 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 CO₂. 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-enzymatic 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

INSTITUTO FINLAY

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

Dra. Isabel Martínez Motas,¹ Dr. Gustavo Sierra González,² Lic. Niury Núñez Gutiérrez,³ Lic. Luis Izquierdo Pérez,⁴ Lic. Yanet Climent Ruíz,⁵ y Lic. Mayelin Mirabal Sosa⁶

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.¹ 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.² 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.^{1,2} 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,

¹ Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Investigadora Titular.

² Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Inmunología. Académico Titular.

³ Máster en Ciencias Bacteriología-Micología. Licenciada en Bioquímica.

⁴ Licenciado en Matemática. Investigador Agregado.

⁵ Licenciada en Biología. Aspirante a Investigadora.

⁶ Licenciada en Matemática.

cuando se requiere de una mejor comprensión e interpretación de la epidemiología de este microorganismo.³

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*.⁴ 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).^{4,5} 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).^{4,5} La caracterización serológica incluye: serogrupos, serotipos, subtipos e inmunotipos y se basa en esquemas elaborados a partir de las diferencias estructurales y antigénicas de los componentes superficiales de *N. meningitidis*.^{6,7} 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 inmunotipos.⁷ 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.^{6,7} 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.⁸

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.^{5,9} 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.⁵ 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.^{5,9,10} En 2004, la incidencia de EM fue de 0,3/100 000 habitantes.¹¹

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;¹² 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 CO₂; 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).¹² Mientras que, para la caracterización de serotipos, subtipos e inmunotipos, se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales (AcM).¹³ 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 AcM P1.19 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.¹¹ 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).¹¹ 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 inferiores (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

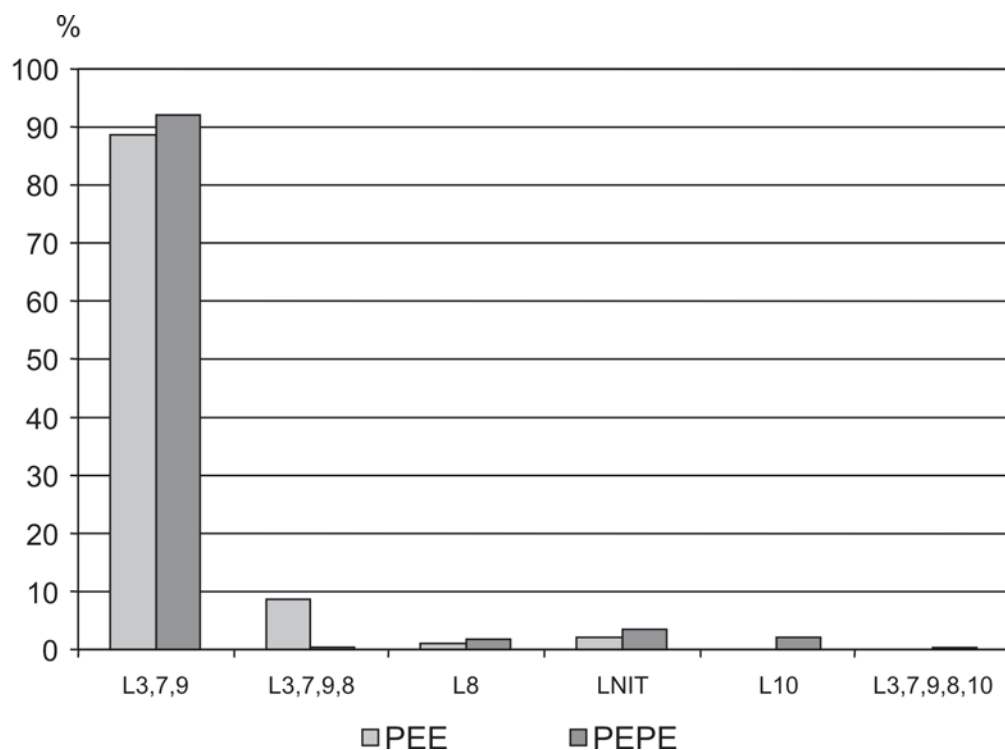
* $p < 0,05$ entre cepas de EEPE y PEPE

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).

128



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

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

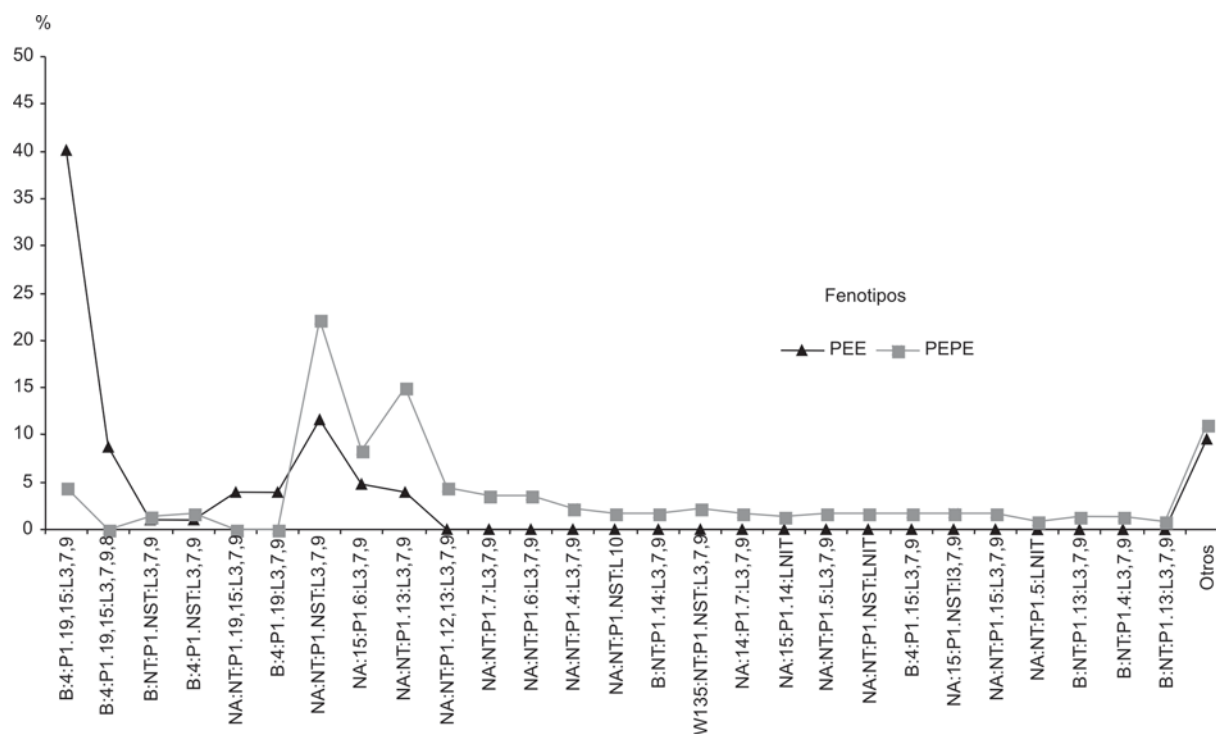


Fig. 2. Fenotipos detectados en cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica y posepidémica. Cuba, 1982-2002

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.² 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.¹⁴ 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).¹¹ 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.^{14,15}

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.¹ 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.⁸ 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.^{1,2}

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.⁹ 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 %).⁹ 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).⁵ VA-MENGOC-BC® constituye un ejemplo de vacuna elaborada a partir de PME.^{5,10}

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,^{14,16} estudios de portadores realizados en Francia (61 %) y España (58 %), mostraron su superioridad.^{17,18} 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.¹⁹ Al concluir los años ochenta, Chile, Argentina, Colombia y EE.UU., registraron su ascenso.²⁰⁻²²

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 13th International Pathogenic *Neisseria* Conference. September 1-6. Oslo, Norway, 2002:329).²³ Sin embargo, a diferencia

de la situación de Cuba, a partir de la década de los noventa otros países notifican su ascenso,^{8,24} y en algunos, las altas tasas de incidencia de EM causada por *N. meningitidis* C condujeron a programas de inmunización contra este serogrupo.²⁵⁻²⁷ 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.²⁸ 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.²⁹ En ese período, un estudio de portadores en Gran Canaria mostró predominio del serogrupo B³⁰ 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.²⁵

Otros trabajos refieren el descenso de portadores del serogrupo C después de realizar campañas de inmunización contra este serogrupo.²⁸ Actualmente, la disponibilidad de vacunas conjugadas muestran un mayor impacto sobre el estado de portador.^{28,31} 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.^{26,31} 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 antiseros 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.³² 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.^{1,3} 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.³³

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.^{2,8,34} En la década de los noventa, el serogrupo Y resultó uno de los agentes etiológicos principales de EM en EE. UU.;² 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.⁸ 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-135.³⁴ 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,^{5,9,10} produjo también brotes en Europa y América Latina.^{18,19,22}

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.³⁵⁻³⁷ 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.³⁷ 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.³⁸

En PEPE aumentó el serotipo 15. Su asociación con el serogrupo B se ha notificado en cepas epidemiológicas de España (B:15:P1.15),¹⁸ Noruega (B:15:P1.7,16)¹⁴ y Chile (B:15:P1.3).²⁰ 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;¹⁴ 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.³⁹

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,¹⁷ y a partir de 1995, integra el fenotipo B:14:P1.13, asociado principalmente con casos invasivos ocurridos en el nordeste de Italia.⁴⁰

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 L8.⁴¹

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.^{5,38,42} 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.⁵ Estudios recientes han demostrado que los esquemas de 3 dosis logran una mayor eficacia serológica, incluso frente a cepas heterólogas.^{43,44} 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, Wedge 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. 1ra. 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, Froholm 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. Serosubtypes 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 serosubtypes 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;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@infomed.sld.cu

Respuesta de anticuerpos inducidos por la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC® frente a la cepa de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15 en adolescentes después de 12 años de inmunizados

María A. Camaraza¹, Isabel Martínez¹, Rolando Ochoa¹, Aida Arnet¹, Franklin Sotolongo¹, Dairis Hernández¹, Iván Cuevas¹, Antonio E. Pérez²

¹Instituto 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: camaraza@finlay.edu.cu

²Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Novia del Mediodía. Km. 6½. La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba

Se estudió la respuesta de anticuerpos inducida por la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC® contra la cepa de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15 mediante el Ensayo Bactericida del Suero (EBS) y ELISA de tipo indirecto, para medir anticuerpos contra vesículas de membrana externa (VME) de *N. meningitidis* B a 184 adolescentes de un politécnico de Ciego de Ávila que fueron inmunizados en campañas masivas 12 años antes. Se realizaron extracciones de sangre antes de aplicar la primera dosis (T₀), 4 semanas después de ésta (T₁) y 4 semanas después de la segunda dosis (T₂). Transcurridos 12 años de esta vacunación el 42% de los adolescentes presentó títulos bactericidas $\geq 1:4$ frente a la cepa homóloga (B:4:P1.19,15) y el 98% mostró anticuerpos detectables contra las VME. En el EBS; el porcentaje de seroconversión T₁/T₀ fue del 57% y T₂/T₀ del 60%. Mediante ELISA la seroconversión fue del 59% y 54%, respectivamente, por lo que se demostró que la aplicación de una sola dosis después de 12 años indujo una respuesta inmune importante que puede sugerir una respuesta anamnésica.

Palabras clave: *Neisseria meningitidis*, enfermedad meningocócica, ensayo bactericida del suero, ELISA, memoria inmunológica, vacunas

Introducción

Neisseria meningitidis, microorganismo gramnegativo capaz de causar meningitis y septicemia, a veces con shock séptico, constituye el agente etiológico de la enfermedad meningocócica (EM), entidad que se reconoce aún como una importante causa de morbimortalidad elevada en diferentes regiones del mundo (1, 2, 3). Entre los serogrupos de *N. meningitidis* reconocidos el A, B y C son los responsables del mayor número de casos de EM notificados en el mundo. Sin embargo, en los últimos años se ha asistido a un aumento creciente de los serogrupos Y y W135, en determinadas zonas geográficas (2, 4).

La quimioprofilaxis e inmunoprofilaxis son las dos estrategias principales empleadas para evitar los casos clínicos de EM, constituyendo la última de ellas el medio por excelencia para lograr este propósito (5). Debido a la carencia de una vacuna eficaz contra *N. meningitidis* B en el mundo y constituir la EM el principal problema de salud en Cuba durante la década del 80, entre los años 1982-1988, se desarrolló en nuestro país una vacuna antimeningocócica contra los serogrupos de *N. meningitidis* B y C (VA-MENGOC-BC®) (6). En 1989 se registró y comenzó su aplicación en Cuba en forma de campaña; en 1991 se incorporó al Programa Nacional de Inmunización (PNI) y a partir de ese momento se aplica a toda la población infantil al cumplir los tres meses de edad (primera dosis) y a los 5 meses (segunda dosis) (7).

Se han realizado varios estudios para evaluar la respuesta inmune en personas vacunadas con VA-MENGOC-BC® (8, 9, 10, 11, 12) a través de las técnicas convencionales establecidas para dicho propósito (13). Sin embargo, existen pocas investigaciones que reflejan la respuesta anamnésica a esta vacuna (14). El Ensayo

Bactericida del Suero (EBS) está considerado como la "prueba de oro" para realizar los estudios de eficacia de las vacunas antimeningocócicas (15, 16), teniendo en cuenta que la presencia de anticuerpos bactericidas en el suero está relacionada con la aparición de la EM (17).

Para estudiar la respuesta inmune a VA-MENGOC-BC® para esta investigación se seleccionó a un grupo de adolescentes pertenecientes a un politécnico de oficios de la provincia de Ciego de Ávila, una de las de mayor incidencia durante la epidemia de la EM en Cuba. Los alumnos que participaron en este estudio fueron inmunizados 12 años antes.

Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta inmune que incluyó la memoria inmunológica, inducida por VA-MENGOC-BC® en estos adolescentes, luego de aplicarles dos dosis de la vacuna cubana, transcurridos 12 años de haber recibido la primovacuna.

Materiales y Métodos

Diseño del trabajo

Se realizó un estudio no controlado, prospectivo, abierto para la evaluación de la inmunogenicidad de VA-MENGOC-BC®.

Características de la población estudiada

De un universo total de 523 adolescentes que estudiaban en un politécnico de oficios de la provincia de Ciego de Ávila, se seleccionó al azar la tercera parte de los alumnos de cada grupo. Para esta selección se tomó en cuenta que estos pertenecieran a los

mismos dormitorios y como los grupos no tenían un tamaño homogéneo, la muestra seleccionada fue de 184 estudiantes sanos, con edades comprendidas entre 15-18 años, inmunizados con VA-MENGOC-BC® 12 años antes de realizar este estudio. Previo a su ejecución, se tuvieron en cuenta las exigencias bioéticas regulatorias nacionales e internacionales.

Esquema de vacunación

Se aplicó la vacuna antimeningocócica cubana (VA-MENGOC-BC®), siguiendo el esquema de inmunización establecido para este producto: dos dosis de 0,5 mL por vía intramuscular, con un intervalo de ocho semanas entre ambas dosis (6,7).

Secuencia de la toma de muestras de sangre

Mediante el uso de jeringuillas estériles desechables de 10 mL, se realizaron tres extracciones de sangre por vía intravenosa: antes de aplicar la primera dosis (T_0), 4 semanas después de ésta (T_1) y 4 semanas después de la segunda dosis (T_2). Todas las muestras de sangre se centrifugaron para la obtención del suero y éste se conservó en el Instituto Finlay a -20°C hasta la realización del EBS y el ELISA.

Cepa de *N. meningitidis* utilizada en el EBS

Se empleó la cepa homóloga de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 (CU385/83), perteneciente a la colección de cultivos del Instituto Finlay.

Determinación de la respuesta inmune

EBS: Se aplicó el procedimiento descrito por Sotolongo y colaboradores (13), siguiendo la metodología del Centro para el Control de Enfermedades (CDC), Atlanta, Estados Unidos (18).

Determinación de anticuerpos contra vesículas de membrana externa de *N. meningitidis* B (VME B)

Se realizó mediante un ELISA de tipo indirecto, según el método desarrollado por Ferriol y colaboradores (19). Los resultados se expresaron en unidades de IgG por mililitro (U/mL), usando como referencia sueros estándares de anticuerpos IgG contra la VME B. Las muestras con valores de concentración por debajo del límite de detección (700 U/mL) se reportaron como la mitad de este valor (350 U/mL).

Análisis estadístico

Se calculó la media geométrica (MG) y los intervalos de confianza al 95% (IC 95%), después de la transformación logarítmica de los valores de anticuerpos obtenidos en los tiempos estudiados. Se empleó el análisis de varianza para comparar la MG entre los grupos y la prueba exacta de Fisher para evaluar la diferencia entre los porcentajes de seroconversión. La seroconversión se definió como el aumento del título inicial en 4 o más diluciones ($\geq 1:4$) de la respuesta inducida por la vacunación con respecto a la basal existente antes de inmunizar. La significación estadística para la comprobación o no de la hipótesis fue una $p < 0,05$.

Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de la actividad bactericida del suero medida por EBS, contra la cepa homóloga de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 y la concentración de anticuerpos medidos por ELISA, frente a las VME. Doce años después de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, el 42% de los adolescentes presentó títulos de anticuerpos bactericidas $\geq 1:4$ frente a la cepa homóloga y el 98% mostró una concentración de anticuerpos detectables contra las VME.

Tabla 1. Actividad bactericida en el suero y concentración de anticuerpos contra *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 en adolescentes vacunados con VA-MENGOC-BC® 12 años antes. Ciego de Ávila, 2000

Ensayo	No	MG	IC	$\geq \text{NC}$	%
EBS	184	4	3-5	78	42
ELISA	183	3158	2778-3590	179	98

Leyenda: MG = Media Geométrica; IC = Intervalo de Confianza al 95%; NC = Nivel de Corte. Para EBS títulos ≥ 4 . Para ELISA ≥ 700 U/mL

La Tabla 2 presenta los porcentajes de seroconversión mediante el EBS y ELISA, frente a la cepa B:4:P1.19,15. Por EBS, posterior a la primera dosis, el porcentaje de seroconversión fue del 57% y después de la segunda dosis de un 60%. Al evaluar los resultados de la muestra por ELISA la seroconversión correspondió a un 59% y 54% después de la primera y segunda dosis, respectivamente. Por ambos métodos no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los porcentajes de seroconversión obtenidos después de las dos dosis. Se demostró que la aplicación de una sola dosis de refuerzo después de 12 años indujo una respuesta inmune importante en este grupo de edad y puso en evidencia una respuesta anamnésica. En esta Tabla el número de muestras investigadas fue menor, pues en el momento de realizar los EBS y ELISA hubo sueros correspondientes a T_1 y T_2 que no pudieron ser evaluados.

Tabla 2. Seroconversión frente a *N. meningitidis* B:4:P1.19,15 inducida por dos dosis de VA-MENGOC-BC® en adolescentes. Ciego de Ávila, 2000

Ensayo	No	Relación			
		$T_1/T_0 (\geq 4)$		$T_2/T_0 (\geq 4)$	
		No.	%	No.	%
EBS	116	67*	57	71*	60
ELISA	114	67*	59	62*	54

Leyenda: T_1/T_0 : Incremento en cuatro o más del título en el T_1 . Con respecto a T_0 ; T_2/T_0 : Incremento en cuatro o más del título en el T_2 Con respecto a T_0

* $p > 0,05$

La Tabla 3 refleja la MG y los IC al 95% de la actividad bactericida sérica frente a la cepa B:4: P1.19,15 y de la concentración de anticuerpos contra las VME. Por ambos métodos no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores T_1 y T_2 . Sin embargo, se observó diferencias ($p < 0,05$) entre estos dos tiempos

con respecto a T₀, resultante de la inmunización con VA-MENGOC-BC®.

Tabla 3. Media geométrica e intervalos de confianza de la actividad bactericida contra la cepa B y del ELISA contra las VME, inducida por dos dosis de VA-MENGOC-BC® en adolescentes. Ciego de Ávila, 2000

Tiempo	EBS B:4:P1.19,15			ELISA VME		
	No	MG	IC	No.	MG	IC
T ₀	116	4	3 - 5	114	2824	2394 - 3331
T ₁	116	15	11 - 21	114	16064	13741 - 18780
T ₂	116	15	11 - 20	114	14387	12353 - 16755

Leyenda: MG = Media Geométrica; IC = Intervalo de Confianza al 95% para EBS

Discusión

El haber encontrado un número elevado de adolescentes con actividad bactericida en el suero y una concentración de anticuerpos aceptable contra la cepa de *N. meningitidis* B:4:P1.19,15, 12 años después de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, pudiera atribuirse a que esta vacuna indujo una respuesta inmune de larga duración. Sin descartar que la inmunidad pudo reforzarse por el contacto con algunas bacterias que tienen alguna o ninguna relación taxonómica con *N. meningitidis*, pero por poseer en su estructura antigénica epitopes semejantes, pudieran inducir anticuerpos con reactividad cruzada contra este microorganismo (20).

El posible establecimiento de la memoria inmunológica por efecto de la vacunación con VA-MENGOC-BC® pudiera considerarse un elemento de protección, si tenemos en cuenta que los anticuerpos bactericidas estimulados en la respuesta inmune secundaria forman parte de los mecanismos de defensa contra la septicemia y meningocelitis causadas por *N. meningitidis* (21).

