

**Instituto Finlay  
Dirección de Asistencia Científico-Técnica Aplicada (DACTA)  
Laboratorio de Microbiología**

***Neisseria meningitidis*: Contribución al  
transporte-conservación y caracterización de  
cepas aisladas en Cuba (1982-2002)**

**Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en  
Ciencias Médicas**

**Autora: Dra. Isabel Martínez Motas**

**Ciudad de La Habana  
2004**

**.... “los dolores que sufren los enfermos, las privaciones que experimentan, la impotencia y languidez que los postra, las angustias y congojas que atormentan su espíritu; todo exige impetuosamente la más constante y eficaz asistencia, una compasión sin límites, una afabilidad inalterable y todos los auxilios y todos los consuelos que puede dispensar la ciencia más benéfica y la sensibilidad más oficiosa. Sí, lo merecen todos los enfermos, porque todos son hombres y pertenecen a nuestra especie.”**

Dr. Tomás Romay

(Tomás Romay y el origen de la ciencia en Cuba)

**A la memoria de mi hijo Orlandito**

## **AGRADECIMIENTOS**

***A mis hijos y mi nieto, razón de mi esfuerzo cada día.***

*A mi Madre por apoyar aquel, mi sueño de entonces.*

*A Pedro, tan cerca siempre, por su paciencia y por hacerme la vida posible.*

*A Marion y Martín, por estar cerca con su apoyo y su aliento.*

*A la Revolución Cubana, por aquella oportunidad en Manzanillo.*

*A las Instituciones que me formaron después.*

*A mi asesor el Dr. Gustavo Sierra, que por su modestia, no querría aceptarlas, pero sí; Muchas Gracias Gustavo, de todo corazón.*

*Al Dr. Eddy Caro, Dr. Franklin Sotolongo, Dr. Rolando Ochoa, Dra. Rosa L. Solís, Dr. Oliver Pérez, Dra. Clara Savón, Dr. Anselmo Otero, Dra. Teresa Sánchez, Lic. Mayelin Solís, Lic. Luís Izquierdo, Dr. Armando Acosta, Dra. Ma. Elena Sarmiento y Dr. Ernesto Montoro a todos Uds., por la ayuda que siempre me brindaron, lo cerca que han estado de mí y estarán.*

*A la Dra. Alina Llop y Dra. Nereyda Cantelar por sus enseñanzas.*

*A la Dra. Sara Palma, por su entrañable amistad.*

*A la Lic. Maribel Chao, por sus orientaciones.*

*A todos mis compañeros del IPK, de tantos años y tantas enseñanzas.*

*A quienes sin ellos, estos resultados de hoy no serían posibles: Mis queridos compañeros del Instituto Finlay: Mercy, Teresita, Niury, Yanet, Ma. Amalia, Aída, Dairis, Elio, Virginia, Carolina, Enrique, Carmita, Domingo...., en fin a todos y cada uno de los que, en un determinado momento tuvieron una palabra de aliento para mi durante la realización de esta tesis, **MUCHAS GRACIAS.***

*Sin la amistad el mundo es un desierto.*

*F. Bacon.*

## SÍNTESIS

Con el objetivo de profundizar en los aspectos microbiológicos y epidemiológicos relacionados con las cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante 20 años (1982-2002), se realizó este trabajo. Se obtuvo un medio de cultivo útil para el transporte-conservación de cepas aisladas en Cuba y otros países. El Medio TC con líquido ascítico, mostró porcentajes de viabilidad aceptables durante un período de 6 meses y después de 12 años de almacenamiento a la temperatura de 20-25<sup>0</sup>C, se recuperó el 14,1% de las cepas conservadas en él. Se identificaron los marcadores epidemiológicos (serogrupos, serotipos, subtipos e inmunotipos) de 728 cepas de enfermos y portadores, correspondientes a dos etapas: 1982-1992 (etapa epidémica) y 1993-2002 (etapa post-epidémica). En los aislamientos de la etapa epidémica, tanto en las cepas de enfermos (96,77%) como en las de los portadores (67,30%), predominó el serogrupo B, mientras que el C, sólo se identificó en un número reducido de casos clínicos (1,43%). En esta etapa, prevaleció el fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 (60,84%); el 65,60% correspondió a cepas invasivas y el 48,08% a portadores; el resto de las asociaciones fenotípicas fueron diversas. En la etapa post-epidémica, el 100% de las cepas de enfermos resultaron B. Sin embargo, entre los portadores de esta misma etapa, prevalecieron las no agrupables (70,77%). El fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 (74,34%) sobresalió nuevamente entre los aislamientos de enfermos de la etapa post-epidémica, no así entre los portadores, grupo donde predominó la asociación NA:NT:P1:NST: L3,7,9 (18,46%). Además, en enfermos y portadores, existió una mayor diversidad de agrupaciones fenotípicas. Se demostró el predominio del complejo ET-5 (67%), entre las 91 cepas de enfermos de la epidemia, vinculado principalmente al fenotipo B:4:P1.15 (62,6%). Se determinó la sensibilidad antimicrobiana frente a la penicilina de 283 cepas de enfermos y portadores aisladas en ambos períodos. Predominaron las cepas sensibles (87,27%) y no hubo aislamientos resistentes, aunque el 12,73% mostró sensibilidad disminuida. Los resultados obtenidos aportan datos de valor al estudio, prevención y control exitoso de la enfermedad meningocócica en Cuba durante el período investigado, así como al desarrollo y evaluación de la vacuna cubana contra *N. meningitidis* B y C (VA-MENGOC-BC®).