La reinmunización con una dosis de VA-MENGOC-BC® indujo una respuesta de anticuerpos significativa frente a la cepa vacunal, la cual no se modificó apreciablemente con la aplicación de la segunda dosis y pudiera sugerir una respuesta anamnésica. Costa y colaboradores (14) realizaron entre 1994 y 1995 un estudio de la respuesta anamnésica a VA-MENGOC-BC® en el Estado de Río de Janeiro, Brasil. En su investigación incluyeron niños de tres grupos de edades, vacunados cuatro años antes con esta vacuna. Mediante el EBS, después de la primera y segunda dosis, los porcentajes de seroconversión frente a la cepa B:4:P1.19,15 fueron del 59% y 65%, en los niños de 5-7 años respectivamente, del 64% y 75% en los de 8-10 años y del 63% y 86% en los de 11-13 años de edad. Mientras que por ELISA, los porcentajes de seroconversión obtenidos frente a esta cepa fueron: después de la primera y segunda dosis 82% y 95% en los niños de 5-7 años, 80% y 95% en los de 8-10 años y 68% y 81% en los de 11-13 años, respectivamente.

En 1994 Fernández y colaboradores (22) evaluaron la cinética de la respuesta de anticuerpos bactericidas frente a la cepa homóloga B:4:P1.19,15 y de la IgG específica contra la VME, en 220 adultos jóvenes pertenecientes a una escuela militar vacunados con VA-

MENGOC-BC®. El incremento en la actividad bactericida sérica y de la IgG anti VME se observó después de aplicar la segunda dosis. Los resultados obtenidos por Fernández y colaboradores son lógicos, pues en esa investigación, la primera dosis aplicada constituyó una primovacunación.

Respecto a otros estudios, el menor porcentaje de seroconversión alcanzado por ELISA en nuestra investigación (14, 23), pudiera deberse a los altos títulos iniciales, lo que incide en un menor incremento relativo de la respuesta.

Los niveles basales de anticuerpos funcionales detectados 12 años después de la vacunación con VA-MENGOC-BC® y la respuesta observada con la revacunación, indicio de memoria inmunológica, son característicos de los inmunógenos timodependientes, lo que avala positivamente esta vacuna.

Referencias

1. Janda WM, Knapp JS. *Neisseria* and *Moraxella catharralis*. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 2003. Washington: ASM Press;2003:585-608.
2. Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2006;24:7-19.
3. Trotter C, Samuelsson S, Perrocheau A, de Greeff S, de Melker H, Heuberger S et al. Ascertainment of meningococcal disease in Europe. *Euro Surveill* 2005;10:247-50.
4. Vázquez JA. Situación actual de la epidemiología de la enfermedad meningocócica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24:14-18.
5. Girard MP, Preziosi MP, Aguado MT, Kieny MP. A review of vaccine research and development: meningococcal disease. *Vaccine* 2006;24:4692-700.
6. Sierra GV, Campa HC, Valcarcel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: Protection trial and mass vaccination in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195-10.
7. Pérez A, Dickinson F. Resultados del Programa Nacional de inmunización antimeningocócica BC en menores de 1 año en Cuba. *Rev Cub Pediatr* 1998;70:133-40.
8. Malberty JA, Sotolongo PF, Izquierdo L, Blanco R, Martínez OM, Galguera MA et al. Humoral immune response against C polysaccharide of *Neisseria meningitidis* elicited by VA-MENGOC-BC®. Preliminary results comparing children and adults from South American village. In: Conde Glez CJ, Morse SP, Rice, F, Sparling, Calderon E. *Pathobiology and Immunology of Neisseriaceae*. International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México; 1994:860-61.
9. Requeira M, Palmeiro S, Gutiérrez M, Malberty A, Sotolongo F, García AM. Estudio de cepas de *Neisseria meningitidis* circulantes en la

Portadores de *Neisseria meningitidis* y *Neisseria lactamica* en tres grupos de edades diferentes

Niury Núñez¹, Isabel Martínez¹, Luis Izquierdo¹, Niurka Álvarez², Omar López³.

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202. La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana. Cuba.

Correo electrónico: nnunez@finlay.edu.cu

² Centro Municipal Higiene, Epidemiología y Microbiología, Jagüey Grande, Matanzas.

³ Hospital General Docente "Comandante Pinares", San Cristóbal, Pinar del Río. Cuba.

Se determinó la prevalencia de *N. meningitidis* y *N. lactamica*, así como su relación con las variables edad y sexo en individuos de tres grupos de riesgo diferentes (círculo infantil, escuela primaria y escuela universitaria), a los que se les realizó exudado de la nasofaringe posterior. Se identificaron los marcadores epidemiológicos de las cepas de *N. meningitidis* aisladas y se analizó la presencia de otros microorganismos de la familia *Neisseriaceae*. La identificación de las cepas obtenidas se realizó por el sistema APINH (*bioMérieux*), el seroagrupamiento de *N. meningitidis* se determinó por aglutinación en lámina portaobjetos con antiseros específicos y los sero/subtipos e inmunotipos se identificaron por un ensayo inmunoenzimático de células enteras con anticuerpos monoclonales. El 10,9% de los sujetos investigados fue portador de *N. meningitidis*, cifra que aumentó con la edad. La prevalencia de portadores tuvo el siguiente comportamiento: Grupo 1: niños de 0-6 años (4,3%); Grupo 2: niños de 5-12 años (6,9%) y Grupo 3: adultos jóvenes de 17-22 años (25,1%). No hubo diferencias significativas respecto al sexo ($p > 0,05$). En el Grupo 1 predominó el fenotipo NA:NT:P1.6:L3,7,9 (71,5%), mientras que, en los Grupos 2 y 3, prevaleció la asociación NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (36,4 y 25%, respectivamente). El predominio de cepas no epidemiológicas avala el impacto de la inmunización en Cuba con VA-MENGOC-BC®. El aislamiento de cepas de *N. lactamica* disminuyó a medida que aumentó la edad: Grupo 1 (47,5%), Grupo 2 (29,8%) y Grupo 3 (3%).

Palabras clave: Portadores, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, prevalencia.

Introducción

Neisseria meningitidis, patógeno exclusivo del hombre, continúa siendo uno de los agentes etiológicos más frecuentes de sepsis y meningitis en los niños de diversas partes del mundo. Se calcula que la enfermedad meningocócica (EM) ocasiona alrededor de 500 000 enfermos con 50 000 fallecidos al año (1). Entre las personas más afectadas se encuentran los niños y adultos jóvenes, grupo donde la EM ocasiona una morbilidad elevada (2, 3).

Su hábitat natural es la nasofaringe humana, donde permanece sin producir síntomas ni signos clínicos evidentes de enfermedad, dando lugar al estado de portador asintomático, condición que constituye una fuente potencial de infección y puede estar presente entre el 5-40% de los individuos sanos (4). El estado de portador de *N. meningitidis* es poco frecuente en los primeros años de vida, aumenta progresivamente en las dos primeras décadas y alcanza su pico máximo a finales de la adolescencia y principios de la adultez, para luego declinar lentamente (4, 5, 6).

Aunque el porcentaje de portadores de *N. meningitidis* en la comunidad no se asocia con la emergencia de brotes o epidemias, el conocimiento de los marcadores

epidemiológicos de las cepas circulantes en las poblaciones de riesgo, permite mantener la alerta ante la posible emergencia de fenotipos virulentos, que sí pudieran correlacionarse con un aumento de la prevalencia de la EM (7).

Por otra parte, los portadores de *N. lactamica* son más frecuentes en los primeros años de vida (0 a 4 años de edad) y su presencia en la nasofaringe humana se asocia con el desarrollo de una inmunidad protectora contra la EM (8). Se plantea que existe reactividad cruzada entre las dos especies y que la colonización por *N. lactamica* se asocia con la formación de anticuerpos bactericidas protectores. Actualmente se investiga este potencial para el desarrollo y obtención de vacunas (9). Opuesto al comportamiento de la colonización por *N. meningitidis*, *N. lactamica* disminuye al aumentar la edad (10).

En este estudio se comparó la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *N. lactamica* en tres grupos de riesgo de Ciudad de La Habana con edades diferentes. Además, se relacionaron los resultados obtenidos con las variables edad y sexo, así como se identificaron los marcadores epidemiológicos de las cepas de *N. meningitidis* y se analizó también la presencia de otros microorganismos pertenecientes a la familia *Neisseriaceae*.

Métodos

1. Descripción de la población investigada

Población total: 641 sujetos de la provincia de Ciudad de La Habana, Cuba, integrada por tres grupos:

Grupo 1: 160 niños (0-6 años de edad), que asistían a un círculo infantil.

Grupo 2: 318 niños (5-12 años de edad), pertenecientes a una escuela primaria.

Grupo 3: 163 estudiantes adultos (17-22 años de edad) de una escuela universitaria.

2. Toma de muestra: A todos los individuos que participaron en el estudio se les realizó un exudado de la nasofaringe posterior mediante un hisopo de algodón estéril, con la ayuda de un depresor lingual para visualizar la orofaringe. La muestra se tomó durante las mañanas en los meses de mayo-junio del año 1998 (en el Grupo 3), en el 2001 (Grupo 1) y en el 2002 (Grupo 2). Luego se sembró directamente en un medio de cultivo selectivo para *Neisseria* (Agar Müller Hilton).

3. Aislamiento de los microorganismos de interés: Se realizó la inoculación directa del hisopado en el medio de Müller Hilton. Las placas Petri, ya inoculadas, se trasladaron al Laboratorio de Microbiología del Instituto Finlay en un lapso de tiempo menor a una hora. Posteriormente, a partir del inóculo inicial se realizó una resiembra por agotamiento en un medio de cultivo enriquecido y se incubaron a 37 °C durante 24-48 h, en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las cepas aisladas se conservaron a -70 °C en leche descremada al 10%, hasta su posterior clasificación.

4. Identificación de las cepas aisladas: Una vez comprobadas las características morfológicas y tintoriales mediante la tinción de Gram, se procedió a confirmar y caracterizar a todos los microorganismos que resultaron diplococos arriñonados gramnegativos (11).

La identificación de las cepas: *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea* y *M. catarrhalis* se realizó mediante el sistema API NH (*bioMérieux*).

5.-Clasificación de los marcadores epidemiológicos de las cepas de *N. meningitidis* aisladas

Serogrupo: Se determinó mediante la técnica de aglutinación en láminas portaobjeto con antiseros específicos de los serogrupos A, B, C, Y y W135 (11) (donados por Saint Mary's Hospital, Imperial Collage, UK).

Serotipo, subtipo e inmunotipo: Se utilizó el ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales específicos, según la metodología propuesta (12); se empleó para ello un panel comercial (RIVM, Holanda y NIBSC, UK) compuesto por seis

anticuerpos monoclonales de serotipos, trece de subtipos y tres de inmunotipos.

6. Análisis y procesamiento estadístico de los resultados:

- Sistema de procesamiento estadístico "R" licencia GNU (dominio público) (13).
- Test exacto de Fisher para detectar asociación entre las variables prevalencia del estado de portadores, edad y sexo.
- Intervalo de confianza para proporciones según el método aproximado de Wilson.
- Se tomó como nivel estadísticamente significativo $\alpha = 0,05$.

Resultados y Discusión

Prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *N. lactamica*

En los niños que asisten a círculos infantiles convergen factores que favorecen la colonización de la nasofaringe por bacterias potencialmente patógenas, entre ellos: mantener un contacto estrecho durante varias horas del día, presentar con frecuencia infecciones respiratorias altas, uso indiscriminado de antimicrobianos, antecedente de padecer procesos alérgicos, entre otros. Sin embargo, la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* es baja y así lo señalan otros autores (8, 9). El elevado porcentaje de portadores de *N. lactamica* (47,5%) que se detectó en este estudio pudo influir en este resultado. Se conoce que existe reactividad cruzada entre ambas especies y se sugiere que *N. lactamica* ejerce un efecto protector debido a su capacidad para estimular la formación de anticuerpos bactericidas contra *N. meningitidis* (9, 10).

En los niños menores de cinco años es donde se señala la menor prevalencia de portadores de *N. meningitidis*, sin embargo este grupo presenta la mayor incidencia de EM (4, 5). En Cuba, la población infantil está protegida contra esta enfermedad, ya que desde 1991 la vacuna antimeningocócica contra *N. meningitidis* de los serogrupos B y C (VA-MENGOC-BC®), se incorpora al Programa Nacional de Inmunización, aplicándose la 1ra dosis a todos los niños a los tres meses de nacidos y la 2da dosis a los cinco meses (14). Su aplicación sistemática y mantenida pudiera también contribuir al bajo porcentaje de portadores de *N. meningitidis* detectado en este grupo.

Al analizar los niños de la escuela primaria, se detectó un porcentaje de portadores de *N. meningitidis* ligeramente superior (6,9%) al del primer grupo. En Cuba se realizó una Encuesta Nacional de Portadores para determinar la prevalencia de *N. meningitidis*, cinco años después de aplicar la vacuna antimeningocócica A-C, estudio que abarcó el 20% de los alumnos de primaria y secundaria básica (ambas con régimen de internado) de cada una de las provincias del país, excepto Ciudad de La Habana, que incluyó una muestra

representativa de su población. Las tasas de portadores oscilaron desde 3,3% en la provincia de Granma, cifra inferior a la de escolares del Grupo 2, hasta el 23,3% en Cienfuegos, con un promedio de 12,1% (14). Sin embargo, en países como Grecia y España señalan valores similares a los detectados en nuestro estudio (15, 16). El aislamiento de *N. lactamica* se correspondió con un 30% de prevalencia en este grupo, continuaron los valores elevados en comparación con el tercer grupo (17-22 años), pero se observa una disminución con relación al primero.

Al analizar el porcentaje de portadores de *N. meningitidis* entre los estudiantes universitarios (Grupo 3), se observó una prevalencia del 25,1%, este valor se encuentra dentro del rango descrito por Blackwell y colaboradores (24-37%) en grupos con edades similares (17). Las características de esta población contribuyen al elevado número de portadores de *N. meningitidis*. Generalmente, es en los adolescentes y adultos jóvenes donde se describen los mayores porcentajes de portadores, por ser estudiantes militares, están sometidos a diferentes actividades como: movilizaciones, acampadas, convivencia en régimen de internado; todas estas características propician una mayor interacción social que favorece la transmisión de microorganismos potencialmente patógenos, en particular *N. meningitidis* (18). En adolescentes, el consumo de bebidas alcohólicas y el hábito de fumar son factores predisponentes para la colonización por este microorganismo (19). Sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con *N. lactamica*, el porcentaje de portadores fue más bajo (3%). En este trabajo se puso de manifiesto el comportamiento habitual de *N. lactamica*, tasas de colonización nasofaríngea elevadas en los niños pequeños y su disminución paulatina al aumentar la edad.

El comportamiento descrito anteriormente para la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *N. lactamica*

en los tres grupos de riesgo analizados se observa en la Figura 1.

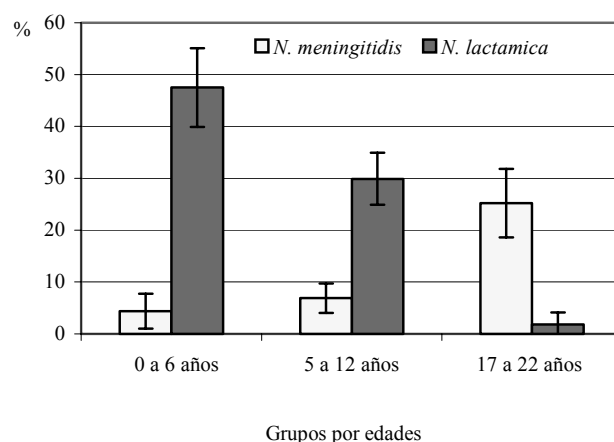


Figura 1. Prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *N. lactamica* en los tres grupos de riesgo, según la edad.

Relación de la prevalencia de portadores de ambos microorganismos y el sexo

En las Figuras 2 y 3 se muestra la relación existente entre el sexo y la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *N. lactamica*, respectivamente. En ninguno de los dos microorganismos esta relación fue significativa ($p < 0,05$), sin embargo, el riesgo relativo mostró una tendencia al predominio de portadores de *N. meningitidis* en el sexo masculino, situación que pudo estar favorecida por un mayor número de portadores de *N. meningitidis* en el Grupo 3, población que se correspondió con una escuela militar y donde existió un mayor número de varones. Otros autores señalan también la prevalencia de portadores asintomáticos en este género (20, 21).

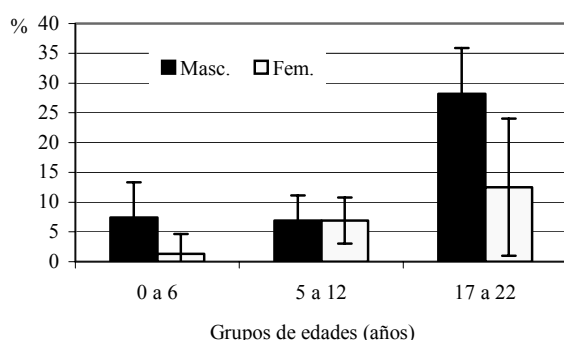


Figura 2. Relación entre la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y el sexo, según la edad.

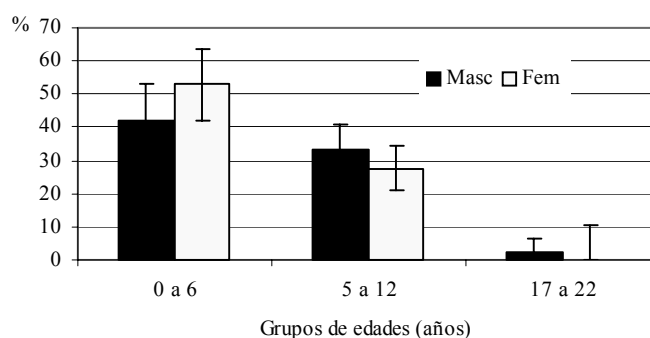


Figura 3. Relación entre la prevalencia de portadores de *N. lactamica* y el sexo, según la edad.

Marcadores epidemiológicos de los aislamientos de *N. meningitidis*

La Tabla 1 muestra los marcadores epidemiológicos de serogrupos, sero/subtipos e inmunotipos identificados en las cepas de *N. meningitidis* aisladas por grupo. Se observa que a medida que la edad aumenta, la variedad en estos

marcadores fue mayor. En la Figura 4 se presentan las diferentes asociaciones fenotípicas detectadas en las cepas de *N. meningitidis* a partir de la combinación de estos marcadores: **serogrupo: serotipo: subtipo: inmunotipo**, Coincidiendo con Taha y colaboradores, se obtuvo una gran heterogeneidad en el fenotipo de estas cepas (22).

Tabla 1. Marcadores epidemiológicos identificados en las cepas de *N. meningitidis* aisladas por grupo de edad.

Grupos (años)	Serogrupo	%	Serotipo	%	Subtipo	%	Inmunotipo	%
Grupo 1 (0-6)	NA	100	NT	100	P1.6	71,4	L3.7.9	100
	NA	90,9	NT	63,6	P1.NST	50	L3.7.9	95,4
Grupo 2 (5-12)	Y	9,1	15	18,2	P1.6	18,2	NIT	4,6
			4	9,1	P1.7	9,1		
			14	9,1	P1.2	4,5		
					P1.10	4,5		
					P1.12	4,5		
					P1.13	4,5		
					P1.19	4,5		
Grupo 3 (17-22)	NA	80,5	NT	80,5	P1.NST	39	L3.7.9	92,7
	B	17,1	4	7,3	P1.13	19,5	NIT	7,3
	W135	2,4	15	7,3	P1,15	12,2		
			14	4,9	P1.6	7,3		
					P1.12	7,3		
					P1.4	4,9		
					P1.7	4,9		
					P1.14	2,4		
					P1.5	2,4		

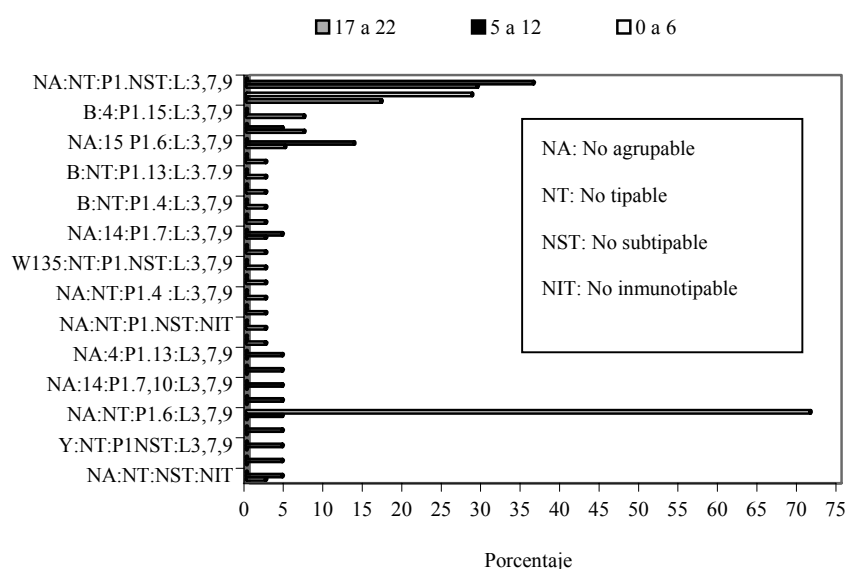


Figura 4. Asociaciones fenotípicas de las cepas de *N. meningitidis* aisladas por grupo.

Las asociaciones fenotípicas que predominaron por grupo de edad fueron:

En el Grupo 1:

NA:NT:P1.6:L3,7,9 (71,5%).

En los Grupos 2 y 3:

NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (36,4 y 25%, respectivamente).

No se identificó al serogrupo C y la asociación B:4:P1.19,15:L3,7,9 sólo se observó en el Grupo 3.

La prevalencia de fenotipos no epidemiológicos y la ausencia del serogrupo C son aspectos a favor del impacto ejercido por la inmunización sistemática con VA-MENGOC-BC® en Cuba.

Presencia de otras especies de la familia *Neisseriaceae* por grupo de edad

M. catarrhalis y *N. polysaccharea* se describen como comensales inocuos del tracto respiratorio superior del hombre. *M. catarrhalis* se detecta como miembro de la flora normal en el 40-50% de los escolares sanos y constituye el tercer agente etiológico de otitis media en los niños pequeños. Sin embargo, entre los adultos puede provocar complicaciones broncopulmonares, aunque se asocia también con otras manifestaciones clínicas (1).

Hasta la fecha, las cepas de *N. polysaccharea* detectadas en la nasofaringe no están asociadas con ninguna entidad clínica (23). Al igual que *N. meningitidis*, otras especies del género *Neisseria* como: *N. lactamica*, *N. polysaccharea* y *N. gonorrhoeae* crecen en medios de cultivo con inhibidores, vancomicina, nistatina y colistina, antimicrobianos que se añaden al medio con el objetivo de inhibir el crecimiento de la flora bacteriana presente en algunos sitios anatómicos y es por eso que se requiere de una correcta diferenciación entre esas especies (1).

Los porcentajes de los aislamientos de *N. polysaccharea* y *M. catarrhalis* en los tres grupos investigados fueron bajos. Esto pudiera estar dado por la presencia de *N. lactamica* y *N. meningitidis* de forma alternada en los individuos analizados (Figura 5). Estos resultados coinciden con los reportes de otros autores (1). Debemos señalar que en ningún caso coincidieron los microorganismos aislados: *N. meningitidis*, *N. lactamica*, *N. polysaccharea* y *M. catarrhalis* en un mismo individuo.

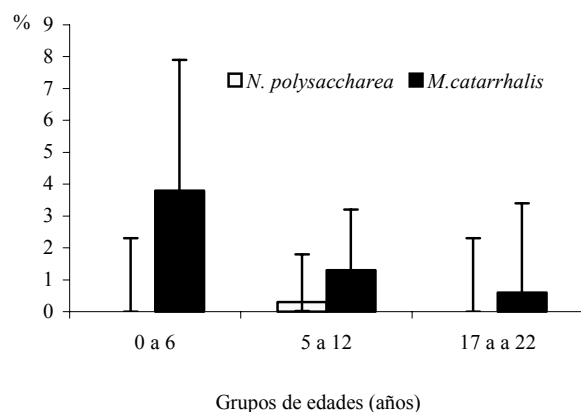


Figura 5: Presencia de *M. catarrhalis* y *N. polysaccharea* por grupos de edad.

Conclusiones

- La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* fue baja en el Grupo 1, aumentó ligeramente en el Grupo 2 y

alcanzó su máxima expresión en el Grupo 3, comportamiento opuesto al de *N. lactamica*.

- No se obtuvieron diferencias significativas entre la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *N. lactamica* con relación al sexo. Sin embargo se observó una tendencia al predominio del sexo masculino entre los portadores de *N. meningitidis*.
- La variabilidad fenotípica aumentó progresivamente con la edad. En el Grupo 1 predominó el fenotipo NA:NT:P1.6:L3,7,9, mientras que en los Grupos 2 y 3 el NA:NT:P1.NST:L3,7,9.
- El fenotipo B:4:P1.19,15:L3.7,9, causante de la epidemia ocurrida en Cuba en la década del 80, sólo se aisló en el tercer grupo.
- Los aislamientos de *N. polysaccharea* y *M. catarrhalis*, mostraron porcentajes inferiores con relación a otras *Neisserias*.

Referencias

- Martínez I. *Neisseria* y *Moraxella catarrhalis*. En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo JL, editores. Microbiología y Parasitología Médica. Tomo I. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2001:217-38.
- Hodgson A, Smith T, Gagneux S, Adjuk M, Pluschke G, Kumasenu N, et al. Risk factor for meningococcal meningitis in northern Ghana. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 2001; 95:477-80.
- WHO. Control of epidemic meningococcal disease. Practical guidelines, 2nd ed. Geneva, WHO/ EMC/ BAC/98.3. 1998.
- Cartwright K. Meningococcal disease. Meningococcal carriage and disease. England: John Wiley & Sons, Ltd.; 1995:115-26.
- Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. J Clin Microbiol 1994; 32: 323-30.
- McLennan JM, Andrews N. Risk factors for carriage of *Neisseria meningitidis* in British teenagers, IPNC 2003. 13th International Pathogenic *Neisseria* Conference. September 1-6, 2002. Oslo, Norway: 369.
- Arreaza L y Vázquez J. Portadores de meningococo: un enigma a finales del siglo XX. Enfer Infecc Microbiol Clin 2000; 18:352-355.
- Kremastinov J, Tzanakaki G, Velonakis E, Voyiatzi A, Nickolaou A, Elton RA, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic Greek school children from Russian immigrant families in Athens. FEMS Immunol Med. Microbiol 1999; 23(1):13-20.
- Gold R, Goldschneider I, Lepow ML, Draper TF and Randolph M. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. J Infect Dis 1978; 137:112-21.

10. Olsen S, Djurhuus K, Rasmussen H, Joensen HD, Larsen SO, Zoffman H et al. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants within areas with high and low incidences of meningococcal disease. *Epidemiol Infect* 1991; 106:445-57.
11. Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*: Aspectos teóricos-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Serie monográfica. Ciudad de La Habana: Ediciones Finlay; 1995:2-14.
12. Abdillahi H and Poolman JT. Whole cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Letters* 1987; 48:367-71.
13. R Development Core Team (2006). "R": A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical computing, <http://www.R-project.org>.
14. Valcárcel M, Rodríguez R y Terry H. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. 1era. Ed. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas de Cuba (ECIMED); 1991:319-97.
15. Ramos Aceitero JM. Surveys on the rates of healthy carriers of *Neisseria meningitidis* and characterization of circulating strains. *Rev Esp Salud Pública*. 2000; 74(4): 413-7.
16. Pavlopoulou I, Alexandrou H, Daikos G, Petridou E, Pangalis A, Theodoridou M et al. Carriage of *N. meningitidis* in school children: Risk factors and strain characteristics. Meeting European Society for Pediatrics Infectious Diseases (ESPID). 2002:1.
17. Blackwell CC, Tzanakaki G, Kremastinou J, Weir DM, Wakalis N, Elton RA, et al. Factors affecting carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek military recruits. *Epidemiol Infect* 1992; 108: 441-8.
18. Nelson JD. Jails, microbes and the three-foot barrier. *New Engl J Med* 1996; 335:885-6.
19. Cookson ST, Corrales R, Lotero JO, Regueira M, Binsztein N, Reeves MW, et al. Disco fever epidemic meningococcal disease in north-eastern Argentina associated with disco patronage. *J Infect Dis* 1998; 178: 266-9.
20. Caugant DC, Hoiby EA, Rosenqvist E, Froholm LO y Selander RK. Transmisión of *Neisseria meningitidis* among asymptomatic military recruits and antibody analysis *Epidemiol Infect*. 1992; 109: 241-253.
21. García RA, Bardes BA, Lafarga CB, Vázquez JM, López VE, García CP, et al. Encuesta de portadores de *Neisseria meningitidis* en el área de salud de Gran Canaria. *Rev Esp Salud Pública* 1998;72(5):459-61.
22. Taha MK, Degh AE, Antignac A, Zarantonelli ML, Larribe M and Alonso JM. The duality of virulence and transmissibility in *Neisseria meningitidis*. 2002;10(8):376-81.
23. Riou JY, Guibourdenche M and Popoff MY. A new taxon in the genus *Neisseria*. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)* 1983; 134B:257-67.
24. Sáez-Nieto JA, Vázquez J, Casal J. Reactividad cruzada de *Neisseria lactamica* con sueros antimeningocócicos. *Inmunologica*. 1980; 6:65-9.

Carriers of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in three different age groups

Abstract

Prevalence of *N. meningitidis* and *N. lactamica*, as well as their relationship to age and sex variables in individuals of three different risk groups (day care centers, primary school and universities) was determined by performing an exudate of upper naso-pharynx. Epidemiological markers of the isolated *N. meningitidis* strains were identified and the presence of other microorganisms of Neisseriaceae family was identified. Identification of the strains obtained was carried out by API NH (*bioMérieux*) system; sero-grouping of *N. meningitidis* was determined by agglutination in slides with specific antisera and sero/subtypes and immunotypes were identified by an immuno-enzymatic assay of whole cells with monoclonal antibodies. The 10.9% of investigated subjects was carrier of *N. meningitidis*, which increased with age. Prevalence of carriers had the following behavior: Group 1: children from 0-6 years old (4.3%); Group 2: children from 5-12 years old (6.9%) and Group 3: young adults from 17-22 years old (25.1%). No significant differences were observed with respect to sex ($p > 0.05$). In Group 1, phenotype NA:NT:P1.6:L3.7.9 (71.5%) predominated while in Groups 2 and 3, the association NA:NT:P1.NST:L3.7.9 (36.4 and 25%, respectively) prevailed. Predominance of non-epidemiogenic strains support the impact of immunization in Cuba with VA-MENGOC-BC®. Isolation of strains of *N. lactamica* decreased with the increase of age: Group 1 (47.5%), Group 2 (29.8%) and Group 3 (3%).

Keywords: Carriers, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria lactamica*, prevalence.

Recibido: Marzo de 2007

Aceptado: Julio de 2007

Evaluación de anticuerpos contra enfermedades prevenibles por vacunas en el binomio madre–recién nacido en hospitales de Ciudad de La Habana

Rolando Felipe Ochoa¹, Josué Acosta², Xenia Rosa Ferriol¹, Mónica Ginebra¹.

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave 27 No. 19805, e/ 198 y 202.

La Lisa, Ciudad de La Habana. Cuba.

Correo electrónico: ochoa@finlay.edu.cu

² Centro Nacional de Genética Médica. Playa, Ciudad de La Habana.

El sistema inmune es inmaduro en los recién nacidos, lo que los hace susceptibles a las enfermedades infecciosas, sin embargo, pueden ser parcialmente protegidos por los anticuerpos adquiridos a través de la placenta. Por ello, nos propusimos evaluar la transferencia transplacentaria de anticuerpos contra algunas enfermedades prevenibles por vacunas. Se realizó un ensayo prospectivo, aleatorio, en el binomio madre–recién nacido. Para ello se analizó un total de 96 pares de muestras de suero, tomadas en el salón de parto y al nacimiento en hospitales de Ciudad de La Habana, durante el año 2004. Se emplearon técnicas inmunoenzimáticas para determinar los niveles de antitoxina tetánica (ATT), antitoxina diftérica (ATD) y anticuerpos contra proteínas de membrana externa del meningococo B (PME), contra el polisacárido capsular del meningococo C (PSC) y contra el polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi. Se detectó un nivel apropiado de ATT, tanto en las madres como en los recién nacidos, predominando los valores correspondientes a la protección de larga duración (>1 UI/mL), con 88,54% y 92,71%, respectivamente. Se observó niveles de ATD inferiores a 0,1 UI/mL, límite para una protección confiable, en el 54,17% y 45,83% de las madres y los recién nacidos. El 90,63% de las madres y el 96,88% de los recién nacidos presentaron concentraciones de anticuerpos contra PME superiores a 2 µg/mL, así como el 38,54% y el 41,67% para anticuerpos contra PSC. La seroprotección contra la *Salmonella* Typhi (>1 µg/mL) fue de 5,21% y 8,33%, respectivamente. La mayoría de los recién nacidos presentaron títulos superiores de anticuerpos al de sus madres, lo cual demuestra que la transferencia transplacentaria de anticuerpos es un mecanismo eficiente.

Palabras clave: Anticuerpos transplacentarios, vacuna, antitoxina tetánica, antitoxina diftérica, meningococo, *Salmonella* Typhi.

Introducción

El sistema inmune es inmaduro en los recién nacidos, pero pueden ser parcialmente protegidos por los anticuerpos adquiridos a través de la placenta, de ahí que la inmunización a la embarazada constituya una estrategia fundamental para la protección de los neonatos (1).

Sin embargo, muchos lactantes en los países en desarrollo todavía mueren de tétanos porque sus madres no poseen adecuados niveles de antitoxina tetánica durante el embarazo (2).

La difteria, enfermedad también inmunoprevenible, ha resurgido en los últimos años, afectando principalmente a los adultos que han perdido la inmunidad inducida por vacunas recibidas en la infancia y a los niños no vacunados, tal y como ha sucedido en los estados que surgieron de la antigua Unión Soviética y los países de la Europa Oriental (3).

Por otra parte, los serogrupos B y C de *Neisseria meningitidis* son responsables de la mayor parte de los casos de la enfermedad meningocócica en Latinoamérica (4) y la fiebre tifoidea es aún un serio problema de salud en los países en desarrollo (5).

La estrategia cubana para el control de estas enfermedades, se apoya en gran medida en el diseño de eficientes programas de inmunización.

A inicios de la década de 1960 comienzan las campañas masivas de vacunación con la vacuna trivalente contra la difteria, tos ferina y tétanos (DPT), la bivalente contra la difteria y el tétanos (DT) y el toxoide tetánico. En 1972 se erradica el tétanos neonatal, como consecuencia de la política inmunitaria con las embarazadas. El último caso de difteria se registra en 1979, y en los años 2004 y 2005 no se detectaron casos de tétanos (6).

Con relación a la enfermedad meningocócica, se habían descrito históricamente tan sólo casos esporádicos y pequeños brotes, hasta que en 1976 comienza una importante epidemia de magnitud sin precedentes, a predominio del serogrupo C. Una vacunación masiva con una vacuna de polisacárido A/C redujo sustancialmente los casos debidos a ese serogrupo, pero no pudo revertir esta situación, pues la incidencia continuó en ascenso, ahora a expensas del serogrupo B. Ante la magnitud de la epidemia se crea en 1982 un grupo de investigación en el Instituto Finlay, que en tan sólo cinco años logra una vacuna contra los serogrupos B y C de *Neisseria meningitidis*: VA-MENGOC-BC®. En

1988 comienza a emplearse, y hasta 1990 se realiza una campaña masiva de inmunización que provocó la erradicación de la epidemia. En 1991 se incorpora al Programa Nacional de Inmunización (6).

La prevención de la fiebre tifoidea en grupos poblacionales con riesgo de la enfermedad requirió inicialmente del empleo de una vacuna de células enteras inactivadas. A partir del año 2002 se emplea una vacuna de polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi, producida también en dicha institución (6).

A pesar de estos logros, deben realizarse nuevos estudios inmunoepidemiológicos atendiendo a la situación existente en otros países y al intercambio actual con la comunidad internacional. Por todo ello, nos propusimos evaluar la transferencia transplacentaria de anticuerpos contra las enfermedades prevenibles por las vacunas seleccionadas y determinar la susceptibilidad de los recién nacidos a estas enfermedades.

Materiales y métodos

Diseño de la investigación

Se realizó un estudio prospectivo, aleatorio, en 96 madres y sus recién nacidos durante el año 2004. La aprobación ética del estudio fue emitida por el Comité correspondiente del Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana. Se brindó una adecuada información previa y se obtuvo el consentimiento por escrito de ambos padres (6, 7).

Se tomaron en el salón de parto las muestras de suero de la embarazada y las del recién nacido durante el proceso de corte del cordón umbilical. Las muestras de suero que se obtuvieron fueron identificadas y almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

Determinación de los niveles de anticuerpos séricos en las madres y los recién nacidos

Se utilizaron ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA), previamente estandarizados y validados, para la cuantificación de antitoxina tetánica, antitoxina diftérica y anticuerpos contra proteínas de membrana externa de

meningococo B (PME) y el polisacárido capsular del meningococo C (PSC), así como anticuerpos contra el polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi (8, 9). La validación, cuantificación e impresión se realizó mediante el paquete de programas ELISA de los Centros para el Control de las Enfermedades (CDC, Atlanta) (GA) (10).

Métodos estadísticos

El cálculo del tamaño de la muestra se basó en las siguientes premisas: Prevalencia cuantificable de anticuerpos del 85%, confiabilidad del 95%, y precisión del 10% (6). El reclutamiento fue adicionalmente aumentado.

Se calculó la media geométrica (MG) y el intervalo de confianza al 95% (IC) de cada distribución de anticuerpos después de la transformación logarítmica. Los resultados se clasificaron según el nivel de anticuerpos. Antitoxinas tetánica y diftérica: $< 0,1$ UI/mL niveles de antitoxina no adecuados para conferir protección, $\geq 0,1$ UI/mL niveles de antitoxina para una protección confiable, y $> 1,0$ UI/mL protección confiable de larga duración (2, 4, 8, 9). Anticuerpos contra PME y PSC: > 2 $\mu\text{g/mL}$ nivel de corte considerado protector (8, 9). Anticuerpos contra el polisacárido Vi: Se consideró 1 $\mu\text{g/mL}$ como el valor protector (5).

El índice de transferencia se definió como la relación entre los niveles de anticuerpos de los recién nacidos y sus madres. Se consideró como eficiente un índice > 1 .

Para los análisis estadísticos se empleó la prueba t de Student y la prueba exacta de Fisher. En todos los casos se consideró un error de primer tipo $\alpha=0,05$ (6).

Resultados

Se detectaron adecuados niveles de antitoxina tetánica. La mayor parte de las madres y los recién nacidos presentaron valores correspondientes a la protección de larga duración (Tabla 1).

Para la antitoxina diftérica se observaron niveles no adecuados ($<0,1$ UI/mL) en el 54,17% de las madres y el 45,83% de los recién nacidos (Tabla 2).

Tabla 1. Distribución de anticuerpos antitoxina tetánica.

UI/mL	Madres (96)		Recién Nacidos (96)	
	n	%	n	%
$<0,1$	0	0	0	0
$\geq 0,1$	96	100	96	100
>1	85	88,54	89	92,71
MG	3,260		4,688	
IC 95 %	2,705 – 3,928		3,873 – 5,674	

UI/mL: Unidades Internacionales por mililitro

MG: Media Geométrica

IC 95 %: Intervalo de Confianza al 95 %

Tabla 2. Distribución de anticuerpos antitoxina diftérica.

UI/mL	Madres (96)		Recién Nacidos (96)	
	n	%	n	%
<0,1	52	54,17	44	45,83
≥0,1	44	45,83	52	54,17
>1	0	0	1	1,04
MG	0,085		0,102	
IC 95 %	0,069 – 0,106		0,082 – 0,126	

UI/mL: Unidades Internacionales por mililitro

MG: Media Geométrica

IC 95 %: Intervalo de Confianza al 95 %

La mayor parte de los sujetos estudiados tenían anticuerpos protectores contra las PME ($> 2 \mu\text{g/mL}$). Se detectaron menores niveles de anticuerpos contra el PSC (Figura 1).

Se demostró insuficiente seroprotección contra la fiebre tifoidea, tanto en las madres como en los recién nacidos (Figura 2).

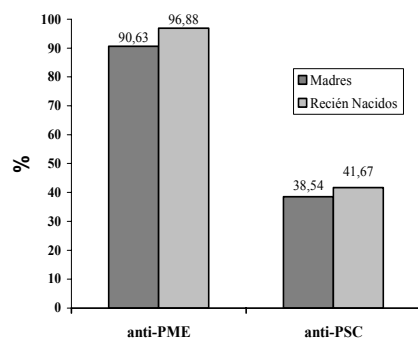


Figura 1. Porcentaje de sujetos con niveles de anticuerpos $> 2 \mu\text{g/mL}$ contra proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B y el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C.

La media geométrica de los anticuerpos estudiados fue siempre mayor en los recién nacidos ($p < 0,001$) (Tablas 1-4), sin embargo, no se detectaron diferencias ($p > 0,05$) cuando los resultados se evaluaron según los niveles de anticuerpos protectores definidos en cada caso (Tablas 1, 2), Figuras 1, 2).

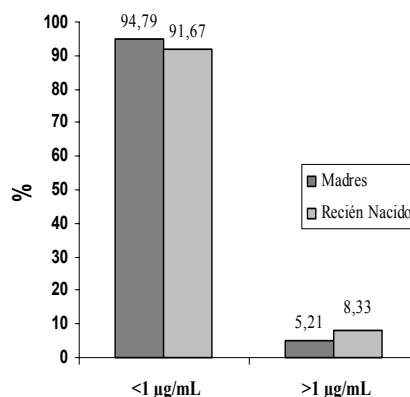


Figura 2. Tasas de seroprotección contra fiebre tifoidea.

Tabla 3. Anticuerpos IgG contra proteínas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B y el polisacárido capsular de *Neisseria meningitidis* serogrupo C.

µg/mL	Anti-PME		Anti-PSC	
	Madres (96)	R Nacidos (96)	Madres (96)	R Nacidos (96)
MG	4,497	5,916	1,591	2,025
IC 95 %	3,905-5,179	5,192-6,741	1,224-2,069	1,570-2,613

MG: Media Geométrica

IC 95 %: Intervalo de Confianza al 95 %

Tabla 4. Anticuerpos IgG contra el polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi.

µg/mL	Anti-Vi	
	Madres (96)	Recién Nacidos (96)
MG	0,349	0,422
IC 95 %	0,281-0,434	0,337-0,528

MG: Media Geométrica

IC 95 %: Intervalo de Confianza al 95%

Tabla 5. Binomio madre –recién nacido con índice de transferencia de anticuerpos eficiente.