3.5.3.2	Producción de catalasa.	43
3.5.3.3	Detección de la actividad $\gamma$ Glutamil- aminopectidasa.	43
3.5.3.4	Detección de la actividad $\beta$ -Galactosidasa.	44
3.5.3.5	Detección de lipasa.	44
3.5.3.6	Detección de DNasa.	44
3.5.3.7	Producción de polisacárido en medio con 5% de sacarosa.	44
3.5.3.8	Utilización de carbohidratos.	44
3.5.3.9	Seroagrupamiento de cepas de <i>N. meningitidis</i> .	45
3.5.3.10	Determinación de sero/subtipos e inmunotipos.	45
3.5.3.11	Criterios de identificación de cepas de <i>N. meningitidis</i> .	45
3.5.3.12	Análisis estadístico de la caracterización fenotípica.	46
3.6	Determinación del tipo electroforético (ET) por electroforesis de enzima multilocus (EEM).	46
3.6.1	Cepas estudiadas por EEM.	46
3.6.2	Estudio del polimorfismo enzimático. Enzimas investigadas.	46
3.6.3	Preparación de los extractos enzimáticos.	46
3.6.4	Electroforesis en geles de almidón.	47
3.6.5	Tinción específica de las enzimas.	47
3.6.6	Lectura de los geles.	47
3.6.7	Análisis estadístico de los resultados de la EEM.	47
3.7	Sensibilidad a la penicilina.	48
3.7.1	Cepas de <i>N. meningitidis</i> estudiadas.	48
3.7.2	Método de sensibilidad antimicrobiana a la penicilina.	48
3.7.3	Determinación de la CMI.	48
3.7.4	Criterios de interpretación de la CMI.	49
3.7.5	Análisis estadístico de la sensibilidad a la penicilina.	49
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	50
4.1	Medio TC	50
4.2	Caracterización fenotípica	52
4.3	Caracterización por EEM.	60
4.4	Sensibilidad a la penicilina.	64
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	72
5.1	Medio TC.	72
5.2	Caracterización fenotípica.	75
5.2.1	Distribución de <i>N. meningitidis</i> en enfermos y portadores de la etapa epidémica, según serogrupos.	75
5.2.2	Distribución de <i>N. meningitidis</i> en enfermos y portadores de la etapa epidémica, según sero/subtipos inmunotipos y fenotipos.	77
5.2.3	Distribución de <i>N. meningitidis</i> en enfermos y portadores de la etapa post-epidémica, según serogrupos.	80
5.2.4	Distribución de <i>N. meningitidis</i> en enfermos y portadores de la etapa post-epidémica, según sero/subtipos, inmunotipos y fenotipos.	83
5.2.5	Sero/subtipos y ET de <i>N. meningitidis</i> serogrupo B estudiadas por EEM.	87
5.3	Sensibilidad a la penicilina de cepas de <i>N. meningitidis</i> .	89
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	96

<b>7-RECOMENDACIONES</b>	97
<b>8- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	98
<b>ANEXOS</b>	141

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AC:	Anticuerpo (s)	LOS:	Lipooligosacárido (s)
ACH:	Agar Chocolate	MC:	Meningococemia
AcM:	Anticuerpo monoclonal (s)	MD:	Medio Dorset
ACO:	Aconitasa	ME:	Enzima Máfica
ADA:	Agar Dextrosa Almidón	MINSAP:	Ministerio de Salud Pública
ADH:	Alcohol Deshidrogenasa	MLST:	Multilocus Sequence Typing
ADK:	Adenilato Kinasa	MM:	Meningoencefalitis meningocócica
ADN:	Ácido Desoxirribonucleico	NA:	No agrupable
Ag:	Antígeno (s)	NADP:	Fosfato de di-nucleótido de nicotinamida adenina
ALK:	Fosfatasa alcalina	NCCLS:	Normas Comité Nacional de Estándares del Laboratorio Clínico
AMHSB:	Agar Mueller Hinton y suero bovino	NIBSC:	Instituto Nacional para Control Biológico y Estándares del Reino Unido
AMHSC:	Agar Mueller Hinton y sangre carnero	NIT:	No inmunotipable
AMHSN:	Agar Mueller Hinton y suplemento Nm	NST:	No subtipable
BHE:	Barrera hematoencefálica	NT:	No tipable
CID:	Coagulación intravascular diseminada	OMS:	Organización Mundial de la Salud
CMI:	Concentración mínima inhibitoria	ONPG:	Ortonitrofenil $\beta$ -D-galactopiranosido
CNIC:	Centro Nacional Investigaciones Científicas	PBP:	Proteínas fijadoras de penicilina
CTA:	Cistina Tripticasa Agar	PBS:	Tampón fosfato
ECP:	Electroforesis campo pulsado.	PC:	Polisacárido capsular
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético	PCR-A:	Reacción en cadena de la polimerasa- arbitraria
EEE:	Enfermos etapa epidémica	PEE:	Portadores etapa epidémica
EEM:	Electroforesis de enzima multilocus	PEP:	Peptidasas
EEPE:	Enfermos etapa post-epidémica	PEPE:	Portadores etapa post-epidémica
EM:	Enfermedad meningocócica	PME:	Proteínas de membrana externa
ET:	Tipo electroforético	RFLP:	Ampliación de fragmentos polimórficos al azar.
FUM:	Fumarasa	RIVM:	Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente de Holanda
GD2:	Glutamato Deshidrogenasa-NADP	RV:	Región (s) variable (s)
GDI:	Glutamato Deshidrogenasa-NAD	SD:	Sensibilidad disminuida
GGP:	Enzima Glucosa 6-fosfato	SDS-PAGE:	Electroforesis en geles de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio
HCl:	Ácido clorhídrico	SSTF:	Solución salina tampón fosfato
IDH:	Isocitrato Deshidrogenasa	ST:	Secuencia tipo
IP2:	Indofenol Oxidasa 2	TC:	Transporte-conservación
IPI:	Indofenol Oxidasa	Tf:	Transferrina
IRA:	Infección respiratoria aguda	TGV:	Transporte Gérmenes Vivos
LA:	Líquido ascítico	TRS:	Tracto Respiratorio Superior
LCR:	Líquido cefalorraquídeo	UDH:	Deshidrogenasa desconocida
Lf:	Lactoferrina	UFC:	Unidades formadoras de colonias
LNRM:	Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo	VCN:	Vancomicina, colistina, nistatina