	Antitoxina tetánica	Antitoxina diftérica	Anti-PME	Anti-PSC	Anti-Vi
Proporción	0,81	0,66	0,81	0,76	0,69
IC 95%	0,72-0,88	0,56-0,74	0,72-0,88	0,67-0,84	0,60-0,77

IC 95 %: Intervalo de Confianza al 95 %

La transferencia transplacentaria de anticuerpos fue eficiente, la mayor parte de los recién nacidos presentaron niveles superiores a los de sus madres ($p < 0,001$) (Tabla 5).

Discusión

La antitoxina tetánica transferida de la madre al feto protege al recién nacido contra el tétanos neonatal (1, 2, 8, 9). Esta enfermedad ha desaparecido en Cuba gracias al establecimiento de la vacunación de las gestantes, con el objetivo de garantizar elevados niveles de inmunidad en los recién nacidos, lo que se corrobora con nuestros resultados. Sin embargo, se detectaron niveles insuficientes de antitoxina diftérica, lo que podría incrementar el riesgo de infección (3, 8, 9). Consideramos que el nivel de inmunidad antidiftérica debe declinar en la adolescencia, teniendo en cuenta el Esquema Cubano de Inmunización que contempla el toxoide diftérico en las vacunas combinadas utilizadas durante los dos primeros años de vida y un único refuerzo con DT a los 6 años de edad. Los adultos no tienen tampoco la posibilidad de refuerzos a través de infecciones subclínicas al desaparecer esta enfermedad en nuestro país, por todo ello, la probabilidad de poseer anticuerpos debe disminuir progresivamente con la edad.

Una respuesta de larga duración inducida por la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® pudiera explicar los niveles de anticuerpos contra las PME y el PSC (11, 12), aunque no puede descartarse la inmunidad natural en portadores de *Neisseria meningitidis*. Sin embargo, el meningococo C no se ha aislado en Cuba en los últimos años (12, 13). La reactividad cruzada con el polisacárido capsular de la *Escherichia coli* K92 tampoco puede ser rechazada (9).

La fiebre tifoidea no es endémica en Cuba, y hasta el año 2000 se empleó en el programa de inmunización una vacuna de células completas, de elevada reactogenicidad e insuficiente inmunogenicidad. Una nueva vacuna de polisacárido Vi de *Salmonella* Typhi (vax-TyVi®) está introduciéndose paulatinamente en escolares cubanos a partir del año 2002 (14). Esta situación pudiera explicar la baja tasa de seroprotección en la población estudiada.

La placenta humana regula la transferencia de anticuerpos de forma selectiva. No hay un criterio unánime sobre el nivel de anticuerpos que se alcanza; algunos autores han reportado valores superiores en los recién nacidos, y otros iguales e incluso inferiores a los de sus madres (15, 16). En nuestra investigación, la mayor parte de los recién nacidos presentaron valores superiores, lo que habla a favor de una

excelente transferencia transplacentaria de anticuerpos contra las enfermedades prevenibles por las vacunas estudiadas, aunque en algunos casos no haya sido suficiente para conferir protección debido a los bajos niveles encontrados en sus progenitoras, por lo que, además del toxoide tetánico empleado en la inmunización de las gestantes, sugerimos añadir el toxoide diftérico, así como valorar otros inmunógenos vacunales.

Conclusiones

- La transferencia transplacentaria de anticuerpos es un mecanismo eficiente, su magnitud depende de los niveles de anticuerpos maternos.
- Algunos recién nacidos no están completamente protegidos contra las enfermedades prevenibles por las vacunas analizadas.

Referencias

1. Vicari M, Dodet B. Protection of newborns through maternal immunization. *Vaccine* 2003; 21:3351.
2. Vandelaer J, Birmingham M, Gasse F, Kurian M, Shaw C, Garnier S. Tetanus in developing countries: an update on the maternal and neonatal tetanus elimination initiative. *Vaccine* 2003; 21:3442-45.
3. Vitek CR, Diphtheria. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;304:71-94.
4. Stephens DS. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:3-14.
5. Cooke FJ, Wain J. The emergence of antibiotic resistance in typhoid fever. *Travel Med Infect Dis* 2004; 2:67-74.
6. Ochoa R. Inmunoepidemiología y Estrategias de Vacunación. Ciudad de La Habana: Finlay Ediciones; 2005.
7. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *Bull World Health Organ* 2001;79(4):373-74.
8. Ochoa R, Ferriol X, Torres JC, Ginebra M, Céspedes A, Izquierdo L, et al. Evaluación simultánea de la inmunidad contra enfermedades prevenibles por vacunas. *Saludarte* 2005; 4(2):114-28.
9. Ochoa R. *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos*. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Médicas. Ciudad de La Habana. Instituto Superior de Ciencias Médicas de La Habana; 2002.

10. Plikaytis BD, Carlone GM, Turner SH, Gheesling LL, Holder PF. Program ELISA [computer program] MS-DOS version. Centers for Disease Control. Atlanta (Ga); 1993.
11. Camaraza M, Martínez I, Ochoa R, Arnet A, Sotolongo F, Hernández D, et al. Respuesta de anticuerpos inducidos por la vacuna antimeningocócica cubana VA-MENGOC-BC frente a la cepa de *Neisseria meningitidis* B:4:P1.19,15 en adolescentes después de 12 años de inmunizados. *VacciMonitor* 2006;15(3):1-4.
12. Camaraza M, Ochoa R, Arnet A, Sotolongo F, Martínez I, Cuevas I, et al. Inmunogenicidad inducida por la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC® contra la cepa de *N meningitidis* ATCC C11 en adolescentes después de 12 años de vacunados. *Rev Cubana Med Trop* 2004;56(1):26-30.
13. Martínez I, Sierra G, Núñez N, Jaquiedo L, Climent Y, Mirabal M. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores en Cuba durante 20 años. *Rev Cubana Med Trop*. [en línea]. Mayo-Agosto 2006 [citado 28 Agosto 2007]; 58(2). URL disponible en: http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602006000200005&lng=es&nrm=iso. ISSN 0375-0760.
14. Ochoa Azze RF, Martínez JC, Ginebra M, Ferriol X, Rodríguez V, Sotolongo FT. Immunogenicity of a new *Salmonella* Typhi Vi polysaccharide vaccine –vax-TyVi®– in Cuban school children and teenagers. *Vaccine* 2003; 21:2758-60.
15. Durbaca S. Anti tetanus and anti diphtheria immunity in newborns. *Roum Arch Microbiol Immunol* 1999;58:267-72.
16. Malek A. Ex vivo human placenta models: transport of immunoglobulin G and its subclasses. *Vaccine* 2003; 21:3362-4.

Evaluation of antibodies against vaccine-preventable diseases in mother–newborn pair in Havana City hospitals

Abstract

At birth, the immune system is still immature, that is why newborns are susceptible to infectious diseases. Nonetheless, newborns are partially protected by maternal antibodies. For that reason, transplacental transference of antibodies against some vaccine-preventable diseases. A prospective, randomized study was carried out in 96 mothers and their newborns. Serum samples were taken from the pregnant women before delivery in Havana City hospitals during 2004 and from the newborns in the delivery room. Immunoenzimatic assays were used for the quantitative determination of tetanus and diphtheria antitoxin, antibodies to meningococcus B outer membrane proteins (OMP), antibodies to meningococcus C capsular polysaccharide (CSP), and antibodies to Vi polysaccharide of *Salmonella* Typhi. Suitable levels of tetanus antitoxin were found in mothers and newborns. The long-term protection levels (>1 IU/mL) were shown in 92.71% of newborns, and 88.54% of their mothers. Non-reliable levels of diphtheria antitoxin (<0.1 IU/mL) were found in 54.17% and 45.83% of mothers and newborns, respectively. Antibodies to OMP above 2 $\mu\text{g/mL}$ were detected in 90.63% and 96.88% of mothers and newborns, and the 38.54% and 41.67% had proper antibodies against CSP. Seroprotection rates (>1 $\mu\text{g/mL}$) against *Salmonella* Typhi were 5.21% and 8.33%, respectively. Most of newborns showed higher antibody levels than that of their mothers, therefore the transplacental passage of antibodies is an efficient mechanism.

Keywords: Transplacental antibodies, vaccine, tetanus antitoxin, diphtheria antitoxin, meningococcus, *Salmonella* Typhi.

Recibido: Junio de 2007 Aprobado: Agosto de 2007

Portadores de *Neisseria meningitidis*, caracterización de las cepas aisladas y respuesta inmune basal a VA-MENGOC-BC®

María J. Valdés¹, Isabel Martínez², Gustavo Sierra², María A. Camaraza², Iván Cuevas², Mayelin Mirabal², Pedro Rodríguez², Yadira Fuentes³, Graciela Bolaños², Isabel Villasusa¹.

¹ Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM). Carretera Panamericana Km 3 1/2 Santa Fé, Playa. Ciudad de La Habana, Cuba.

² Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave.27 No. 19805. La Lisa. Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Hospital Docente Clínico Quirúrgico "Joaquín Albarrán". Ciudad de La Habana, Cuba.

Correo electrónico: mjuliavh@elacm.sld.cu

Con el propósito de conocer la prevalencia de portadores de *Neisseria meningitidis* en un grupo de adolescentes, los marcadores epidemiológicos de las cepas aisladas, así como los factores de riesgo asociados con el estado de portador y la respuesta inmune basal a VA-MENGOC-BC®, se realizó un estudio transversal descriptivo de portadores en 189 estudiantes de 12-19 años de un politécnico de Ciego de Ávila, siguiendo las Normas Bioéticas establecidas. A los estudiantes se les realizó un exudado faríngeo y una extracción de sangre para la obtención de suero, así como una encuesta relacionada con aspectos de la investigación. La identificación de *N. meningitidis* se hizo por el sistema API NH (bioMérieux). Los serosubtipos e inmutipos se clasificaron por ELISA de células enteras con anticuerpos monoclonales y la respuesta inmune basal se detectó por el Ensayo Bactericida del Suero. Se determinó la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas frente a la penicilina, cloranfenicol, rifampicina, sulfadiazina sódica, ceftriaxona y ciprofloxacina. La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* fue del 17%. Predominaron las cepas no agrupables (84,7%), seguidas por los serogrupos B (12,5%) y Z (3,1%), destacándose la ausencia del C. Prevalció el fenotipo NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (12,5%), las cepas resistentes a la sulfadiazina (78,2%) y sensibles a penicilina (81,3%), aunque el 18,7% mostró sensibilidad intermedia a este fármaco. Al resto de los antimicrobianos todas fueron sensibles. Se constató una respuesta inmune de memoria a la vacuna antimeningocócica (VAMENGOC-BC®), 12 años después de su aplicación, con títulos bactericidas anti C y B de 25 y 42%, respectivamente, resultados que pudieran estar influenciados por la inmunización sistemática que se realiza en Cuba con esta vacuna desde 1991.

Palabras clave: *Neisseria meningitidis*, portadores, memoria inmunológica, ensayo bactericida del suero, susceptibilidad antimicrobiana.

Introducción

La enfermedad meningocócica (EM), entidad clínica ocasionada por *Neisseria meningitidis*, constituye un importante problema de salud en diversas regiones del mundo. Esta enfermedad, que afecta principalmente a los niños y adolescentes, muestra en algunos casos una evolución fulminante, elevada morbilidad, así como la capacidad de producir brotes o epidemias, propiedades que la mantienen como un tema de constante actualidad (1). Su agente etiológico, *N. meningitidis*, es un patógeno exclusivo del hombre que coloniza la nasofaringe y permanece en ella sin ocasionar, en la mayoría de los casos, síntomas ni signos clínicos evidentes de infección, estableciéndose así el denominado estado de portador (2). Por ser el hombre su único reservorio natural, la infección se transmite por el contacto directo, estrecho y prolongado con las secreciones respiratorias del sujeto infectado, lo que explica porqué en los colectivos cerrados existe una mayor probabilidad de contagio y un aumento significativo del índice de portadores (1, 2). Las investigaciones sobre la condición del portador de *N. meningitidis* y su prevalencia en diferentes grupos poblacionales contribuyen de manera significativa a una

mejor comprensión sobre la patogenia y la epidemiología de esta entidad clínica.

Cuba, país que padeció una epidemia severa de EM durante la década de los años 80, exhibe en estos momentos una tasa de incidencia muy baja (0,2/100 000 habitantes) (3), cifra inferior a la notificada en la etapa preepidémica y que experimentó una disminución evidente luego de la incorporación de VA-MENGOC-BC® al Programa Nacional de Inmunizaciones en 1991, razón que justifica la realización de estudios encaminados a conocer la prevalencia de portadores y las características de las cepas de *N. meningitidis* aisladas. Los resultados obtenidos con este tipo de estudio son de gran utilidad para la prevención y el control de la EM. Paralelamente, para un país que logró la obtención de una vacuna antimeningocócica, capaz de disminuir la incidencia de los casos invasivos a cifras muy bajas, sería de especial interés conocer el estado inmunológico de la población, trabajos que permitirán monitorear y evaluar el impacto de VA-MENGOC-BC® en la población inmunizada y sobre el estado de portador de *N. meningitidis*.

Materiales y Métodos

En el año 2000 se realizó un estudio transversal descriptivo de portadores de *N. meningitidis* en adolescentes, con edades comprendidas entre los 12 a 19 años, de un politécnico de oficios de la provincia de Ciego de Ávila. En su diseño se tuvieron en cuenta las exigencias bioéticas y regulatorias nacionales e internacionales establecidas para este tipo de estudio.

Universo de trabajo y muestra

Entre los 523 adolescentes se seleccionó al azar la tercera parte de los alumnos distribuidos en los 21 grupos existentes en ese centro docente, tomando en cuenta que los estudiantes compartían el mismo dormitorio, aunque por no tener los grupos un número homogéneo de alumnos la muestra seleccionada fue de 189 estudiantes. Los mismos llenaron una encuesta confeccionada previamente, donde se indagó sobre los factores de riesgo (edad, sexo, hábito de fumar, régimen de internado y antecedentes de infección respiratoria aguda reciente) que pudieran influir en la condición del estado de portador de *N. meningitidis*.

Toma de muestra del exudado nasofaríngeo

El exudado faríngeo se realizó en la escuela durante la mañana, empleando un depresor lingual estéril. La muestra se tomó con hisopo de algodón estéril y se inoculó directamente en placas de Petri con Agar Mueller Hinton (Merck), enriquecido con suero fetal bovino al 5% (Hyclon) y un complejo inhibidor compuesto por vancomicina, colistina y nistatina (VCN) (bioMérieux). Las placas inoculadas se trasladaron, en un tiempo menor a las 2 h, al Laboratorio de Microbiología, lugar donde se estiraron e incubaron (24-48 h) a 37 °C y atmósfera húmeda con 5-10% de CO₂.

Identificación y confirmación del crecimiento bacteriano

La identificación de las cepas de *N. meningitidis* se realizó mediante el sistema comercial API NH (bioMérieux) y para su seroagrupamiento se empleó la técnica de aglutinación en láminas con antiseros comerciales: A, B, C, X, Y, Z, W135 (Difco). Mientras que la determinación de los serotipos, subtipos e inmutipos se realizó por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con anticuerpos monoclonales (AcM), según el protocolo descrito por Abdillahi y Poolman (4), modificado en el Instituto Finlay (5). Para la determinación de los serotipos y subtipos se utilizó un panel comercial de AcM del Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente de Holanda (RIVM, por sus siglas en inglés), panel con seis AcM de serotipos y 13 de subtipos. Además, se empleó el AcM P1.19, donado por el Instituto Nacional para Control Biológico y Estándares del Reino Unido (NIBSC, por sus siglas en inglés), centro que también proporcionó los AcM para la identificación de los inmutipos: L3,7,9, L8 y L10.

Para las técnicas realizadas se emplearon cepas controles, todas pertenecientes al Departamento de Colecciones de Cultivo del Instituto Finlay.

Determinación de la susceptibilidad a los antimicrobianos

Para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana se siguieron las normas recomendadas por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) de los Estados Unidos (M100-S15) (6), empleándose el método de dilución en Agar Mueller-Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero. Se investigaron los siguientes antimicrobianos: penicilina, ceftriaxona, cloranfenicol, rifampicina, ciprofloxacina y sulfadiacina sódica. El inóculo final de todas las cepas fue de 10⁴-10⁵ UFC y sus rangos de dilución fueron: penicilina y rifampicina (0,004-2 µg/mL); ceftriaxona (0,002-1 µg/mL); ciprofloxacina (0,002-1 µg/mL); cloranfenicol (0,063-16 µg/mL) y sulfadiacina sódica (1, 5, 10, 25, 50 y 100 µg/mL); aunque para este último fármaco no se le añadió sangre al medio de Agar Mueller Hinton. La siembra se realizó con la ayuda de un multirreplicador (Steer), incluyéndose placas controles sin antimicrobianos. Los cultivos se incubaron durante 24 h a la temperatura de 37 °C y una atmósfera húmeda con 5-10% de CO₂. La lectura y comparación de los resultados se realizó de forma manual, interpretándose como CMI la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de *N. meningitidis*. Se emplearon las categorías de sensible (S), sensibilidad intermedia (SI) y resistente (R), según los rangos de CMI establecidos por CLSI (2005). Los rangos de corte se muestran a continuación:

Agente antimicrobiano	Criterios CLSI (µg/mL)		
	S	SI	R
Penicilina (Merck)	≤ 0,06	0,12-0,25	≥ 0,5
Sulfadiacina sódica (SIGMA)	≤ 1	10	≥ 25
Rifampicina (Merck)	≤ 0,5	1	≥ 2
Cloranfenicol (Merck)	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacina (Merck)	≤ 0,03	0,06	≥ 0,12
Ceftriaxona (SIGMA)	≤ 0,12	-	-

Se usaron como controles las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Toma de muestra de sangre y determinación de la respuesta inmune basal contra *N. meningitidis* B y C

Se realizó una extracción de sangre por vía intravenosa mediante el uso de jeringuillas estériles desechables (10 mL). La sangre se centrifugó para obtener el suero y este se mantuvo a -20 °C hasta el momento de la realización del Ensayo Bactericida del Suero (EBS). Debido a la contaminación de algunos sueros, el total de las muestras estudiadas para la determinación de la respuesta inmune contra B fue de 184 sueros y 178 para el serogrupo C.

Cepas utilizadas en el EBS y metodología empleada

Se emplearon las cepas homólogas de *N. meningitidis* 385/83 (B:4:P1.19.15) y C11 ATCC y los lotes de trabajo conservados en el medio Greaves a -70 °C. Se aplicó el método recomendado por el Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) (7).

Lectura e interpretación de los resultados del EBS

Mediante el uso de un microscopio estereoscópico se realizó el conteo de las colonias en todos los pocillos de la placa y se consideró como indicativo de actividad bactericida en el suero aquellas diluciones donde se observó un crecimiento de colonias igual o menor al 50%, con respecto al número promedio de colonias del control correspondiente a la suspensión bacteriana. El resultado se reportó en título de anticuerpos con relación al recíproco de la dilución del suero: Título Bactericida (TB).

Análisis y procesamiento estadístico de los resultados

El análisis estadístico se realizó usando el paquete S, implementación R, versión 2.1.1 y para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5%. Se emplearon estadígrafos descriptivos para la edad de los participantes. Se construyeron tablas de frecuencia, que en conjunto con la prueba Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher, permitieron evaluar las posibles relaciones entre las diversas variables y el estado de portador. Para las variables

que recogen los títulos de anticuerpos se calculó la media geométrica.

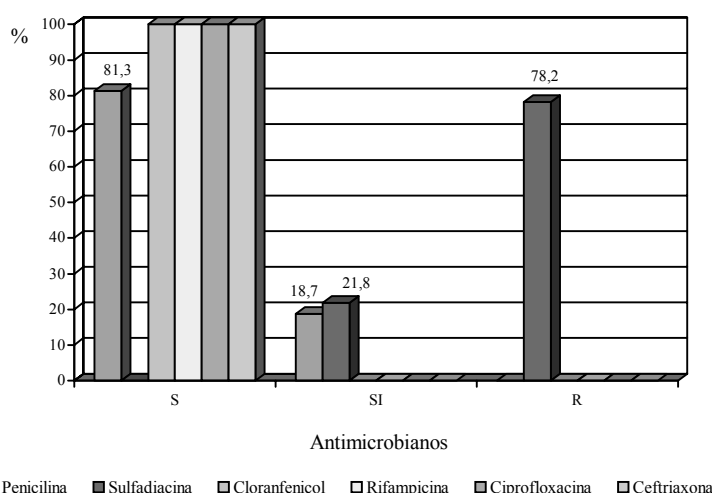
Resultados

De los 189 estudiantes seleccionados, 32 (17%) fueron portadores de *N. meningitidis*. Aunque no se observó diferencia estadísticamente significativa respecto al total de portadores del sexo femenino y masculino, prevalecieron los portadores de *N. meningitidis* entre las adolescentes del grupo de 15 años (76,5%), mientras que en los varones el mayor porcentaje se observó en los estudiantes de 16 años (40%). Al relacionar el resto de los factores de riesgo investigados (hábito de fumar, régimen de internado y antecedentes de infección respiratoria aguda reciente) con el estado de portador, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

La caracterización fenotípica de las cepas aisladas se describe en la Tabla 1. Predominaron las cepas no agrupables (NA) (84,4%), seguidas por el serogrupo B (12,5%) y Z (3,1%). Entre los serotipos prevalecieron los no tipables (NT) (53,1%), seguidos por el 15 y el 4, ambos con porcentajes similares (21,9%) y un aislamiento correspondió al serotipo 1 (3,1%). Los subtipos mostraron una mayor diversidad, prevaleciendo las cepas no subtipables (NST) (31,2%) y P1.5 (15,6%). Predominó el inmunotipo L3,7,9 (71,9%).

Tabla 1. Marcadores fenotípicos entre las cepas de *N. meningitidis* aisladas.

Indicador Fenotípico	Clasificación	Aislamientos (n)	%
Serogrupos	NA	27	84,4
	B	4	12,5
	Z	1	3,1
	Total:	32	Total: 100
Serotipos	NT	17	53,1
	15	7	21,9
	4	7	21,9
	1	1	3,1
	Total:	32	Total: 100
Subtipos	P1.NST	10	31,2
	P1.5	5	15,6
	P1.7	3	9,4
	P1.14	3	9,4
	P1.15	3	9,4
	P1.6	2	6,3
	P1.13	2	6,3
	P1.4	1	3,1
	P1.10	1	3,1
	P1.12	1	3,1
	P1.7,13	1	3,1
	Total:	32	Total: 100
Inmunotipos	L3,7,9	23	71,9
	NIT	5	15,6
	L10	2	6,3
	L3,7,9,8	1	3,1
	L3,7,9,10	1	3,1
	Total:	32	Total: 100



El estudio de susceptibilidad mostró un franco predominio de cepas sensibles a la penicilina (81,3%), aunque en el 18,7% se observó sensibilidad intermedia (SI) a este fármaco. Frente a la sulfadiacina prevalecieron las cepas resistentes (78,2%), el 21,8% mostró SI y ninguna fue sensible. Al resto de los antimicrobianos todas las cepas fueron sensibles (Figura 1).

Leyenda: NA = No agrupable; NT = No tipable; NST = No subtipable; NIT = No inmunotipable

Figura 1. Susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas de *N. meningitidis* aisladas.

La Tabla 2 muestra los resultados de la actividad bactericida del suero. Doce años después de la inmunización con VA-MENGOC-BC®, el 42 y 25% de los estudiantes exhibieron títulos de anticuerpos bactericidas frente a las cepas B y C, respectivamente. El comportamiento de portadores y no portadores con relación a la actividad bactericida del suero no mostró resultados significativos.

Tabla 2. Actividad bactericida del suero contra las cepas B:4:P1.19,15:L3,7,9 y C11 ATCC, según la condición de portador y no portador de *N. meningitidis*.

Condición de portador y no portador de <i>N. meningitidis</i>			
Cepas	Portador <i>N. meningitidis</i>	No portador <i>N. meningitidis</i>	≥ Títulos*
	n (%)	n (%)	
B:4:P1.19,15:L3,7,9	15 (47%)	63 (41%)	≥ 1:4
C11 ATCC	7 (22%)	37 (25%)	≥ 1:8

*Títulos ≥ 1:4 para la cepa de *N. meningitidis* B y ≥ 1:8 para la cepa C (p>0,05)

Discusión

El número de portadores de *N. meningitidis* identificados en este estudio mostró para este grupo de edades cifras similares a las descritas por otros autores, coincidiendo así con los trabajos que señalan porcentajes de portadores elevados entre los adolescentes y adultos jóvenes (10-35%) (8, 9). No obstante, otros notifican cifras inferiores (11,3% y 1,4%) (10, 11). Sin embargo, un estudio realizado en jóvenes

universitarios señala una cifra más elevada (32%) (12), resultado quizás favorecido por tratarse de estudiantes de una academia militar, población sometida a condiciones de vida que propician una mayor interacción social, tales como: el hacinamiento, las maniobras, acampadas y movilizaciones, actividades que incrementan la transmisión de cepas de *N. meningitidis* entre estos individuos.

Aunque no se observó diferencias estadísticamente significativas cuando se relacionó el estado de portador con la edad y el sexo, el ligero predominio de portadores en el sexo femenino coincidió con el resultado descrito por Davies y colaboradores, al estudiar 119 contactos de adolescentes de un caso índice de EM (13). No obstante, numerosos trabajos refieren un mayor número de portadores de *N. meningitidis* entre los varones (14, 15), situación que pudiera quizás estar influenciada por los numerosos estudios realizados en localidades cerradas o semicerradas, sitios donde suele prevalecer la población masculina.

La exposición pasiva y activa al humo del tabaco constituye una de las variables más involucrada con el estado de portador de meningococo debido a los efectos perjudiciales que se le atribuye al humo sobre la acción ciliar de las células de la mucosa respiratoria (16, 17, 18). No obstante, coincidiendo con este estudio, trabajos realizados en diferentes regiones tampoco señalan asociación entre ambas variables (12, 19, 20). El resultado obtenido en este trabajo pudo estar influenciado por la población investigada, grupo de individuos muy jóvenes y con poco tiempo de exposición al tabaco.

El hacinamiento se asocia también al estado de portador y son numerosas las investigaciones que aseveran esta condición, sobre todo aquellas vinculadas con las

poblaciones militares o grupos que conviven en regímenes de internado o seminternado (21, 22). Aunque, en este estudio no se observó diferencias significativas al comparar la condición de alumno interno con el estado de portador de meningococo, está bien documentado que los portadores nasofaríngeos de bacterias potencialmente patógenas y que habitan en instituciones cerradas, aumentan en más de un 50%, propiciándose así una mayor transmisión de estos microorganismos (23).

Algunos autores refieren que las infecciones respiratorias agudas (IRA), principalmente las de etiología viral, predisponen a la colonización nasofaríngea por bacterias patógenas (22, 24). Sin embargo, la evidencia que ejerzan efectos importantes en la adquisición de *N. meningitidis* resulta compleja, así lo expresan los estudios realizados en África y la India durante un período invernal, época caracterizada por el aumento de las IRA, donde contrariamente a lo esperado no detectaron un aumento del índice de portadores (2).

Las características fenotípicas de las cepas aisladas en este estudio difieren del patrón mostrado por las cepas aisladas durante la epidemia de EM en Cuba, etapa donde existió un evidente predominio del fenotipo B:4:P1.19,15:L:3,7,9 (25). Sin embargo, las asociaciones fenotípicas de este trabajo mostraron un comportamiento similar a los obtenidos en los estudios de portadores realizados en Cuba durante los últimos años, resaltándose la gran variabilidad de las cepas (12, 26), resultado que coincide con aquellos que señalan una mayor diversidad entre los aislamientos de portadores (27, 28). El predominio de las cepas NA en este trabajo y la ausencia del serogrupo C, hablan a favor del impacto logrado por la inmunización sistemática con VA-MENGOC-BC® desde 1991, comportamiento que se hace más evidente debido al escaso número de cepas virulentas identificadas.

La resistencia a la sulfadiacina constituye una situación reconocida mundialmente. Estudios similares realizados en Cuba (29) y en otras regiones (19, 30) confirman la persistencia de esta resistencia y justifican su abandono como quimioproláctico. Sin embargo, la rifampicina mantiene su vigencia y constituye el fármaco de elección en Cuba y otros países, pero se observa una tendencia a la emergencia de cepas resistentes, sobre todo después de su empleo en la prevención de casos secundarios de EM (31).

Al igual que otros trabajos realizados en Cuba (32), en este estudio todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol. Sin embargo, en Francia y Vietnam se detectan meningococos resistentes a este antimicrobiano, alertándose del aumento de cepas de *N. meningitidis* con características similares (33, 34).

En este trabajo se constató la eficacia de la ceftriaxona, coincidiendo así con lo descrito por otros autores, los que manifiestan su utilidad para el tratamiento de los casos invasivos de EM, demostrando también su efectividad para

erradicar el estado de portador (35). Por otro lado, la ciprofloxacina, fármaco del grupo de las quinolonas, constituye una buena alternativa como quimioproláctico, sin embargo, recientemente se han encontrado en Argentina cepas con SI (36), comportamiento que pudiera estar relacionado con la presión selectiva ejercida por el uso indiscriminado del mismo en las infecciones de la comunidad (31).

Desde hace algunos años, el fenómeno de la SI a la penicilina se ha convertido en un problema para las autoridades de salud. Otros trabajos realizados en Cuba señalan una situación similar a la del presente estudio (26, 37). En España la emergencia de cepas de *N. meningitidis* con SI a la penicilina se identificó desde 1985, situación que aumenta también en varios países y llega a considerarse como un problema terapéutico de gran envergadura (19, 31, 35).

Cuando se analizó la respuesta inmune basal por EBS, el suero de un número considerable de estudiantes mostró anticuerpos bactericidas contra ambas cepas vacunales 12 años después de inmunizados, comportamiento que puede estar relacionado con una respuesta inmune de larga duración inducida por VA-MENGOC-BC® y reforzada por la exposición de manera repetida e intermitente a otras cepas de meningococo que inducen la formación de anticuerpos homólogos y heterólogos. No debe descartarse el hecho de que esta inmunidad se refuerza por la exposición a bacterias que no tienen relación taxonómica con *N. meningitidis*, pero que comparten con ella epítopes semejantes e inducen anticuerpos con reactividad cruzada. Se señala que *N. lactamica* induce la formación de anticuerpos bactericidas contra meningococo, protegiendo así de la infección meningocócica (38).

Se puede concluir que, para comprender mejor la transmisión de cepas de *N. meningitidis* dentro de la comunidad se deben seguir realizando estudios similares, trabajos que incorporen otros grupos poblacionales y métodos diagnósticos que contribuyan a una mejor identificación de las cepas. El conocimiento de los marcadores epidemiológicos de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores, así como la respuesta inmune a este microorganismo, constituyen estudios indispensables en la vigilancia epidemiológica de la EM. Identificar los fenotipos y la susceptibilidad a los antimicrobianos de las cepas circulantes aporta una valiosa información para analizar adecuadamente el alcance de las acciones de Salud Pública y posibilitar la toma de decisiones sobre futuras intervenciones basadas en datos científicos.

Referencias

1. Stephens DS. Conquering the meningococcus. FEMS Microbiol Rev 2007;31:3-14.
2. Cartwright K. Epidemiology of meningococcal disease. Hosp Med 2002;63:264-7.

3. Ministerio de Salud Pública. Estadística de Salud en Cuba. Anuario Estadístico 2006. MINSAP. La Habana: Ministerio de Salud Pública. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/doc/sitios/dne/enfmeningococica_1970-2006.doc. [Acceso: 17 de julio del 2007].
4. Abdillahi H, Poolman JT. Whole cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. FEMS Microbiol Letters 1987;48:367-71.
5. Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Serie monográfica. Cuba. Ciudad de La Habana. Ediciones Finlay. Instituto Finlay. 1995.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 15th Informational Supplement. CLSL/ NCCLS document M100-S15. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa, 2005.
7. Kapczynski DR, Williams DB, Harakeh HS, Carlone GM. *Neisseria meningitidis* serogroup B Bactericidal Assay. Childhood and Vaccine-Preventable Diseases Immunology Section, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA. 1997.
8. Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. J Med Microbiol 2004;53:821-32.
9. Claus H, Maiden MC, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, et al. Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. J Infect Dis 2005;15: 1263-71.
10. Kremastinou J, Tzanakaki G, Levidiotou S, Markou F, Themeli E, Voyiatzi A, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in northern Greece. FEMS Immunol Med Microbiol 2003;39:23-9.
11. Montagna MT, Caggiano G, Germinario C, Trerotoli P, De Donno A, Carrozzini F, et al. Carriers of *Neisseria meningitidis* among teenagers in Apulia (Italy). Ann Ig 2003; 15:845-50.
12. Núñez N, Martínez I, Izquierdo L, Mirabal M, Sierra G. Prevalencia y dinámica de portadores asintomáticos de *Neisseria meningitidis* en estudiantes universitarios de una escuela militar en Ciudad de La Habana. Rev Panam Infectol 2006;8(1):9-17.
13. Davies AL, O' Flanagan D, Salmon RL, Coleman TJ. Risk factors for *Neisseria meningitidis* carriage in a school during a community outbreak of meningococcal infection. Epidemiol Infect 1996;117:259-66.
14. Block C, Gdalevich M, Buber R, Ashkenazi I, Ashkenazi S, Keller N. Factors associated with pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* among Israel defence force personnel at the end of their compulsory service. Epidemiol Infect 1999;122:51-7.
15. Tyski S, Grzybowska W, Dulny G. Tests for *Neisseria meningitidis* in adolescents and adults (recruits). Med Dosw Mikrobiol 2000;52:247-55.
16. Orr HJ, Gray SJ, MacDonald M, Stuart JM. Saliva and meningococcal transmission. Emerg Infect Dis 2003;10:36-9.
17. Pavlopoulou ID, Daikos GL, Alexandrou H, Petridou E, Pangalis A, Theodoridou M, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* by Greek children: risk factors and strain characteristics. Clin Microbiol Infect 2004;10:137-42.
18. MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Evans MR, et al. Social behaviour and meningococcal carriage in British teenagers. Emerg Infect Dis 2006;12: 950-7.
19. Ercis S, Koseoglu O, Salmanzadeh-Ahrabi S, Ercis M, Akin L, Hascelik C. The prevalence of nasopharyngeal *Neisseria meningitidis* carriage, serogroup distribution, and antibiotic resistance among healthy children in Cankaya municipality schools of Ankara province. Mikrobiyol Bul 2005;39(4):411-20.
20. Martínez I, López O, Sotolongo F, Mirabal M, Bencomo A. Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de una escuela primaria. Rev Cubana Med Trop 2003;55:162-8.
21. Andersen J, Berthelsen L, Bech-Jensen B, Lind I. Surveillance of cases of meningococcal disease associated with military recruits studied for meningococcal carriage. Scand J Infect Dis 2000;32:527-31.
22. Yazdankhah S, Kriz P, Tzanakaki G, Kremastinou J, Kalmusova J, Musilek M. 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;42:5146-53.
23. Neal KR, Nguyen-VanTam JS, Jeffrey N, Slack RC, Madeley RJ, Ait-Tahar K, et al. Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study. BMJ 2000;320:846-9.
24. Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P. Lessons from meningococcal carriage studies. FEMS Microbiol Rev 2007;31:52-63.
25. Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. Ciudad de La Habana: Ciencias Médicas; 1991.
26. Martínez I, Sierra G, Núñez N, Izquierdo L, Climent Y, Mirabal M. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores en Cuba durante 20 años. Rev Cubana Med Trop [online Mayo-ago.2006]. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-602006000200005&lng=es&nrm=iso>. Acceso 17 Julio 2007.
27. Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kremastinou J, Pangalis A, Blackwell CC, et al. Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. J Microbiol 2001;39:1235-40.
28. Vázquez JA. Situación actual de la epidemiología de la enfermedad meningocócica. Enferm Infecc Microbiol Clin 2006;24:14-8.
29. Martínez I, García D, Sotolongo F, Gutiérrez M, Matute I, Núñez N, et al. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. VaccciMonitor 2000;9(2):7-13.

30. Ferreira E, Días R, Canica M. Antimicrobial susceptibility, serotype and genotype distribution of meningococci in Portugal, 2001–2002. *Epidemiol Infect* 2006;134: 1203-7.
31. Vázquez JA. Resistance testing of meningococci: the recommendations of the European Monitoring Group on Meningococci. *FEMS* 2007;31:97-100.
32. 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
33. Galimand M, Gerbaud G, Guibourdenche M, Riou J, Patrice C. High-level chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*. *N Engl J Med* 1998;339:868-74.
34. Shultz TR, Tapsall JW, White PA, Ryan CS, Lyras D, Road JJ, et al. Chloramphenicol-resistant *Neisseria meningitidis* containing *catP* isolated in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:856-9.
35. 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.
36. Corso A, Faccone D, Miranda M, Rodriguez M, Regueira M, Carranza C, et al. Emergence of *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:596-7.
37. 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 periodo 1985-1992. *VacchiMonitor* 2000;9(1):5-11.
38. Gorringe AR. Can *Neisseria lactamica* antigens provide an effective vaccine to prevent meningococcal disease?. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:373-9.

Neisseria meningitidis carriers, characterization of isolated strains and basal immune response to VA-MENGOC-BC®

Abstract

A descriptive transversal study of *N. meningitidis* carriers involving 189 students of 12-19 years old of a Polytechnic School in Ciego de Avila province was carried out. This study aimed at knowing the prevalence of *N. meningitidis* carriers, the epidemiological markers as well as risk factors associated to carrier state and to basal immune response to VA-MENGOC-BC® in teenagers. Blood sample and pharyngeal swab tests were carried out to the students, in addition a survey was performed to find out aspects of research. Identification of *N. meningitidis* was carried out by API NH system (bioMérieux). Sero-subtypes and immunotypes were classified by whole cell ELISA with monoclonal antibodies, and basal immune response was detected by Serum Bactericidal Assay (SBA). Antimicrobial susceptibility of strains to Penicillin, Chloramphenicol, Rifampicin, Sodium Sulfadiazine, Ceftriaxone and Ciprofloxacin was determined. Prevalence of *N. meningitidis* was 17%. Non groupable strains were predominant (84.7%), followed by serogroups B (12.5%) and Z (3.1%), serogroup C was absent. Phenotype NA:NT:P1.NST:L3.7.9 (12.5%) prevailed, resistant strains to sulfadiazine (78.2%) and sensitive to penicillin (81.3%), though 18.7% showed intermediate sensitivity to this drug. All strains were sensitive to the remaining antimicrobial drugs. Memory immune response to meningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC®) was observed, 12 years after its application, with anti C and B bactericidal titers of 25 and 42% respectively. We consider that these results may be influenced by systematic immunization that is carried out with this vaccine in Cuba since 1991.

Keywords: *Neisseria meningitidis*, carriers, immunologic memory, Serum Bactericidal Assay, antimicrobial susceptibility.

Recibido: Mayo de 2008

Aceptado: Julio de 2008



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine

Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*

Johan Holst^{a,*}, Diana Martin^b, Richard Arnold^c, Concepcion Campa Huergo^d, Philipp Oster^e, Jane O'Hallahan^f, Einar Rosenqvist^a

^a Norwegian Institute of Public Health, Oslo, Norway

^b Institute of Environmental Science and Research, Porirua, New Zealand

^c Victoria University, Wellington, New Zealand

^d Finlay Institute, Havana, Cuba

^e Novartis Vaccines & Diagnostics, Siena, Italy

^f Ministry of Health, Wellington, New Zealand

ARTICLE INFO

Keywords:

Neisseria meningitidis

Meningococcal disease

Outer membrane vesicles

Vaccines for epidemic control

ABSTRACT

Meningococcal outer membrane proteins have been used for over 20 years in more than 80 million doses; either as carrier protein in a *Haemophilus influenzae* type b (Hib) polysaccharide conjugate vaccine or as vesicle vaccine formulations against meningococcal disease. Conventional wild-type outer membrane vesicle (wtOMV) vaccines are the only formulations that have shown efficacy against serogroup B meningococcal disease. This has been demonstrated in Cuba, Norway and New Zealand; where epidemics, dominated by one particular strain or clone, were causing high rates of disease and wtOMV vaccines have been used for epidemic control. The most significant limitation for widespread use of wtOMV is that the immune response is strain-specific in infants, mostly directed against the immuno-dominant porin protein, PorA. The natural orientation of surface-exposed membrane antigens and the preservation of good physico-chemical stability are key features of OMV vaccines. The efficacy, tolerability and safety of wtOMV vaccines have been well proven. The most recent experience from New Zealand demonstrated a vaccine effectiveness of 80% for children less than 5 years of age, over a period of 24 months. Such results are encouraging for the further use of "tailor-made" OMV vaccines for epidemic control. Moreover, it provides opportunities for development of OMV vaccines with various additional cross-protective potential. There is good reason to believe that in the coming few years the "OMV-concept" will be exploited further and that a number of cross-protective "universal" antigens will be included in vaccines against serogroup B meningococcal disease. The desire to have a global vaccine strategy that enables susceptible individuals to be protected against all the relevant serogroups of meningococcal disease may become a reality.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The obligate human pathogen *Neisseria meningitidis* is a Gram-negative bacterium that variably colonizes the nasopharynx of healthy individuals, often at a level of 10–20% [1,2]. On rare occasions an encapsulated strain invades the blood stream leading to meningitis and/or septicaemia. Death occurs in around 5–10% of cases and up to 20% survivors are left with serious injuries including loss of limbs and neural deficits [3]. Invasive meningococcal disease causes a significant public health burden throughout the world,

with estimates of 500,000 cases and more than 50,000 deaths reported annually [4].

Meningococci are differentiated on the basis of their capsular type. Effective conjugated capsular polysaccharide–protein vaccines have recently been developed for prevention of disease caused by strains of serogroup A, C, W-135 and Y in all age-groups [5]. However, the capsular vaccine approach is not suitable for strains of serogroup B since that polysaccharide capsule has a structural homology with the polysialylated form of the neural cell adhesion molecule (PSA-NCAM) in the human foetal brain. Such structures can also be found in adult tissues, though in lesser amounts. The serogroup B capsule is poorly immunogenic, but more importantly the concern is that its use could lead to an autoimmune response and tissue damage in vaccinees, or even cause foetal disorders [6]. Therefore, the vaccine approach for group B meningococci has largely focused on outer membrane proteins.

* Corresponding author at: Department of Bacteriology and Immunology, Norwegian Institute of Public Health, Oslo, P.O. Box 4404 Nydalen, NO-0403 Oslo, Norway. Tel.: +47 915 36 782; fax: +47 21076518.

E-mail address: johan.holst@fhi.no (J. Holst).

Table 1
Studies giving estimates of vaccine efficacy/effectiveness by OMV vaccines.