## **1 INTRODUCCIÓN**

**1. INTRODUCCIÓN** Después de transcurrir casi 200 años de investigación sobre el comportamiento de la enfermedad meningocócica (EM), esta entidad clínica aún constituye un problema de salud para muchos países y provoca gran interés entre los profesionales de la salud y en la población general, por afectar fundamentalmente a la población infantil, por la gravedad de su cuadro clínico, evolución severa, elevado número de muertes y secuelas invalidantes (Vázquez, 2002; Daley, 2003).

Su agente etiológico, *Neisseria meningitidis*, habita de forma natural las membranas mucosas de la nasofaringe humana, sin provocar, en la mayoría de los casos, signos clínicos evidentes de infección (Vázquez, 2000). En períodos no epidémicos, del 5-10% de la población puede ser portadora asintomática y constituir un elemento crucial en su diseminación (Aceitero, 2000). Una minoría de la población colonizada puede desarrollar alguna de las dos principales manifestaciones clínicas: la meningoencefalitis meningocócica (MM) y la meningococemia (MC) (Schoeller y Schmutzhard., 2001; Duke y cols; 2003). La elevada morbi-mortalidad y temibles secuelas obliga a tomar medidas coordinadas para evitar y controlar la diseminación de brotes y epidemias. Para cumplimentar este objetivo es importante disponer, en primer lugar, de una rápida y certera capacidad de diagnóstico sobre la base de una identificación primaria del agente causal, lo que permite tomar acciones inmediatas y en segundo lugar, y con la misma prioridad, la caracterización de las cepas sobre la base de sus marcadores epidemiológicos resulta imprescindible para trazar una política adecuada de prevención, donde la vacunación ocupa un lugar inaplazable (Pollard y Frasch., 2001; Vázquez, 2002).

La caracterización fenotípica sobre la base de sus marcadores epidemiológicos resulta un objetivo fundamental en las investigaciones dirigidas al estudio de las cepas de *N. meningitidis* circulantes (Tondella y cols., 2000; Tzanakaki y cols., 2001). Entre éstos tenemos al serogrupo, serotipo, subtipo e inmunotipo. Inicialmente, la identificación del polisacárido capsular (PC) permitió la clasificación de *N. meningitidis* en serogrupos; posteriormente, el estudio de sus proteínas de membrana externa (PME) y diferencias estructurales de sus lipooligosacáridos (LOS), posibilitaron la caracterización de los sero/subtipos e inmunotipos respectivamente (Frasch y cols, 1985).

El desarrollo actual de la epidemiología molecular constituye un arma poderosa para el estudio de brotes y epidemias. La aplicación de estos nuevos métodos posibilita detectar diferencias genéticas entre las cepas aisladas y al mismo tiempo, incrementan la información que ofrecen los métodos fenotípicos (Caugant, 1998; Tzanakaki y cols., 2001; Vázquez y Berrón, 2004). Entre los métodos moleculares, los estudios de polimorfismo enzimático brindan una valiosa información sobre la base de una matriz completa de relaciones entre la diferente movilidad electroforética de un grupo de enzimas citoplasmáticas que se relacionan de manera directa con la variación de sus respectivos

genes estructurales (Caugant, 1998). Recientemente, basado en la secuenciación de genes estructurales y virulentos, se propone un nuevo esquema de identificación bacteriana conocido con las siglas MLST del inglés “multilocus sequence typing”, que establece las relaciones genéticas entre las cepas e identifica miembros de linajes hipervirulentos. Además de proporcionar un valioso sistema de caracterización e identificación entre clones bacterianos, posee como ventajas adicionales, la posibilidad de trabajar con material no infeccioso distribuido por correo y comparar por Internet los resultados entre diferentes laboratorios (Maiden y cols., 1998; Vázquez y Berrón, 2004).

Si importantes son los esfuerzos destinados a disminuir la incidencia de la EM e identificar las cepas circulantes, relevantes y necesarios son también los que se dirigen hacia la vigilancia del comportamiento de *N. meningitidis* frente a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento y la profilaxis de esta enfermedad (Arreaza y cols., 2000<sup>a</sup>). Entre los marcadores epidemiológicos se señalan también la resistencia a la sulfadiacina sódica y sensibilidad disminuida (SD) a la penicilina (Oppenheim, 1997; Sáez-Nieto y Vázquez, 1997; Vázquez, 2001).