Trial	Vaccine	Doses	Efficacy/effectiveness ^{a,b}			
			Adults/adolescents	Children	Infants	Estimate (total)
Chile (Iquique)	Finlay 4:P1.19,15 VA-MENGOC-BC	Two doses	83% (16 months) 10–14 years	/	/	83% (16 months)
Cuba 1987–1989	WRAIR ^c 15:P1.7-2,3	Two doses	70% (30 months) 5–21 years	/	–23% (30 months)	51%
Norway 1988–1991	NIPH 15:P1.7,16 MenBvac	Two doses	87% (10 months) 57% (29 months) 13–16 years	/	/	57% (29 months) ^d
Brazil ^e 1990–1991	Finlay 4:P1.19,15 VA-MENGOC-BC	Two doses	74% >48 months	74% 24–47 months	–37% <24 months	54%
New Zealand “Roll-out” 2004–2008	NIPH/Novartis 4:P1.7-2,4 MenNZB	Three doses ^f	73% (24 months) ^{a,g} 69% (42 months) ^{a,g} 5–19 years	80% (24 months) ^{a,h} 1/2–5 years	85% (24 months) ^{a,h} 1/2–3 years	73% (24 months) ^{a,g} 69% (42 months) ^g <20 years

^a Effectiveness.

^b Duration of the observation period given in parentheses.

^c Not an OMV formulation; <0.1% LPS. Thus, this is rather a vaccine formulation consisting of protein aggregates [50].

^d According to study protocol [12].

^e Case–control study [51].

^f Please note that the estimates from New Zealand follows a three dose primary immunization series (6 weeks apart), as opposed to all the other efficacy trials [55–59].

^g Poisson regression (no age dependence found) [56,57].

^h Cohort study [58].

Historically in the more developed countries serogroup B disease has tended to dominate, although serogroup C caused more fatalities. Following the gradual increase of global implementation of the glycoconjugate serogroup C vaccines in routine infant immunization programs a reduction of serogroup C cases has occurred [7]. Serogroup Y meningococcal disease which emerged in the USA over the last decade accounted for more than one third of their cases [8]. Recent epidemiological data reveals that serogroup B strains currently are responsible for 40–50% of sporadic meningococcal disease also in USA and more than 90% in certain European countries [9,10]. Thus with the increasing introduction of a quadrivalent polysaccharide–protein conjugate vaccine against serogroups A, C, W-135 and Y, a vaccine to control serogroup B remains the last meningococcal challenge in the industrialized world. In most countries, the highest rates of serogroup B disease occur in infants less than 1 year of age. The challenge is to develop an optimal vaccine that is safe, effective and has the ability to induce long-term immunity in infants.

To date, wild-type outer membrane vesicle (wtOMV) vaccines are the only formulations that have shown efficacy against serogroup B meningococcal disease. Efficacy has been demonstrated in Cuba, Norway, Chile, Brazil and New Zealand (Table 1); where epidemics dominated by one particular strain of defined clonal type were lasting for decades [11–13]. Because of their strain specificity wtOMV vaccines are particularly suitable for epidemic control [14]. The most significant limitation of this approach is that the strain-specific immune response, in smaller children and infants, is almost exclusively directed towards the immunodominant porin protein, PorA [15–17].

The present review deals with the physico-chemical properties of wtOMV vaccine formulations, the experience from clinical trials, epidemic control and routine use by conventional OMV vaccines. The potential for various improvements of the “OMV concept” and likely scenarios for future use will also be addressed.

2. Manufacture, characterization and other pre-clinical data

From the early 1980 various manufacturing methods for OMV vaccines have been presented [18,19]. The most detailed and comprehensive presentation was published by Frasch et al. [20].

Traditionally the OMV bulk for vaccine production is processed from bacteria that have been grown by fermenter in a semi-synthetic (e.g. modified Frantz' medium) or a fully synthetic medium (e.g. Catlin-6). The bacterial mass is harvested by centrifugation or tangential flow filtration. Outer membrane vesicles are extracted by 0.5% sodium deoxycholate (DOC) in a Tris–EDTA buffer, pH 8.5 buffer. Cell debris is removed by low speed centrifugation or by tangential flow filtration. Concentration is done by ultrafiltration. Further purification is achieved by ultracentrifugation. The membranes are suspended in a 3% sucrose solution (stabilizing the OMVs). Purification of OMV can also be done by gel filtration chromatography. Concentration of purified OMVs may be done by diafiltration (300 kDa exclusion limit membrane). Finally the OMV solution is passed through a 1.2 µm membrane for removal of aggregates, then through a 0.22 µm membrane (i.e. “sterile” filtration). OMV bulk is normally stored at +5 °C at a concentration of approx. 1 mg/ml until further processed (e.g. adsorption to Al-adjuvant).

An alternative manufacturing strategy for obtaining OMVs is to concentrate the growth media supernate after discarding the bacteria. This implies harvesting all the released vesicles during bacterial growth. Some strains and particular mutants are better for this purpose than others (see below).

Using the vesicle structure for antigen presentation has several advantages. The most important of which is that surface-exposed membrane antigens maintain their physico-chemical stability. During manufacturing, the lipopolysaccharide (LPS) content is reduced substantially (from 25–50% to about 5–10% in relation to total protein), in order to make the vaccine acceptable for parenteral use [20,21]. To retain the outer membrane bi-layer confirmation, a minimal amount of LPS (approx. 1%) has to be retained in the membrane. In a transmission electron microscope (TEM) the negatively stained membrane material appears as vesicles, with an average diameter of 80–100 nm (Fig. 1B).

Normally the final vaccine is formulated by adsorbing the “sterile”-filtered OMV bulk onto an aluminium adjuvant [20,21]. Initial studies at NIPH, using both unadsorbed- and adsorbed OMVs did not show any large difference regarding the immune response against serogroup B meningococci [22,23]. However, the choice for an adsorbed formulation was done on the basis of general stability judgements and the intention to keep the free LPS at a minimum [21,22]. OMV vaccines are usually stable for years, both as adsorbed

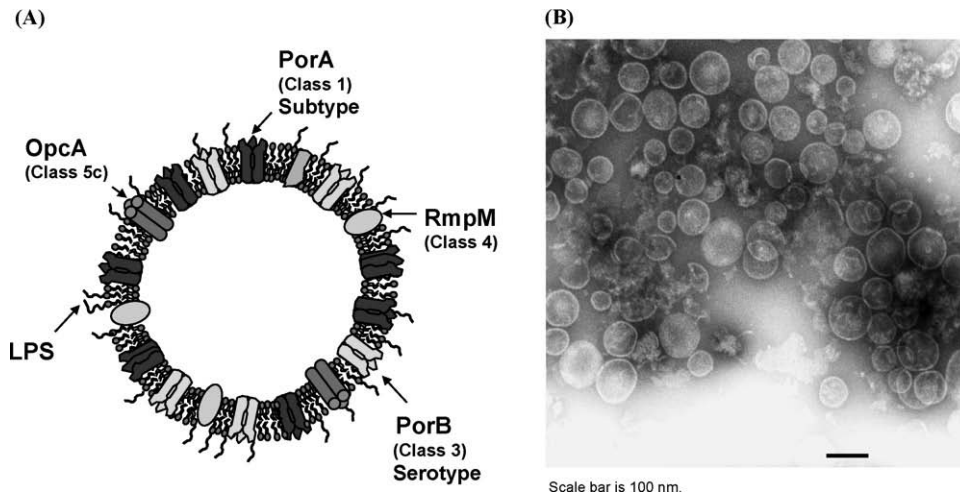


Fig. 1. A presentation of key physical features of OMV vaccines, namely the vesicle and its appearance. In part A (left) it is given a schematic model of the OMV entity showing the main constituents of MenBvac: the outer membrane proteins PorA (blue), PorB (light green), RmpM (class 4 protein) (yellow egg-forms), OpcA (class 5 proteins) (red cylinders). LPS protrudes out of the membrane and the phospholipid bilayer is visualized by red “heads” and curved “tails”. The detergent DOC has not been included in the drawing; (courtesy of Audun Aase, NIPH, Oslo). Part B (right) shows an electron micrograph of outer membrane vesicles of *N. meningitidis*. The vesicle diameter is about 50–200 nm (80 nm on average); (courtesy of Ellen Namork, NIPH, Oslo).

to Al-adjutant or stored as unadsorbed vesicles in bulk at +5 °C [20,21].

Membrane-bound LPS is about 100 times less toxic compared to free LPS [24]. Studies in rabbits with the Norwegian OMV vaccine (MenBvac) gave about the same difference between LPS in water and incorporated in vesicles as reported by Tsai et al. [24]. Adsorbing the vesicles to aluminium hydroxide reduced the pyrogenic activity even further (about 5–10 times less) [21,23].

The OMV vaccines are rather complex formulations [21]. One-dimensional SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) with Coomassie Brilliant Blue (CBB) staining (followed by protein-scanning of the gel) and Western blotting using specific antisera and/or monoclonal antibodies has been the standard way to identify and determine the relative amounts of the various antigens in the formulation [20,21]. Some antigens (e.g. lipoproteins) are difficult to measure in this way. Fig. 2 shows a typical protein pattern of two different wtOMV vaccines after CBB staining.

The availability of sequence data for the whole *Neisseria* genome and improved proteomic technology has increased the identification and definition of the OMV proteome [25]. In addition to one-dimensional electrophoresis, two-dimensional techniques are used, as well as mass spectroscopy, differential in gel electrophoresis (DiGE) and multiplex immunodetection. Recent qualitative proteomic studies have shown that OMV vaccines also contain a high number of periplasmic and cytoplasmatic proteins [25–28]. However, quantitatively the vaccines are dominated by the well known outer membrane proteins like the PorA-, PorB porins, reduction modifiable protein (RmpM) and OpcA invasin [20,21,25]. A number of iron-regulated proteins (like TbpA/-B and FetA or FrpB) will also be seen if iron-depleted growth conditions are chosen [20].

During recent years the compositions of different OMV formulations have been studied in greater detail. Several hundred different proteins have been identified [25–28]. Uli et al. measured the contribution of the major proteins to the total protein content in the Cuban OMV vaccine and found it to be about 60% [27]. The study of Ferrari et al. compared the composition of conventional detergent extracted vesicles and the vesicles released spontaneously by the *N. meningitidis* Δgna33 mutant [26]. They found less than half as many different proteins in the mutant OMV preparation (60 versus 138). Of the detected proteins from the conventional detergent extracted vesicles more than 60% of the total number was reported to belong to the inner membrane and cytoplasmatic compartments.

By contrast, most of the proteins from the mutant OMVs were classified as outer membrane proteins. Furthermore, the mutant OMV formulation elicited bactericidal antibody responses in mice that indicated a protective capacity against a broader panel of strains than the ordinary OMV [26]. These encouraging results deserve to be tested in clinical trials. However, it must be noted that there were a number of variables between the two methods for OMV preparation, justifying caution regarding conclusions from the comparison (e.g. whole cell extraction versus blebs from supernate; detergent

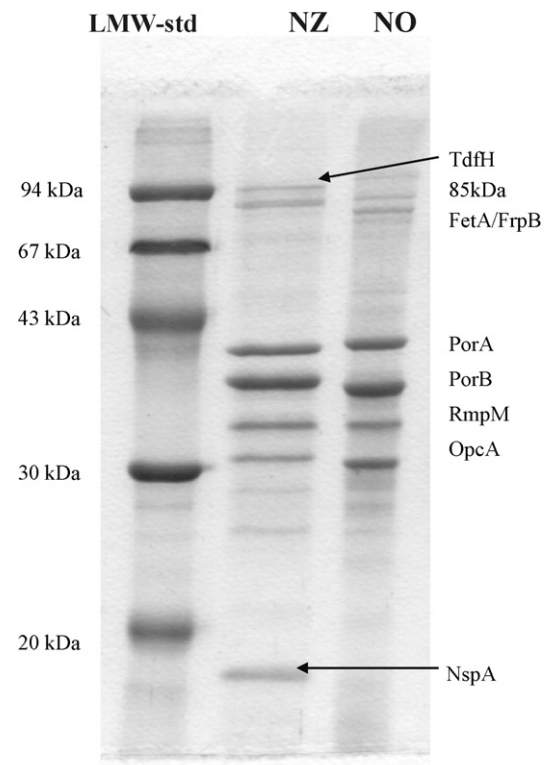


Fig. 2. The main protein composition of OMVs from MenBvac (NO) and MenNZB (NZ) as can be visualized by CBB staining after SDS-PAGE. Molecular weight standard on the left and positions of the various visible proteins indicated on the right.

versus no detergent and thus, a substantial difference in the LPS amount).

Inspired by the good results of the Cuban and Norwegian efficacy trials with their respective wtOMV vaccines, and attempting to avoid some of the observed shortcomings of the conventional wtOMV vaccines, Poolman and van der Ley genetically engineered meningococcal strains to harbour several different PorAs [29]. Later this approach has been pursued to give the two formulations “HexaMen” and “NonaMen”. The Netherlands Vaccine Institute (NVI) state that “NonaMen”, containing nine different PorA's, is likely to cover approximately 75% of the serogroup B strains circulating globally [30]. The production and control of this genetically altered OMV vaccines, is along the lines of the wild-type ones [20,31]. It should be noted, however, that a number of modifications to the wild-type strain 44/76 (originally, the Norwegian production strain) have been engineered in order to make modified strains with three different PorA proteins inserted in each strain. Recombinant DNA-technology has been used to achieve this. Thus, recOMV might be the right term for this type of vesicle vaccine. The whole developmental effort focused on PorA as the protective antigen in the vaccine. The vaccine development involved deleting the PorB, having a “rougner” LPS (lacking, the lacto-N-neo-tetraose/L3,7,9 epitope) and reducing the amounts of the RmpM protein by selecting colonies during laboratory growth. The clinical performance of the modified vaccine was reported following a study in children (Gloucestershire, UK) [32]. This study showed that four doses were needed in the primary immunization for some of the least immunogenic serosubtypes.

The OMV component of the Hib-conjugate vaccine PedvaxHIB, manufactured by Merck, Sharp & Dohme, consists of the same material as traditional OMV formulations [33]. However, not much has been published about the QC and characteristics of this formulation. Important to note is that studies have been showing substantially different immunogenicity using the Hib-conjugate when compared with other Hib formulations using tetanus toxoid, diphtheria toxoid or CRM₁₉₇ as carrier proteins. A stronger immune response occurs with the conjugate vaccine containing the meningococcal OMV as conjugation partner in the T-dependent vaccine [33–35]. The difference in response is particularly significant with the initial immunization (first and second dose) [33,35].

Initial clinical trials tested both adsorbed- and unadsorbed vaccine formulations. The immunogenicity was similar. However, aluminium adsorbed vaccine was chosen for licensing in order to improve tolerability [36]. The amount of *Neisserial* proteins in each dose of the current PedvaxHIB formulation is 125 µg and the PRP Hib-capsular polysaccharide is 7.5 µg [37].

The manufacturer of the Hib vaccine conjugated with meningococcal proteins used the term outer membrane protein complex (OMPC) and they attributed the observed mitogenic effect for lymphocytes to the PorA2 (“class 2 porin”). The immuno-stimulatory effect was shown to be different than the B-cell polyclonal activation of LPS [33,38]. The strongest mitogenic activity was measured with denatured, monomeric porins, not with native, trimeric porins [33]. Thus, how much of these studied immunological effects that are also present in conventional OMV vaccines against meningococcal disease has not fully been elucidated.

Recently, it has been noticed that the use of DOC or other detergents selectively removes loosely associated membrane lipoproteins, some of which have been shown to have protective potential. Approaches to avoid using detergent treatment of outer membranes have so far been presented by a couple of different research groups [39–42]. The advantage being not to lose lipoproteins and other components readily extracted by DOC (e.g. factor-H binding protein, fHbp), and to obtain more *native* vesicles (NOMV). Preliminary results indicate that non-detergent treated vesicles might present the protective antigens differently than the conven-

tional DOC-treated OMV vaccines [39–41]. For further stimulation of cross-reactive immunity, the expression of minor conserved membrane proteins (e.g. NadA and fHbp) is increased by genetic manipulation in this type of development approach. However, in order to have a vaccine acceptable for human use, the lipid A part of LPS must then be detoxified genetically [40,42].

Vaccine formulations for mucosal application have been both unadsorbed conventional OMV and native vesicles with high content of LPS (>25% in relation to total protein). Both types of mucosal formulations have shown good immunogenicity to the meningococcal vesicles and capacity to enhance the secretory- and systemic immunity towards other vaccine antigens; i.e. function as a mucosal adjuvant for influenza virus etc. [43–46]. However, one of the limitations experienced has been the high amount of material needed (approx. 10 times the dose used for injection). Thus, further studies are needed to optimize the formulations and administration method [45].

3. Development, use and impact of protein based vaccines for serogroup B meningococci

Already early in the 20th century, the importance of serum bactericidal activity (SBA) for protection against meningococcal disease was noted [47,48], but the most quoted publication is the 1969 paper by Goldschneider et al. in which a correlation between SBA, disease incidence and age was shown [49]. The same correlation pattern of increasing SBA level, with diminishing disease rates, following increasing ages in the adolescent period was shown for serogroups A, B and C meningococci [49].

One of the earliest MenB vaccine trials was done in 1987–1989 when the Walter Reed Army Institute of Research (Bethesda, USA) developed and tested a vaccine in Iquique, Chile to control an epidemic, caused by a B:15:P1.3 strain of genetical designation ET-5 complex. Two doses of vaccine were given to persons aged from 1–21 years [50]. For those aged 5–21 years the point estimate for efficacy was reported as 70% ($P=0.04$) after 30 months, whereas for children 1–4 years of age no efficacy was observed. In that study the SBA levels in a sample of subjects showed minimal or no increases in antibody levels in children aged 1–4 years but higher levels in those aged 5–18 years [50].

Around the same time a vaccine, VA-MENINGOC-BC developed by the Finlay Institute in Cuba to control an epidemic caused by strain type B:4:P1.19,15 with genetical designation ET-5 complex [11]. The vaccine was given as two doses and first tested in a randomized double-blind controlled trial in 106,000 Cuban school students (aged 10–14 years) from 1987 through 1989. In that study, efficacy for prevention of the Cuban strain of meningococcal disease was estimated to be 83% during 16 months observation period (95% CI = 42–95%); Fisher exact $P<0.001$ [11].

In a case-control study in Sao Paulo, Brazil, during 1989–1990 two doses of VA-MENINGOC-BC were given to all age-groups. Efficacy values of –37%, 47% and 74%, were calculated for groups of infants aged 3–23 months, 24–47 months and 48–83 months, respectively [51].

In 1988–1991 a third strain-specific vaccine, MenBvac, was trialled by the Norwegian Institute of Public Health (NIPH), Oslo. This vaccine was developed as a response to an ongoing clonal epidemic [12]. The production strain (44/76-SL) was a typical representative for the disease-causing strains with the phenotypic characteristics: B:15:P1.7,16 and the genetical designation ST-32/ET-5 complex [21]. This vaccine was also tested as two doses in a placebo controlled double-blind efficacy trial involving about 172,000 students aged 13–14 years. The vaccine was developed in response to the domination of the disease-causing strain type, and given in a two-dose regimen. Vaccine efficacy was calculated to be 57% after 29

months observation period (95% CI = 21–87%) with antibody levels reported as waning after 10 months [12,52]. Re-evaluation of the data showed the point estimate at 10 months to be 87% [52] (see Fig. 3).

From 1991 New Zealand experienced a clonal outbreak by serogroup B meningococci strains with the phenotypic characteristics of B:4:P1.7-2,4 and the genetical designations ST-41/44 complex, lineage III [13]. In early 2004 the devastating results were 5550 cases and 222 deaths in a population slightly above 4 million. Moreover, children of indigenous Maori and Pacific ethnicity had a much higher risk of getting meningococcal disease. Based on aggregated data from 1997–2003, a Pacific child had a 1 in 68 chance of contracting the disease before reaching 5 years of age. For a Maori child this risk was 1/117 and for a child with European or other background it was down to 1/438 [53].

With an epidemic well established in New Zealand and already a number of deaths or injuries, it was considered unethical to disadvantage a number of children by undertaking a placebo-controlled phase III clinical trial. The New Zealand Regulatory Authorities licensed MenNZB for epidemic control and campaign use in July 2004 [53]. Chiron (later Novartis), Siena, Italy; in collaboration with NIPH, Oslo, Norway; started development of a “tailor-made” vaccine for New Zealand, based on a B:4:P1.7-2 strain (NZ 98/254) and the pre-clinical studies initiated by Rosenqvist [54]. This led to a contract for manufacture of the New Zealand vaccine, MenNZB and a collaboration with the New Zealand Ministry of Health for clinical trials and roll-out of the vaccine [14,53]. The studies undertaken were conducted in accordance with the declaration of Helsinki guidelines on good clinical practice and the New Zealand regulations for clinical trials. The first MenNZB trial was in 75 adults [55]. Randomised observer-blind trials were undertaken with MenNZB. The Norwegian vaccine, MenBvac was used as control [56], except for the young infants, where non-inferiority with the routine infant vaccines was used [56]. Based on the initial clinical trials in New Zealand and the safety data base for the Norwegian “parent vaccine”, MenBvac, the public health intervention of delivering MenNZB to all individuals between 6 weeks and 19 years (approx. 1 million people, given three doses at 6-week intervals) has been the largest immunization program in New Zealand to date [53].