Aunque la resistencia a la sulfadiacina se detectó desde los años 50, la primera evidencia de fallo clínico ocurrió en 1963 (Millar y cols., 1963). A partir de ese momento, aumentó en todo el mundo, el aislamiento de cepas resistentes vinculadas a brotes y epidemias (Oppenheim, 1997). A esta problemática, se añadió en 1985 la emergencia de cepas con SD a la penicilina, antimicrobiano de elección en la terapéutica de la EM. La prevalencia de cepas con estas características varía en diferentes regiones del mundo, pero hasta la fecha, España reporta los porcentajes más altos de aislamiento (Sáez-Nieto y Vázquez, 1997; Arreaza y cols., 2000<sup>a</sup>). Se describen también cepas de *N. meningitidis* resistentes a la tetraciclina, rifampicina y recientemente notifican en Vietnam y Francia, aislamientos resistentes al cloranfenicol (Oppenheim, 1997; Galimand y cols., 1998; Shultz y cols., 2003).

El desarrollo de la epidemia de EM en Cuba, constituyó el principal problema de salud en la década del 80 y condujo a investigaciones encaminadas a obtener una vacuna eficaz para la prevención y el control de esta entidad clínica. Entre las medidas tomadas, la creación del nuevo Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo (LNRM) en 1983 (Valcárcel y cols., 1991), permitió iniciar las investigaciones microbiológicas necesarias para seleccionar la cepa representativa de la epidemia cubana. Además, por la importancia de la conservación de las cepas de *N. meningitidis* y como parte de la vigilancia epidemiológica, se trabajó también en la obtención de un medio de transporte-conservación que posibilitara el envío sistemático de la mayoría de las cepas aisladas en el país. La selección de la cepa vacunal resultó un elemento crucial en el desarrollo y obtención de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> (Sierra y cols., 1991; Pérez y cols.; 2003). Gracias al conjunto de estas medidas

y específicamente al empleo masivo y programado de esta vacuna, la EM no constituye actualmente un problema de salud en Cuba, sólo se presenta en casos aislados.

El diagnóstico y la caracterización de cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores, junto a los estudios de resistencia antimicrobiana, aportan una valiosa información al conocimiento de la dinámica de la EM en todo el mundo. Además, disponer de un mejor diagnóstico e identificación, proporciona datos importantes para el enfoque de nuevas estrategias de producción y el mejoramiento de preparados vacunales contra este microorganismo. Se obtiene así, un mejor conocimiento de la dinámica epidemiológica de las cepas circulantes, para en caso necesario, valorar alternativas en la incorporación de nuevos antígenos que respondan a las cepas prevalentes (Vázquez, 2002).

Existen aún problemas en el mundo acerca del conocimiento, diagnóstico, prevención, control y tratamiento de la EM. Entre éstos se encuentran: la sensibilidad de 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. Sobre la base de los antecedentes y problemática descrita anteriormente se postula la siguiente **HIPÓTESIS: La caracterización de las cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de enfermos y portadores, brindará datos valiosos para el conocimiento y control de la enfermedad meningocócica tanto en la etapa epidémica como post-epidémica. La obtención de un novedoso medio de conservación y transporte, permitirá una elevada recuperación de estas cepas y hará posible dicha caracterización**

Para confirmar esta hipótesis, los objetivos trazados fueron los siguientes:

**OBJETIVO GENERAL:** Contribuir al mejor conocimiento y caracterización de cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba durante un período de veinte años (1982-2002).

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Obtener un medio de transporte y conservación (TC) que permita una mayor viabilidad, recuperación y caracterización de cepas de *N. meningitidis* remitidas por los Laboratorios de Microbiología de Cuba y de otros países.
- Identificar los marcadores epidemiológicos (serogrupo, serotipo, subtipo, inmunotipo), en cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante un período de 20 años.
- Determinar el tipo electroforético (ET) mediante electroforesis de enzimas multilocus (EEM) y su asociación con otros marcadores epidemiológicos en cepas de *N. meningitidis* aisladas durante la epidemia.

- Identificar los patrones de sensibilidad frente a la penicilina de cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores en la etapa epidémica y post-epidémica.

El presente trabajo contiene los siguientes aspectos que constituyen **NOVEDAD CIENTÍFICA**:

- Se obtuvo por primera vez en Cuba y se patentó, un medio de cultivo que permitió el transporte y la conservación de *N. meningitidis*. Su disponibilidad permite el intercambio de cepas y la colaboración de Cuba con otros países.
- La caracterización fenotípica de cepas aisladas de enfermos y portadores en la etapa epidémica y post-epidémica, posibilitó identificar los marcadores epidemiológicos de *N. meningitidis* durante 20 años. Estos resultados aportan datos de extraordinario valor epidemiológico y permiten establecer la historia microbiológica de las cepas circulantes en Cuba en este período.
- El presente trabajo, en la etapa correspondiente, contribuyó a sentar las bases para la selección de la cepa vacunal (cepa con la cual se elaboró la vacuna VA-MENGOC-BC®).
- En la etapa post-epidémica, constituye uno de los elementos fundamentales para la evaluación del impacto de la vacuna cubana antimeningocócica BC (VA-MENGOC-BC®).
- Se aplicó por primera vez en Cuba, en aislamientos de *N. meningitidis* B correspondientes a la etapa epidémica, la técnica de EEM. Su empleo permitió demostrar el carácter clonal de estas cepas. Se identificó el predominio del complejo ET-5 y la presencia del cluster A-4, ambos involucrados en brotes y epidemias en diversas regiones del mundo.
- Se identificaron los patrones de sensibilidad *in vitro* a la penicilina por el método de dilución en agar, de cepas aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica y post-epidémica, lo cual permitió conocer el comportamiento de *N. meningitidis* frente a este antimicrobiano.

**VALOR TEÓRICO:** El presente documento contiene los resultados obtenidos con el diseño y empleo de un medio de cultivo para la conservación y transportación de cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba y otros países. Además, resulta la investigación más completa realizada en nuestro país en cuanto a la identificación de los principales marcadores epidemiológicos y microbiológicos de cepas circulantes en la etapa epidémica y post-epidémica. Parte de los resultados de este trabajo recibieron reconocimientos como: Premio de la ANIR (1986); Destacado en el Primer Taller sobre Colecciones de Cultivo de Cuba (1996); Resultados Relevantes IPK (1991, 1992, 1993, 1995, 1997, 2001); Premios en el Forum de Base del Instituto Finlay (1996, 1997, 1998, 1999, 2001, 2003, 2004); Logro Anual de la Academia de Ciencias de Cuba (1991, 1992, 1993, 1995, 1997, 2000, 2001, 2003); Mención Especial del Forum Provincial de Ciencia y Técnica (1995, 2001, 2002); Mención Especial del Forum Nacional de Ciencia y Técnica (1995, 2002, 2003). Parte de la temática de este trabajo se ha publicado en 39 artículos científicos de éstos, 20 aparecen en revistas nacionales y 19 en revistas extranjeras. Ha formado parte también de 3 folletos editados por el

MINSAP, de 2 Premios Anuales de la Salud (2001, 2002) y del capítulo *Neisseria y Moraxella catarrhalis* del libro *Microbiología y Parasitología Médicas* (Premio de la Crítica Científico-Técnica 2001, Premio Anual de la Salud 2002 y Ponencia Destacada en el XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica 2003). Han constituido temas de Proyectos de Grado (1), Trabajos de Diploma de la Licenciatura de Microbiología (3), Trabajos de Terminación de la Residencia en Microbiología (7) y Tesis de Maestría en Microbiología (6), defendidos en el período 1990-2004.

**VALOR PRÁCTICO Y VALOR SOCIAL:** Con la creación, evaluación y disponibilidad del medio de transporte-conservación, se realizó una enorme contribución científico-práctica al hacerse realizable la recuperación efectiva de cepas de *N. meningitidis* desde los lugares más recónditos y menos equipados, incluso de otros países, haciendo posible el estudio y la comparación simultánea de cepas recuperadas de enfermos y portadores, sólo factible, en lugares con acceso rápido a la liofilización, actividad realmente limitada en el mundo. Por otra parte, caracterizar los aislamientos invasivos de los años 80, sentó las bases para la selección de la cepa sobre la que se elaboró VAMENGOC-BC<sup>®</sup>, con la seguridad de estar seleccionando una cepa representativa de la epidemia de Cuba y la continuidad del estudio, ha consolidado la orientación de la selección. Los resultados de la sensibilidad a la penicilina han demostrado que este antimicrobiano sigue siendo útil en el tratamiento de la EM en Cuba. Actualmente, este trabajo constituye el principal y más completo estudio realizado con cepas aisladas en Cuba durante la etapa epidémica y post-epidémica. Además, es consulta obligada tanto para futuros estudios de este tipo, como para su correlación con los basados en métodos de biología molecular y es fundamental en los trabajos de evaluación de VAMENGOC-BC<sup>®</sup> y en investigaciones para nuevas generaciones vacunales. Conjuntamente, la elaboración de tesis y folletos editados por el MINSAP, sobre los aspectos teórico-prácticos del diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune de *N. meningitidis*, sirven de valiosa información para el diagnóstico microbiológico y el estudio de sus principales marcadores epidemiológicos. Parte de los resultados obtenidos con este trabajo resultan imprescindibles para el estudio integral de la EM en Cuba y aportan datos de gran valor práctico y metodológico para abordar esta temática.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Historia de la enfermedad meningocócica (EM)

Tomas Willis en 1661, fue el primero en señalar una epidemia de EM, pero no es hasta 1805, en que Vieusseux describió de forma clara y precisa un brote ocurrido en Ginebra, Suiza. Posteriormente, se confirmó su naturaleza epidémica y tendencia por presentarse en niños y campamentos militares. En 1884, Marchiafava y Celli identificaron, pero sin lograr cultivarlo, un micrococo oval dentro del citoplasma de los leucocitos. En 1887, Weichselbaum lo aisló del líquido cefalorraquídeo (LCR) y estableció la relación epidemiológica existente entre *N. meningitidis* y la meningitis cerebroespinal epidémica. Kiefer en 1896, así como Albrecht y Ghon en 1901, señalaron la importancia de los portadores entre las personas sanas y también en esa etapa, se iniciaron los estudios de clasificación. En 1909, Dopter reconoció los serotipos, hecho que permitió a Flexner en 1913, demostrar el valor de la inmunoterapia. En las primeras décadas del Siglo XX, Glover observó que los portadores aumentaban entre reclusos militares durante las etapas de hacinamiento y asoció este hecho con el incremento de casos clínicos. Durante la I Guerra Mundial se reportaron casos de EM en: Canadá, Inglaterra, Australia, Nueva Zelanda, Alemania y Estados Unidos, los casos se producían fundamentalmente entre los reclutas de nuevo ingreso y disminuían al concluir los entrenamientos, situación que obligó a tomar medidas preventivas para reducir el estado de portador. En 1915, Gordon y Murray publicaron el primer sistema de clasificación, el mismo que se utilizó hasta 1950, fecha en que la Asociación Internacional de Microbiología adoptó la nomenclatura vigente. Al finalizar los años 30 e iniciarse la década del 40, el tratamiento con sulfadiacina sódica disminuyó la mortalidad; los médicos se sintieron seguros con este antibacteriano, pero en 1963 se observó que la EM persistía entre los militares de Estados Unidos. La sulfadiacina erradicó los brotes de la II Guerra Mundial, momento en el que se vieron afectados los reclutas de nuevo ingreso y población civil de Alemania, Noruega, Francia, Bélgica, Austria, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos (Cartwright, 1995<sup>a</sup>).