Initial estimation of the effectiveness with MenNZB for the vaccinated population (<20 years) was found to be 73% in a prospective study, using statistical modelling [57]. Estimation of effectiveness in children aged 6 months to <5 years was later evaluated by an observational cohort design [58]. The study showed that the immune response in vaccinated children led to good and lasting vaccine effectiveness. Compared with unvaccinated children, fully vaccinated children were 5–6 times less likely to contract meningococcal disease (caused by the epidemic-/vaccine strain) in 24 months after immunization. This corresponds to a vaccine effectiveness of 80% for children aged 6 months to <5 years and 85% for children aged 6 months to <3 years [58].

In very young infants (6 weeks of age) data from the New Zealand clinical trials suggested that the immune response after three doses was good, but that a fourth dose at 10 months of age was necessary to elicit a similar response as that seen in older infants (6 months and older). In toddlers, the use of a fourth dose 11–16 months after the administration of the third dose elicited a stronger immune response demonstrating the value of an additional dose of vaccine given at an older age [59].

Following the primary immunization of two doses in the Norwegian study, the bactericidal antibodies declined over the next ten months to low levels which coincided with the appearance of “break-through” cases in the vaccinated group. In a separate immunogenicity study involving a third dose of vaccine given 10 months after the second dose it was shown that a strong booster response was induced (Fig. 3), suggesting that a third dose of vac-

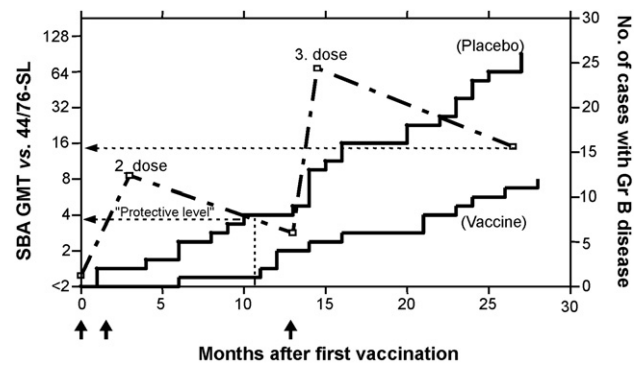


Fig. 3. Illustrating the duration of immune response and protection. The graph is based on data from the efficacy trial in Norway and an immunogenicity trial during the same period (investigating the effect of a booster-dose). Bactericidal activity in a three-dose study (left Y-axis) as compared to the number of cases (cumulative) in vaccine- and placebo groups in the original two-dose efficacy trial (right Y-axis).

cine is necessary for a more sustained protective level [52]. The effect of a booster dose as long as 4–5 years after the primary immunization with two doses had previously been studied in 27 Norwegian adults [60]. This immunogenicity trial also showed a substantial benefit of the booster immunization.

The immunological memory and the “booster response” appear, however, not to be fast enough in the instance when meningococci are entering the blood stream. In that case, sufficient circulating antibodies or other protective mechanisms seem to be required. This was also recently demonstrated in a small study (six adults) undertaken in New Zealand with MenNZB. It took 5–8 days before the subjects showed a measurable increase in antibody response after the fourth (“booster”) dose of MenNZB; 15 months after receiving their primary immunization (Martin et al., manuscript in preparation). This is in accordance with the previous findings of Rosenqvist et al. [60].

Various studies with wtOMV vaccines revealing efficacy- or effectiveness estimates are presented in Table 1. Note that different observation periods, varying age-groups and number of doses have been used in the different studies.

4. Age specific immune responses

The marked and selective differences in the immune response in various age-groups after immunization with OMV vaccines, was first reported following a collaborative trial in Santiago, Chile in 1994 with the Cuban and Norwegian OMV vaccines [15]. When the target organisms in the SBA test were of the same strain type used for vaccine manufacture (i.e. homologous strain), the percentage of

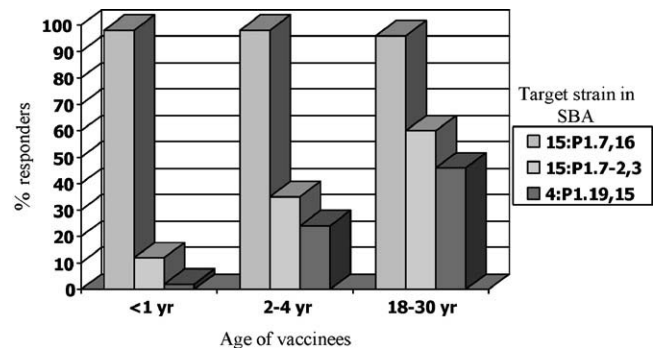


Fig. 4. The degree of strain- and serosubtype specific response is varying with age. The percentage of responders in the bactericidal assay (≥ 4 -fold rise) with various target strains; after three doses of MenBvac. Adults are showing the most cross-reactive SBA responses.

vacinees having ≥ 4 -fold rise in SBA titres, was of the same magnitude for the infant group as for adults ($>95\%$), (see Fig. 4 for the immune responses after the Norwegian vaccine). However, when the target strain differed from the vaccine strain (i.e. being heterologous), then approx. 10% of the infants were counted as responders, compared to 45–60% among adults [15,16]. This PorA dominating immune response was also later demonstrated in New Zealand [17]. Deletions in the PorA VR2 epitope of the New Zealand epidemic strain modified the level of strain recognition by vaccine induced functional antibodies. Moreover, impaired expression of the PorA protein in an epidemic strain type, (due to a reduction of guanidine residues in the polyguanidine track of the *porA* promoter region), resulted in no serum antibody recognition in the SBA test [17]. In adults the situation is substantially different; e.g. after being vaccinated with MenBvac the percentage of responders was only reduced from 96% to 45% or 60% (data for MenBvac) when heterologous strains were used as targets in the SBA test [15].

The important finding of the study in Santiago, Chile [15] was initially rather overlooked; in spite of encouraging homologous responses in infants and that an editorial in JAMA mentioned a “strain-specific” or “tailor-made” vaccine as a possible future option [61]. Unfortunately the negative outcome from the Chilean study, i.e. “*These data suggest that neither vaccine would confer sufficient protection during a heterologous epidemic*” [15], became the “take-home” message for some years. Thus, Chile’s epidemic was not addressed with a vaccine and it took until July 2004 before a “tailor-made” vaccine was introduced to control New Zealand’s epidemic of meningococcal B disease [14,54,55]. The WHO supported public health intervention in New Zealand has clearly shown that the protective immune response is as good in infants as in adults [55,59].

The specificity of the PorA response as the dominant outer membrane protein and thus vaccine target, was also demonstrated by van der Voort et al. [63] and was instrumental in the development of the multivalent PorA recOMV vaccine of NVI (formerly RIVM) [29,30]. However, this vaccine and the “isogenic strains” constructed were strongly geared towards a PorA response (see comments under Section 2). Even though there can be seen substantial cross-reactive immunity in adults [15,16] there is a general view that a wtOMV vaccine needs to contain the PorA(s) representing the abundant strains circulating in a given geographical area where the proposed vaccine is intended to be used. In some countries (e.g. UK and USA) this represents a substantial problem. Strain diversity in the USA some years ago was such that more than 20 different OMVs had to be pooled in a vaccine in order to cover 80% of the strains [64]. PorA is clearly the most immuno-dominant antigen in an OMV vaccine, but the clinical importance of this is likely to be most significant among infants.

5. Immunization regimens and duration of immunity

Originally, in Cuba and Norway a two-dose primary immunization schedule was used, with 6 weeks (6–8 weeks for the Cuban trial) between the first and the second dose [11,12]. The study of Tapero et al. in Santiago, Chile [15] indicated a higher and somewhat broader immune response after three doses compared with two doses. Later a three-dose primary immunization schedule has been used in clinical trials undertaken by NIPH and Chiron (later Novartis) and proven beneficial [65]. Immunogenicity studies among infants and children in New Zealand also showed the beneficial effect of including a third dose in the primary immunization series (0–6–12 week regimen). For these infants a fourth dose of MenNZB vaccine at 10 months of age (4 months after the primary three dose course) was introduced to elicit a booster response. This increased the percentage of SBA responders from 48% post-third dose to 69% post fourth vaccine dose [59].

For OMV vaccines a fairly rapid decline of bactericidal antibodies after the primary immunization has been reported [52,59]. For Norway and New Zealand it was concluded that a booster at 10–12 months after the primary immunization might in some cases be necessary if protective immunity was to be maintained for a longer period of time [16,59]. In New Zealand a fourth dose of MenNZB was given to the infants who had received three doses of vaccine at <6 months of age [58]. In Cuba, where the OMV vaccine VA-MENGOC-BC has been included in the childhood immunization program since 1991, two doses at 3 and 5 months of age have been judged sufficient [11,66]. Since the protection trial and inclusion of the VA-MENINGOC-BC vaccine to the routine immunization programme in Cuba the incidence of meningococcal disease has continued to be low. The incidence rate of meningococcal disease in Cuba (cases per 100,000) was 0.11 in 2007, with 75% of the strains being B: 4: P1.15 and 25% B: 7: NST. In 2008 the incidence rate was down to 0.08 (personal communication, Epidemiology Office, the Cuban Ministry of Health).

In very young infants (6 weeks of age) data from clinical trials suggest that the immune response after three doses is good, but that a fourth dose at 10 months of age is necessary to elicit a similar response as that seen in older infants (6 months and older). In toddlers, the use of a fourth dose 11–16 months after the administration of the third dose elicited an excellent immune response [59]. The latter result demonstrated that the immune response of previously vaccinated children can be boosted with an additional dose later in life. Data from the ongoing surveillance in New Zealand might show us if a more widespread use of a booster dose will be required in order to control the epidemic for longer period of time.

Recently an epidemiological study for the meningococcal situation in New Zealand was made available [67]. The incidence rate of epidemic strain meningitis was down to 2.6 per 100,000. This is a major improvement from the peak in 2001 of 17.4, or 14.5 for 2003. However, an incidence rate of 2.6 is still 1.7 times higher than the pre-epidemic level of 1.6 in 1990 [68]. In view of this and the fact that the epidemic strain still circulates in the New Zealand population, the question remains as to whether the decision of the New Zealand government to cease the vaccination programme from July 2008 was appropriate [69,70].

As all major public health interventions and large vaccination trials/roll-outs, the introduction of the OMV vaccine in New Zealand to control the outbreak from 1991, has been critically judged and commented. Among the critics, some have questioned the vaccine effectiveness, in particular among the youngest children. Doubts have also been raised about the actual contribution of the vaccine in the marked decline of the epidemic [70,71].

The OMV vaccination campaign in New Zealand included over 3 million doses administered and achieved an over all coverage of 80% [57,72]. The vaccine coverage varied somewhat by age group, ethnicity and over time and in the age group under five years 76% received the three dose primary immunization (R. Arnold and C. Kelly, report to the New Zealand Ministry of Health, in preparation). A number of studies provide consistent evidence that the MenNZB had a significant effect. The phase I and II studies showed good immunogenicity, with indication of a beneficial booster dose for the youngest children about 1 year after the primary immunization [55,56]. The statistical model published by Kelly et al. [57], and the observational cohort study by Galloway et al. [58] give clear evidence that the vaccine made a substantial impact (see below). Accurate disease surveillance data including strain confirmation have been vital for the evaluation of the effectiveness of the MenNZB vaccine in combating the meningococcal disease epidemic in New Zealand. The peak year for disease incidence occurred in 2001 when 80% (370/462) of confirmed cases were the epidemic strain type (B:4:P1.7-2,4) and the rate of disease caused by all meningococci was 17.4/100,000 [67]. That same year the decision was made to

obtain a vaccine for epidemic control (MeNZB) [14,54]. Provisional data for 2008 shows that 110 confirmed cases of meningococcal disease were notified, of which 44 (40%) were the epidemic strain and of those 44 cases, 30 (68%) were less than 20 years of age, and 23/44 (52%) were aged <5 years of age.

6. Estimates of efficacy and effectiveness

For wtOMV vaccines it is only the efficacy estimates from the clinical trials in Cuba and Norway that is based on “double-blind-placebo-controlled-randomized trials”. As stated in section 3 the point estimates were presented as 87% and 57% for the Cuban- and the Norwegian vaccine, respectively [11,12]. It is however, important to keep in mind that the observation periods were 16 months in the Cuban study and 29 months in the Norwegian situation. Moreover, when the Norwegian data was re-evaluated, the point estimate at 10 months was 87% [52]. Another important issue to bear in mind regarding these large studies; is the numbers of cases that in the end are included are relatively few. Thus, the confidence intervals are wide [52].

Since no phase III clinical trial data are available from the New Zealand experience, no direct efficacy calculation is available. A planned case–control study was stopped due to the rapid decline of the epidemic and the understanding that there were too few cases to for a statistically significant vaccine effect to be detected [71].

Lacking efficacy determination; two distinct approaches for determining vaccine effectiveness have been carried out [57,58,72], and have yielded consistent estimates. In one study of a cohort of children under the age of 5 years found a vaccine effectiveness estimate of 80% (95% CI 53–92%) using data from a 2-year period [58]. In the other approach a Poisson regression model was used, incorporating additional risk factors known to be correlated with disease rates (ethnicity, socio-economic status and region). This analysis, which also used 2 years of data from the period when the vaccination programme was running (as well as a reference period of 3.5 years prior) found an overall effectiveness of 73% (95% CI = 52–85%) for all ages [57]. The staggered rollout of the vaccine across the country meant that the vaccine effectiveness was possible to estimate even though there was an overall background decline in the New Zealand epidemic during the vaccination campaign. At any time during the campaign there were vaccinated and unvaccinated populations between which disease rates could be compared. A re-analysis including a further 1.5 years of vaccine campaign data found an overall vaccine effectiveness of 69% (95% CI = 54–79%), consistent with other estimates [72]. Neither of these analyses had sufficient statistical power to detect the expected variation in effectiveness with age. No evidence was found for an effect of partial vaccination (receipt of less than the three doses in the MeNZB vaccine regimen), and no evidence was found of a waning of protection after 12 months [72].

The study showed that the immune response in vaccinated children led to a good and lasting effectiveness of the vaccine. Compared with unvaccinated children, fully vaccinated children were 5–6 times less likely to contract meningococcal disease (caused by the epidemic-/vaccine strain) in the 24 months after they were immunized. This corresponds to an estimated vaccine effectiveness of 80% for children aged 6 months to <5 years and 85% for children aged 6 months to <3 years [58].

7. Reactogenicity and safety

OMV vaccines have been used in various ways since the 1980's and the safety records are substantial. The NIPH vaccine (MenBvac) has been used in more than 400,000 doses, the formulation for New Zealand, MeNZB has been used in more than 3 million doses and the VA-MENGOC-BC from Finlay Institute, Havana has been used

in more than 55 million doses in different parts of Latin-America and to a small extent in Europe [66]. The Hib-conjugate vaccine PedvaxHIB with the “Meningococcal Outer Membrane Complex” used as carrier has been licensed globally from the mid 1990's. In the United States only more than 28 million doses have been used over the last 15 years (www.merckvaccines.com) and many million doses more have been distributed to other parts of the world.

The OMV vaccines can be classified as moderately reactogenic. Quite many local reactions are experienced, like pain at the injection site, swelling and sore arms. Of systemic reactions, fever, headache and irritability are often reported. Systematic reactogenicity and safety studies have mostly been published for MenBvac and MeNZB [59,73]. The most pronounced adverse reaction in adults being pain/tenderness and among smaller children and infants the incidence of fever is highest [73]. The reported fever was mild to moderate in intensity, abated within 48 h and did not necessitate medical consultation. Furthermore, the concomitant administration of MeNZB and routine immunizations in New Zealand did not result in an additional burden with regard to reactogenicity, compared with the vaccines conventionally used in the routine childhood vaccination schedule [59]. Regarding the local pain, in particular experienced by the older age groups, it is worth noting that this was nearly as high in the placebo group (adjuvant only) [56]. Thus, this feature is mostly attributed to the Al-hydroxide [56]. The conclusion is that the OMV vaccines are regarded as tolerable and safe to use in all age groups. MenBvac has been used in 28 clinical trials, of which 20 have been undertaken in Norway and the others in Iceland, Chile, USA, New Zealand and the UK. For all trials the documentation has been evaluated by national and international regulatory authorities. It is also currently being used for epidemic control in the Normandy-area in France [74].

During the recent experience with the use of MeNZB in New Zealand an extensive “post marketing safety monitoring” was undertaken [75]. An independent safety monitoring board oversaw the intensive safety monitoring, which included hospital surveillance, health professional reporting (passive and active) and mortality monitoring. With over three million doses administered to individuals aged below 20 years, the monitoring results provide consistent evidence supporting the vaccine's safety. In order to detect possible unexpected adverse events, occurring in connection with the use of MeNZB, an “Intensive Vaccines Monitoring Programme” was established, which prospectively collected data electronically on a cohort of children across New Zealand [76]. In addition to the safety monitoring three defined studies have been performed. One study evaluated the risk of bronchiolitis [77] and another was concerned with simple febrile seizures following the administration of MeNZB [78]. The third study looked at an eventual relation between the OMV vaccine and the increased risk of Henoch-Schönlein purpura [79]. All three of these specific studies concluded with no increase in the relative risk of the defined pathological condition following vaccination.

As presented above, OMV vaccines have been used extensively for a number of years. Performing large clinical trials involving several 100,000 individuals, introducing a vaccine in campaigns for millions of individuals or for routine use, represent an additional challenge regarding rare diseases and adverse events that coincide with the vaccination event. There might be a possible causality with the vaccine or only a time relation. The probable explanation in most cases is pure statistical coincidence. However, often the relation and a possible causality must be discussed. This has been the situation with MenBvac in Norway [80]. During the clinical trials from 1988 to 1991 four cases of serious inflammatory- or demyelinating neurological diseases were reported within 56 days after vaccination among the participants receiving the active vaccine [80]. These reports led to a thorough epidemiological follow-up

study on a cohort of 345,000 people born between 1972 and 1977 and living in Norway during the trial years. Of these 144,000 received at least one dose of MenBvac. The total observation period was 3.5 years, and during that period a total of 57 cases of serious demyelinating and inflammatory neurological diseases were registered. It was only the earlier mentioned four cases that appeared during the first 56 days following vaccination. Thus, confirming that the passive reporting system of the trial had been able to pick up on all cases of serious neurological events. Based on these figures and the observation time for vaccinated and non-vaccinated students, there could not be found any statistically significant increased risk of demyelinating and inflammatory diseases in the first 8 weeks following immunization [73,80].

A number of years later a concern was raised among patients, parents and media that MenBvac may have contributed to the development of myalgic encephalomyelitis (ME) or the chronic fatigue syndrome (CFS) in many subjects, either acutely after a time lag of several years or with a chronic, slowly progressive disease course. A case–control study was performed and no statistical significant association between vaccination of teenagers with MenBvac and occurrence of CFS/ME could be observed [81]. The adjusted odds ratio for CFS/ME was 1.06 (95% CI = 0.67–1.66%) for subjects who received the active vaccine contrasted to subject who did not [81]. One strong association that was found through this study though, was between infectious mononucleosis and CFS/ME (10.4% of patients reported mononucleosis at approximately the same time as CFS/ME occurred). The recent study concludes that the causal nature of CFS/ME remains enigmatic, but using the case–control design and the sample size available no strong association could be found between receiving MenBvac as teenager and later developing CFS/ME [81].

8. Potentials for development and future use

The OMV-type vaccine has clearly shown to be suitable for epidemic control and to be used in localised clonal outbreaks. It is also realistic to make a mixture of two (or perhaps even four) OMVs, representing different serosubtypes (PorA variants). Since important hyper-endemic and epidemic serogroup B strains change rather slowly over time (10–20 years), there might be feasible and commercially acceptable to make such formulations for one or more geographical regions [20,82]. If the manufacturing process is designed sufficiently robust for various meningococcal strains, there might be anticipated that the manufacturing process could be licensed, not each individual product [20]. This concept has some similarities to the influenza virus vaccine, where the vaccine production strain may be changed as needed (not every year, but for OMV vaccines rather from decade to decade), depending on the epidemiological situation.

The New Zealand undertaking has been successful regarding the control of the epidemic. Although with a stop in vaccine use, continued monitoring of incidence rates for the epidemic strain will be crucial [58,72]. If a similar epidemic appears in the foreseeable future, then such a public health intervention might well be used again. Currently, an analogous activity is ongoing in the region of Normandy, France (personal communication Geir Stene-Larsen, CEO of NIPH, Oslo) [74].

It is also worth noting that strains from serogroup A and W-135 meningococcal outbreaks in Africa are clonal and have limited antigenic variability. An interesting expansion of the wtOMV vaccine concept is therefore to apply it for control of meningococcal epidemics in Africa. Pre-clinical studies with such vaccines at NIPH have shown promising results [83,84].

For leading vaccine manufacturers it is more attractive to go for formulations of universal- or global utility. In such a context

it is interesting to note that the OMV vaccine recently used in New Zealand (“MeNZB”) has been included in such a MenB vaccine (providing broad coverage against serogroup B meningococcus), currently in phase III trials [82,85,86].

The future for the “OMV-concept” might well be the approach of using the OMV formulation as a “platform” for presenting added, or over-expressed minor, conserved antigens that induce cross-protective immunity. For example, it will be interesting to follow the two different groups in USA that already have presented promising results by the latter approach (one group led by Dan Granoff and the other by Wendell D. Zollinger) [39–42].