El aumento de la resistencia a la sulfadiacina y la ausencia de una quimioprofilaxis eficaz, llevó al inicio de investigaciones sobre la inmunoprofilaxis y al desarrollo de vacunas contra *N. meningitidis* A y C (Gotschlich y cols., 1969). El descubrimiento de la penicilina en 1929 y su generalización 20 años después, la convirtieron en el antimicrobiano de elección para el tratamiento de la EM y por su escasa toxicidad, sustituyó a la sulfadiacina. Sin embargo, 35 años después se reportó en España una subpoblación de cepas con SD a la penicilina (Sáez-Nieto y Vázquez, 1997), situación que posteriormente se reconoció como un fenómeno emergente, de amplia distribución geográfica y de una gran variabilidad poblacional (Campos, 1997).

Ya sea por la aplicación de la inmunoprofilaxis en reclutas de Estados Unidos, o por razones menos obvias, la EM disminuyó entre los militares después de la II Guerra Mundial, pero nuevamente resultó un problema de salud para las tropas americanas de Vietnam. Las epidemias prosiguieron y aunque las tasas más elevadas se notifican en África, éstas se presentan en cualquier parte del mundo. En los últimos 30 años ocurrieron epidemias en: China, Vietnam, Mongolia, Arabia Saudita, Yemen, el Continente Europeo y Americano (Cartwright, 1995<sup>a</sup>; WHO, 1998).

En Cuba, aunque los datos históricos datan desde 1916, fue en 1938 cuando Martínez Cruz publicó los primeros casos de EM y el aislamiento de 5 cepas de *N. meningitidis*, la mayoría del serogrupo C. En esa misma etapa, Aballí señaló casos sospechosos de EM y los relacionó con la movilización de tropas norteamericanas a Cuba (Valcárcel y cols., 1991). Entre 1916-76, ocurrieron casos esporádicos y pequeños brotes, pero el brote intra-domiciliario de mayo de 1976 marcó el comienzo de la epidemia de nuestro país (Suárez, 1984). En 1975, controlada la epidemia de Brasil por *N. meningitidis* A y C, la notificación de brotes en Ciudad de La Habana, intensificó la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad. En 1979, la incidencia ascendió a 5,6/100 000 habitantes, cifra tres veces superior a la de 1978. Los serogrupos predominantes fueron el C (50%) y el B (34,3%). Los niños de 10-14 años, seguidos por los menores de 1 año, constituyeron los grupos más afectados (Valcárcel y cols., 1991).

En 1979, se administró la vacuna A-C (*bioMérieux*) a la población entre 3 meses y 19 años de edad, se alcanzó una cobertura del 80%, y a pesar del esfuerzo desarrollado, la incidencia continuó en ascenso a expensas del serogrupo B (78,4%) (Valcárcel y cols., 1991). En 1980, la EM se convirtió en el principal problema de salud para Cuba por su elevada tasa de incidencia (5,9/100 000 habitantes); en ese momento, el serogrupo B resultaba el máximo responsable de la epidemia. El mayor número de casos se notificó en 1983, con una tasa de incidencia general de 14,4/100 000 habitantes, aunque en los menores de 1 año fue más elevada (120/100 000 habitantes) (Valcárcel y cols., 1991; Pérez y cols., 1999).

Ante la magnitud de la epidemia, se fortaleció el Programa de Vigilancia Epidemiológica de Cuba, se comenzaron estudios de portadores y en 1982, se iniciaron los trabajos encaminados a obtener una vacuna efectiva contra el serogrupo B. En apenas 5 años y tras arduas investigaciones básicas, estudios farmacológicos, preclínicos y clínicos, junto a la intensificación de las etapas de desarrollo y el escalado productivo, se logró VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, vacuna antimeningocócica cubana contra los serogrupos de *N. meningitidis* B y C (Sierra y cols; 1991; Sotolongo y cols., 1999).

Una vez cumplimentadas las investigaciones preclínicas y clínicas, se le otorgó el Registro Médico Sanitario por la autoridad reguladora de Cuba. Entre 1989-90, se realizó la inmunización masiva a la población de 3 meses-24 años de edad y se alcanzó una cobertura general del 95%, medida que

provocó un descenso de la incidencia general. A partir de 1991, VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> se incorporó al Programa Nacional de Inmunizaciones del Ministerio de Salud Pública (MINSAP); la eficacia clínica fue del 83% entre la población inmunizada de 10-16 años y se demostró también el impacto en los menores de 5 años. Además, en éste y otros grupos, disminuyó la morbi-mortalidad por EM (Sierra y cols., 1991; Pérez y cols., 1999., Sotolongo y cols., 1999).

## **2.2 Taxonomía y consideraciones microbiológicas de *N. meningitidis*.**

*N. meningitidis* pertenece al Reino *Procarionte*; División I *Protophyta*; Sección IV: Bastones y cocos Gram negativos aerobios/microaerófilos; Familia VIII: *Neisseriaceae*; Género I *Neisseria*; Especie tipo: *Neisseria gonorrhoeae* (Joklik y cols., 1998).