9. Concluding remarks

The concept of OMV vaccines is not “cutting edge”, sophisticated or refined vaccinology. It harbours a number of “crude features” since being developed in the 1970. They are complex formulations and challenging to manufacture. However, they have a long standing track- and safety record. Of particular importance is the substantial safety and effectiveness documentation that have been made available through a number of important studies [11,12,15,56–58,75,81]. It is also encouraging that the collaboration in New Zealand (between governmental institutions, ESR and NIPH, New Zealand Ministry of Health and private industry, Chiron/Novartis Vaccines) showed that an OMV vaccine can be up-scaled and adjusted to modern industrial scale and standards of quality, consistency and economy.

There is good reason to believe that in the coming few years a number of cross-protective and “universal” antigens will be included in vaccines against serogroup B meningococcal disease and that we will have a global vaccine strategy that can offer protection of susceptible individuals against all the relevant serogroups of meningococcal disease.

Acknowledgements

Elisabeth Wedege, Hanne Nøkleby and Dan Granoff are all thanked for helpful comments to the different versions of the manuscript. Ellen Namork and Audun Aase have made the original illustrations used in Fig. 1 and they are thanked for generously accepting the present use.

Disclosed conflicts of interest: JH: Consultant (Wyeth Vaccines Research, Novartis Vaccines and Diagnostics); Advisor (WHO, PAHO). DM: The New Zealand seroprevalence study and laboratory serum antibody analyses of MeNZB vaccine responses were indirectly funded through a joint contract with the New Zealand Ministry of Health and Novartis Vaccines. New Zealand isolates have been provided to Novartis. The Institute of Environmental Science and Research has provided New Zealand isolates to Wyeth Vaccines Research and undertaken some ELISA testing. PO: Employee of Novartis Vaccines and Diagnostics. RA, CCH, JOH, ER: no potential conflicts of interest.

References

- [1] Trotter CL, Gay NJ, Edmunds WJ. The natural history of meningococcal carriage and disease. *Epidemiol Infect* 2006;134(3):556–66.
- [2] Caugant DA, Høiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* 1994;32(2):323–30.
- [3] Granoff DM, Harrison LH, Borrow R. Meningococcal vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. fifth edition Philadelphia: WB Saunders; 2008. p. 399–434 [chapter 19].
- [4] Anonymous. Control of epidemic meningococcal disease. In: WHO practical guidelines. 2nd edition World Health Organization; 1998.
- [5] Snape MD, Perrett KP, Ford KJ, John TM, Pace D, Yu L-M, et al. Immunogenicity of a tetravalent meningococcal glycoconjugate vaccine in infants: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299(2):173–84.

- [6] Finne J, Leinonen M, Mäkelä PH. Antigenic similarities between brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet* 1983;2(8346):355–7.
- [7] Miller E, Salisbury D, Ramsay M. Planning, registration and implementation of an immunisation campaign against meningococcal serogroup C disease in the UK: a success story. *Vaccine* 2001;20(Suppl 1):S58–67.
- [8] Rosenstein NE, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001;344(18):1378–88.
- [9] Sharip A, Sorvillo F, Redelings MD, Masola L, Wise M, Nguyen DM. Population-based analysis of meningococcal disease mortality in the United States: 1990–2002. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(3):191–4.
- [10] Trotter CL, Chandra M, Cano R, Larrauri A, Ramsay ME, Brehony C, et al. A surveillance network for meningococcal disease in Europe. *FEMS Microbiol Rev* 2007;31(1):27–36.
- [11] Sierra GVG, Campa HC, Varacel NM, Garcia 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(2):195–207. Discussion 208–10.
- [12] Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen Ø, Holst Fredriksen J, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against serogroup B meningococcal disease in Norway. *Lancet* 1991;338(8775):1093–6.
- [13] Martin DR, Walker SJ, Baker MG, Lennon DR. New Zealand epidemic of meningococcal disease identified by a strain with phenotype B:4:P1.4. *J Infect Dis* 1998;177(2):497–500.
- [14] Holst J, Aaberge IS, Oster P, Lennon D, Martin D, O'Hallahan J, et al. A 'tailor made' vaccine trialled as part of public health response to group B meningococcal epidemic in New Zealand. *Euro Surveill* 2003; 7(30), <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?>
- [15] 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(16):1520–7.
- [16] Holst J, Feiring B, Næss LM, Nordheim G, Kristiansen P, Høiby EA, et al. The concept of "tailor-made", protein-based, outer membrane vesicle vaccines against meningococcal disease. *Vaccine* 2005;23(17–18):2202–5.
- [17] Martin DR, Riiijne N, McCallum L, O'Hallahan J, Oster P. The VR2 epitope on the PorA P1.7-2.4 protein is the major target for the immune response elicited by the strain-specific Group B meningococcal vaccine MeNZB. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(4):486–91.
- [18] Helting TB, Guthorlein G, Blackkolb F, Ronneberger H. Serotype determinant protein of *Neisseria meningitidis*. Large scale preparation by direct detergent treatment of the bacterial cells. *Acta Pathol Microbiol Scand [C]* 1981;89(2):69–78.
- [19] Poolman JT. Polysaccharides and membrane vaccines. In: Mizrahi A, editor. *Bacterial vaccines*. New York: Wiley-Liss; 1990. p. 58–86.
- [20] Frasch CE, van Alphen L, Holst J, Poolman J, Rosenqvist E. Preparation of outer membrane protein vaccines against meningococcal disease. In: Pollard AJ, Maiden MCJ, editors. *Methods in molecular medicine*, vol. 66. Meningococcal disease protocols. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2001. p. 81–107 [chapter 55].
- [21] Holst Fredriksen J, Rosenqvist E, Wedege E, Bryn K, Bjune G, Frøholm LO, et al. Production, characterization and control of MenB-vaccine "Folkehelsen": an outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease. *NIPH Ann* 1991;14(2):67–79. Discussion 79–80.
- [22] Høiby EA, Rosenqvist E, Frøholm LO, Feiring B, Nøkleby H, Rønild E. Bactericidal antibodies after vaccination with the Norwegian meningococcal serogroup B outer membrane vesicle vaccine: a brief survey. *NIPH Ann* 1991;14(2):147–55. Discussion 155–6.
- [23] Rosenqvist E, Høiby EA, Bjune G, Aase A, Halstensen A, Lehmann AK, et al. Effect of aluminium hydroxide and meningococcal serogroup C capsular polysaccharide on the immunogenicity and reactivity of a group B *Neisseria meningitidis* outer membrane vesicle vaccine. In: Brown F, Haaheim LR, editors. *Modulation of the immune response to vaccine antigens*, vol. 92. Karger, Basel: Develop Biol Stand; 1998. p. 323–33.
- [24] Tsai C, Frasch CE, Rivera E, Hochstein HD. Measurement of lipopolysaccharide (endotoxin) in meningococcal protein and polysaccharide preparations for vaccine usage. *J Biol Stand* 1989;17(3):249–58.
- [25] Wheeler JX, Vipond C, Feavers I. Exploring the proteome of meningococcal outer membrane vesicle vaccines. *Proteomics Clin Appl* 2007;1(9):1198–210.
- [26] Ferrari G, Garaguso I, Adu-Bobie J, Doro F, Taddei AR, Biolchi A, et al. Outer membrane vesicles from group B *Neisseria meningitidis* Δgna33 mutant: proteomic and immunological comparison with detergent-derived outer membrane vesicles. *Proteomics* 2006;6(6):1856–66.
- [27] Uli L, Castellanos-Serra L, Betancourt L, Dominguez F, Barbera R, Sotolongo F, et al. Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B *Neisseria meningitidis*: analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* 2006;6(11):3389–99.
- [28] Vipond C, Suker J, Jones C, Tang C, Feavers IM, Wheeler JX. Proteomic analysis of meningococcal outer membrane vesicle vaccine prepared from group B strain NZ98/254. *Proteomics* 2006;6(11):3400–13.
- [29] van der Ley P, Poolman JT. Construction of a multivalent meningococcal vaccine strain based on the class 1 outer membrane protein. *Infect Immun* 1992;60(8):3156–61.
- [30] van den Dobbelaars GP, van Dijken HH, Pillai S, van Alphen L. Immunogenicity of a combination vaccine containing pneumococcal conjugates and meningococcal PorA OMVs. *Vaccine* 2007;25(13):2491–6.
- [31] Claassen I, Meylis J, van der Ley P, Peeters C, Brons H, Robert J, et al. Production, characterization and control of a *Neisseria meningitidis* hexavalent class 1 outer membrane protein containing vesicle vaccine. *Vaccine* 1996;14(10):1001–8.
- [32] Cartwright K, Morris R, Rumke H, Fox A, Borrow R, Begg N, et al. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (PorA) outer membrane proteins. *Vaccine* 1999;17(20–21):2612–9.
- [33] Liu MA, Friedman A, Oliff AI, Tai J, Martinez D, Deck RR, et al. A vaccine carrier derived from *Neisseria meningitidis* with mitogenic activity for lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(10):4633–7.
- [34] Ulmer JB, Burke CJ, Shi C, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. Pore formation and mitogenicity in blood cells by the class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. *J Biol Chem* 1992;267(27):19266–71.
- [35] Granoff DM, Anderson EL, Osterholm MT, Holmes SJ, McHugh JE, Belshe RB, et al. Differences in the immunogenicity of three *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in infants. *J Pediatr* 1992;121(2):187–94.
- [36] Einhorn MS, Weinberg GA, Anderson EI, Granoff PD, Granoff DM. Immunogenicity in infants of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide in a conjugate vaccine with *Neisseria meningitidis* outer-membrane protein. *Lancet* 1986;328(8502):299–302.
- [37] Anonymus. Liquid PedvaxHIB. Product description. Merck & Co., Inc., West Point, PA, January 2001.
- [38] Latz E, Franko J, Golenbock DT, Schreiber JR. *Haemophilus influenzae* type b outer membrane protein complex glycoconjugate vaccine induces cytokine production by engaging human toll-like receptor 2 (TLR2) and requires the presence of TLR2 for optimal immunogenicity. *J Immunol* 2004;172(4):2431–8.
- [39] Koeberling O, Welsch JA, Granoff DM. Improved immunogenicity of a H44/76 group B outer membrane vesicle vaccine with over-expressed genome-derived *Neisseria* antigen 1870. *Vaccine* 2007;25(10):1912–20.
- [40] Koeberling O, Seubert AK, Granoff DM. Bactericidal antibody responses elicited by a meningococcal outer membrane vesicle vaccine with over-expressed fHbp and genetically-attenuated endotoxin. *J Infect Dis* 2008;198(2):262–70.
- [41] Zollinger WD, Donets M, Brandt BL, Ionin B, Moran EE, Schmeil D, et al. Multivalent group B meningococcal vaccine based on native outer membrane vesicles (NOMV) has potential for providing safe, broadly protective immunity. In: van Alphen L, van den Dobbelaars G, van der Ley P, editors. Abstract volume to the 16th international pathogenic *Neisseria* conference. 2008. p. 51 [oral presentation O35].
- [42] Keiser PB, Moran EE, Schmeil DH, Pinto VB, Coster TS, Gibbs BT, et al. A phase 1 study of the safety and immunogenicity of an intramuscular group B meningococcal NOMV vaccine made from an lpxL2 and synX deleted strain. In: van Alphen L, van den Dobbelaars G, van der Ley P, editors. Abstract volume to the 16th international pathogenic *Neisseria* conference. 2008. p. 273 [poster presentation P215].
- [43] Dalseg R, Wedege E, Haugen IL, Holst J, Haneberg B. Group B meningococcal OMV vaccine as a mucosal immunogen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;76(1):S93.
- [44] Haneberg B, Dalseg R, Wedege E, Høiby EA, Haugen IL, Oftung F, et al. Intranasal administration of a meningococcal outer membrane vesicle vaccine induces persistent local mucosal antibodies and serum antibodies with strong bactericidal activity in humans. *Infect Immun* 1998;66(4):1334–41.
- [45] Haneberg B, Holst J. Can nonliving nasal vaccines be made to work? *Expert Rev Vaccines* 2002;1(2):227–32.
- [46] Katial RK, Brandt BL, Moran EE, Marks S, Agnello V, Zollinger WD. Immunogenicity and safety testing of a group B intranasal meningococcal native outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 2002;70(2):702–7.
- [47] Matsunami T, Kolmer JA. The relation of the meningococcal activity of the blood to resistance to virulent meningococci. *J Immunol* 1918;3(3):201–12.
- [48] Heist GD, Solis-Choen S, Solis-Choen M. A study of the virulence of meningococci for man and of human susceptibility to meningococci infection. *J Immunol* 1922;7(1):1–33.
- [49] Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus I. The role of humoral antibodies. *J Exp Med* 1969;129(6):1307–26.
- [50] Boslego J, Garcia J, Cruz C, Zollinger W, Brandt B, Ruiz S, et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of a meningococcal group B (15:P1.3) outer membrane protein vaccine in Iquique, Chile. *Vaccine* 1995;13(9):821–9.
- [51] de Moraes JC, Perkins BA, Camargo MCC, Hidalgo NTR, Barbosa HA, Sacchi CT, et al. Protective efficacy of a serogroup B meningococcal vaccine in Sao Paulo, Brazil. *Lancet* 1992;340(8827):1074–8.
- [52] Holst J, Feiring B, Fuglesang JE, Høiby EA, Nøkleby H, Aaberge IS, et al. Serum bactericidal activity correlates with the vaccine efficacy of outer membrane vesicle vaccines against *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* 2003;21(7–8):734–7.
- [53] O'Hallahan J, Lennon D, Oster P, Reid S, Mulholland K, Martin D. From secondary prevention to primary prevention – a unique strategy that gives hope to a country ravaged by meningococcal disease. *Vaccine* 2005;23(17–18):2205–9.
- [54] Rosenqvist E, Bjaering Hansen N, Høiby EA, Caugant DA, Holst J, Namork E, et al. Development and evaluation of experimental meningococcal B: 4: P1(7),4 outer membrane vesicle vaccine and evaluation in a mouse model. In: Nassif X, Quintin-Millet M-J, Taha M-K, editors. Abstract volume to the 11th international pathogenic *Neisseria* conference. 1998. p. 169.
- [55] Thornton V, Lennon D, Rasanathan K, O'Hallahan J, Oster P, Stewart J, et al. Safety and immunogenicity of New Zealand strain meningococcal serogroup B OMV vaccine in healthy adults: beginning of epidemic control. *Vaccine* 2006;24(9):1395–400.

- [56] Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S, Martin D. MenNZB™: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. *Vaccine* 2005;23(17–18):2191–6.
- [57] Kelly C, Arnold R, Galloway Y, O'Hallahan J. A prospective study of the effectiveness of the New Zealand meningococcal B vaccine. *Am J Epidemiol* 2007;166(7):817–23.
- [58] Galloway Y, Stehr-Green P, McNicholas A, O'Hallahan J. Use of an observational study to estimate the effectiveness of the New Zealand group B meningococcal vaccine in children aged under 5 years. *Int J Epidemiol* 2009;38(2):413–8.
- [59] Oster P, O'Hallahan J, Aaberge I, Timan S, Ypma E, Martin D. Immunogenicity and safety of a strain-specific MenB OMV vaccine delivered to under 5-year olds in New Zealand. *Vaccine* 2007;25(16):3075–9.
- [60] Rosenqvist E, Høiby EA, Wedege E, Bryn K, Kolberg J, Klem A, et al. Human antibody responses to meningococcal outer membrane antigens after three doses of the Norwegian group B meningococcal vaccine. *Infect Immun* 1995;63(12):4642–52.
- [61] Wenger JD. Serogroup B meningococcal disease. New outbreaks, new strategies [editorial]. *JAMA* 1999;281(16):1541–3.
- [62] van der Voort ER, van der Ley P, van der Biezen J, George S, Tunnela O, van Dijken H, et al. Specificity of human bactericidal antibodies against PorA P1.7 16 induced with a hexavalent meningococcal outer membrane vesicle vaccine. *Infect Immun* 1996;64(7):2745–51.
- [63] Tondella ML, Popovic T, Rosenstein NE, Lake DB, Carlone GM, Mayer LW, et al. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. The active bacterial core surveillance team. *J Clin Microbiol* 2000;38(9):3323–8.
- [64] Feiring B, Fuglesang J, Oster P, Naess LM, Helland OS, Tilman S, et al. Persisting immune responses indicating long-term protection after booster dose with meningococcal group B outer membrane vesicle vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13(7):790–6.
- [65] Sotolongo Padron F, Huergo CC, Gil VC, Diaz EMF, Valdespino IEC, Gotera NG. Cuban meningococcal BC vaccine: experience and contributions from 20 years of application. *MEDICC Rev* 2007;9(1):16–22, <http://www.medicc.org/mediccreview/articles/mr.61.pdf>.
- [66] Martin D, Lopez L. The epidemiology of meningococcal disease in New Zealand in 2007. Report prepared for the Ministry of Health by the Institute of Environmental Science and Research Ltd.; 2008. Available at [http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/pagesmh/8204/\\$File/meningo-annual-report-2007.pdf](http://www.moh.govt.nz/moh.nsf/pagesmh/8204/$File/meningo-annual-report-2007.pdf).
- [67] Martin DR, Lopez L. Has MenNZB™ controlled New Zealand's epidemic? In: van Alphen L, van den Dobbelaars G, van der Ley P, editors. Abstract volume to the 16th international pathogenic Neisseria conference. 2008. p. 79–80 [oral presentation O63].
- [68] Loring BJ, Turner N, Petousis-Harris H. MenNZB™ vaccine and epidemic control: when do you stop vaccinating? *Vaccine* 2008;26(47):5899–904.
- [69] Lennon D. The role of MenNZB vaccination in controlling the New Zealand meningococcal epidemic. *N Z Med J* 2008;121(1270):110–2, <http://www.nzma.org.nz/journal/121-1270/2965/>.
- [70] Lennon DR, Jackson C, Thornley C. Why stop MenNZB vaccination? Supporting evidence for withdrawal of epidemic strain outer membrane vesicle (OMV) vaccine in New Zealand. In: van Alphen L, van den Dobbelaars G, van der Ley P, editors. Abstract volume to the 16th international pathogenic Neisseria conference. 2008. p. 65–6 [oral presentation O49].
- [71] O'Hallahan J, McNicholas A, Galloway Y, O'Leary E, Roseveare C. Delivering a safe and effective strain specific vaccine to control an epidemic of group B meningococcal disease. *N Z Med J* 2009;122(1291):48–59, <http://www.nzma.org.nz/journal/abstract.php?id=3504>.
- [72] Nøkleby H, Aavitsland P, O'Hallahan J, Feiring B, Tilman S, Oster P. Safety review: two outer membrane vesicle (OMV) vaccines against systemic *Neisseria meningitidis* serogroup B disease. *Vaccine* 2007;25(16):3080–4.
- [73] Taha M-K, Zarantonelli ML, Alonso J-M, Naess LM, Holst J, Feiring B, et al. Use of available outer membrane vesicle vaccines to control serogroup B meningococcal outbreaks. *Vaccine* 2007;25(14):2537–8.
- [74] McNicholas A, Galloway Y, Stehr-Green P, Stewart R, Radke S, Sexton K, et al. Post-marketing safety monitoring of a new group B meningococcal vaccine in New Zealand 2004–2006. *Hum Vaccines* 2007;3(5):196–204.
- [75] Tatley MV, Kunac DL, McNicholas A, Zhou L, Ballantyne S, Ashton J, et al. The intensive vaccines monitoring programme (IVMP): an electronic system to monitor vaccine safety in New Zealand. *Vaccine* 2008;26(22):2746–52.
- [76] Stehr-Green P, Galloway Y, Kieft C, McNicholas A. The risk of bronchiolitis hospitalization following administration of a group B meningococcal vaccine in New Zealand. *N Z Med J* 2007;120(1263):1–4, <http://www.nzma.org.nz/journal/120-1263/2746/content.pdf>.
- [77] Stehr-Green P, Radke S, Kieft C, Galloway Y, McNicholas A, Reid S. The risk of simple febrile seizures after immunization with a new group B meningococcal vaccine, New Zealand. *Vaccine* 2008;26(6):739–42.
- [78] Sexton K, McNicholas A, Galloway Y, Radke S, Kieft C, Stehr-Green P, et al. Henoch-Schönlein purpura and meningococcal B vaccination. *Arch Dis Child* 2009;94(3):224–6.
- [79] Nøkleby H. Neurological adverse events of immunization: experience with an aluminium adjuvanted meningococcal B outer membrane vesicle vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2007;6(5):863–9.
- [80] Magnus P, Brubakk O, Nyland H, Wold BH, Gjessing HK, Brandt I, et al. Vaccination as teenagers against meningococcal disease and risk of chronic fatigue syndrome. *Vaccine* 2009;27(1):23–7.
- [81] Holst J. Strategies for developing universal vaccines against serogroup B meningococcal disease. *Human Vaccines* 2007;3(6):290–4.
- [82] Norheim G, Aase A, Caugant DA, Høiby EA, Fritzønn E, Tangen T, et al. Development and characterization of outer membrane vesicle vaccines against serogroup A *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2005;23(29):3762–74.
- [83] Norheim G, Fritzønn E, Kristiansen P, Tangen T, Caugant DA, Høiby EA, et al. Prevention of serogroup A, C and W135 meningococcal disease in Africa with outer membrane vesicle vaccines. In: Apicella MA, Seifert H, editors. Fourteenth international pathogenic Neisseria conference. 2004. p. 181.
- [84] Miller E, Pollard AJ, Borrow R, Findlow J, Dawson T, Morant A, et al. Safety and immunogenicity of Novartis meningococcal serogroup B vaccine (MenB vaccine) after three doses administered in infancy. Abstract to ESPID, Graz, Austria; 2008.
- [85] Feavers IM, Pizza M. Meningococcal protein antigens and vaccines. *Vaccine* 2009;27(S2):B41–9.