La Familia *Neisseriaceae*, compuesta por cocos o cocobacilos Gram negativos aerobios con tendencia a agruparse en parejas, está formada por los géneros: *Neisseria*, *Acinetobacter*, *Kingella* y *Moraxella*. El género *Neisseria* comprende al menos 20 especies aisladas del hombre y los animales (Bacterial nomenclature Up-to-date. <http://www.dsmz.de/bactom/nam2092.htm>), entre las especies aisladas del hombre tenemos a: *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria subflava*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria mucosa*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria elongata*, *Neisseria sicca*, *Neisseria wearieri*; el resto, se detecta en animales (curieles, perros, gatos, lagartos, monos) (<http://www.ridom.de/>).

*N. meningitidis* tiene forma esférica (coco), es Gram negativa y en ocasiones resulta refractaria a la decoloración. Se presenta aislada o en parejas (diplococos), con los lados adyacentes planos y la apariencia de granos de café. Como puede sufrir autólisis con facilidad, las tinciones de los cultivos envejecidos varían en cuanto a su forma y tamaño. La observación microscópica directa a partir de muestras clínicas, expone su localización dentro o fuera de los leucocitos polimorfonucleares. En dependencia de la especie, fuente de aislamiento y edad del cultivo, presentan diámetros entre 0,6 a 1,5 µm. Poseen cápsula y pili, son no esporulados e inmóviles (Joklik y cols., 1998).

*N. meningitidis* es exigente en sus requerimientos nutricionales, se cultiva en medios enriquecidos y dentro de límites estrechos de temperatura (35-37 °C) y pH (7,2-7,4). Es sensible a la desecación, antisépticos, desinfectantes y cambios de temperatura; precisa de una humedad elevada y atmósfera con 5-10% de CO<sub>2</sub>. Su crecimiento se inhibe por la acción de los ácidos grasos, o sales, situación que puede contrarrestarse mediante la adición a los medios de cultivo de suero, albúmina, carbón, entre otros, compuestos capaces de adsorber los productos tóxicos liberados al medio (Ajello y col., 1984; Abalain y cols., 1985; Guibourdenche y Riou, 1997).

*N. meningitidis* es quimiorganotrófico y patógeno primario para el hombre. Tiene un alto grado de relación genética con *N. gonorrhoeae* (80% de similitud en su secuenciación nucleotídica), diferenciándose entre sí por pruebas de laboratorio, características específicas y las manifestaciones

clínicas que producen (Guibourdenche y Riou, 1997). Su identificación y diferenciación con el resto de las especies del género *Neisseria*, se realiza por pruebas bioquímicas y enzimáticas. Los patrones de fermentación que producen, constituyen uno de los principales métodos para su diferenciación. *N. meningitidis* degrada la glucosa y la maltosa con la producción de ácido, pero no de gas. No degrada la sacarosa, fructosa, lactosa ni manitol. Sin embargo, están descritas cepas atípicas, éstas se denominan “cepas deficientes” y originan cuadros clínicos diversos (Sáez-Nieto y cols., 1986; Otero y cols., 2002). Entre las pruebas claves para su identificación se destacan: la producción de oxidasa y catalasa, la actividad  $\gamma$ -Glutamyl-aminopeptidasa positiva y el no poseer  $\beta$ -Galactosidasa, lipasas ni DNasa (Guibourdenche y Riou, 1997; Zhu y cols., 2003). Recientemente, notificaron en Japón una cepa  $\gamma$ -Glutamyl-aminopeptidasa negativa por mutación del gen *ggt* (Takahashi y cols., 2002). La importancia del hierro en su supervivencia, estimula el interés por conocer los mecanismos que *N. meningitidis* emplea para su adquisición (Perkins-Balding y cols., 2004).

### 2.3 Estructura antigénica y marcadores epidemiológicos

Las cepas de *N. meningitidis* varían en su virulencia (Jensen y cols., 2003<sup>b</sup>; Meyers y cols., 2003). Su heterogeneidad es una característica propia, pudiendo variar en su especificidad antigénica, capacidad para invadir el cuerpo humano y en su poder para provocar infecciones. Pueden evadir los mecanismos de defensa del organismo debido a sus componentes superficiales y a la secreción de moléculas y vesículas complejas (“blebs”) que modulan o desvían el sistema inmune. También pueden utilizar factores del hospedero para su protección y crecimiento (Meyers y cols., 2003). En anexo 1, se presenta una figura de la estructura antigénica de *N. meningitidis*.

Entre sus principales factores de virulencia se encuentran:

**Secreción de proteasa IgA:** La IgA secretoria es la mayor fracción de anticuerpos (Ac) presente en la superficie mucosal y parece ser el principal mecanismo de protección de las mucosas del hospedero (Ochoa y Leiva., 2001). Esta inmunoglobulina bloquea la colonización e invasión de la mucosa nasofaríngea por bacterias patógenas. *N. meningitidis* segrega una proteasa (IgA proteasa) (Lin y cols., 1997). Esta se secreta como precursor, se transporta a través de la membrana citoplasmática y sale al exterior a través de un poro. La actividad proteasa muestra especificidad por la subclase 1 de IgA y no tiene efecto sobre la subclase 2 (Abraham y cols., 1999). El sitio de corte de la IgA 1 se identifica en la región bisagra y da lugar a dos fragmentos: Fab y Fc. La ruptura inactiva a la inmunoglobulina ya que como se conoce, la porción Fc media las funciones biológicas y la porción Fab tiene función de reconocimiento. La IgA proteasa se secreta por: *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Abraham y cols., 1999) y muestra una alta homología de secuencia, lo cual sugiere una elevada asociación con la virulencia de estos tres microorganismos.

**Estructuras vesiculares (“blebs”):** *N. meningitidis* produce estructuras vesiculares complejas formadas por PME y LOS, ambas representan un papel importante en la patogenia de la EM, son responsables de la variación de fase y de la mímica antigénica, se enlazan a los Ac e intervienen en la inducción de la endotoxina mediadora del shock séptico (Poolman y cols., 1995).

**Pili:** Los pili, son filamentos proteicos ubicados en la superficie celular, están compuestos por unidades repetitivas de pilina y su función es facilitar la adhesión a la mucosa bucal o faríngea y al endotelio vascular. La adherencia a la superficie de la mucosa resulta esencial para la colonización de la nasofaringe; la presencia del meningococo a este nivel, constituye una fuente de transmisión hacia individuos susceptibles y el punto de invasión para la EM (Poolman y cols., 1995).

La importancia del pili en la adherencia de *N. meningitidis* a las células epiteliales aumenta la posibilidad de que Ac anti-pili interfieran el inicio del proceso de la EM (Poolman y cols., 1995). Experimentos con cultivos de tejido nasofaríngeo demuestran que *N. meningitidis* se adhiere de forma selectiva a receptores específicos para los pili, presentes en las células columnares no ciliadas de la nasofaringe. Las bacterias sin pili presentan una menor capacidad de unión. Hay dos tipos de pili (clase 1, clase 2), la mayoría de las cepas expresan los de clase 1, antigénica y estructuralmente similares a los de *N. gonorrhoeae* y los de clase 2 son diferentes. Cualquier tipo de pili presente en *N. meningitidis*, daña por igual el epitelio de la nasofaringe (Virji y cols., 1992).

**Polisacárido capsular (PC):** Se considera un factor de virulencia por inactivar al complemento e interferir la opsonización, evitando la fagocitosis y la lisis mediada por el complemento. Debido a sus diferencias estructurales se reconocen 13 serogrupos (A, B, C, D, 29E, W<sub>135</sub>, X, Y, Z, H, I, K, y L). Estos se denominan con letra mayúscula y se identifican por las reacciones de aglutinación con antisueros grupo-específicos. Algunos, no aceptan al serogrupo D por haber perdido su cápsula, hecho que lo convierte en una cepa no agrupable (NA) (Joklik, 1998). Los serogrupos B y C, se asocian frecuentemente a procesos invasivos y poseen ácido siálico en su PC, propiedad que les confiere resistencia contra los mecanismos inmunológicos mediados por el complemento (Vogel y cols., 1996). El PC de los serogrupos A y C induce la formación de Ac específicos, mientras que el PC del B, es pobre desde el punto de vista inmunogénico por su sensibilidad a las neuraminidasas y la inmunotolerancia, debido a su similitud con estructuras de ácido siálico presentes en los tejidos humanos (Vázquez, 2002). La estructura del PC del serogrupo B es homóloga con las cadenas cortas de ácido neuramínico del enlace  $\alpha(2-8)$ , presentes en los gangliósidos humanos y en las glicoproteínas fetales. De esta forma, Ac generados contra el PC del serogrupo B pudieran crear una respuesta autoinmune (Frasch, 1995).

De la nasofaringe se aíslan cepas sin PC, aunque los aislamientos de casos invasivos son casi siempre capsulados y sugieren el papel de esta estructura como atributo de patogenicidad (Vázquez, 2002).

La expresión de la cápsula no es una característica estable, ya que al ser *N. meningitidis* una bacteria naturalmente transformable, los procesos de intercambio genético pueden provocar modificaciones en el tipo de cápsula que expresan (Alcalá y cols., 2003), con la consiguiente aparición de variantes genéticas de cepas serogrupo C, que expresan cápsula del B (o viceversa). Este proceso puede evadir la respuesta inmunológica generada por la vacunación y se señala que aunque su mecanismo no es producto de la aplicación de campañas masivas de vacunación, al menos teóricamente, las cepas podrían ser seleccionadas de forma positiva por este tipo de intervención. La posibilidad de que esta eventualidad suceda, puede convertirse en un importante mecanismo de virulencia, debido a que las nuevas cepas circulantes parecen mantener el potencial epidémico de las cepas precursoras (Rosenstein y cols., 2001; Alcalá y cols., 2003).

**Proteínas de membrana externa (PME):** Son componentes estructurales de la membrana externa con importantes funciones para mantener la vida de *N. meningitidis*. Según su peso molecular se identifican 5 clases de proteínas mayoritarias (1-5). Además, las PME permiten la clasificación de *N. meningitidis* en sero/subtipos, forman parte de los marcadores epidemiológicos y resultan buenos inmunógenos (Bethell y Pollard, 2002; Arigita y cols., 2003). Las PorA (PME clase 1) y PorB (PME clase 2/3), son porinas que permiten el paso de iones a través de la membrana celular (Massari y cols., 2003). Las PorA son cuantitativamente variables y algunas cepas no las expresan. Sin embargo, todas las cepas de *N. meningitidis* poseen PME clase 2 y 3, mutuamente excluyentes entre sí, cuantitativamente las principales y posibilitan la clasificación de este microorganismo en serotipos (Frasch y cols., 1985; Poolman y cols., 1995).

Las PorA permiten la clasificación de *N. meningitidis* en subtipos y las mutaciones en el gen *porA* pueden ocasionar variabilidad dentro de una misma cepa. A partir de la información que brinda su secuenciación genética, se obtuvo un modelo sobre la organización de la proteína dentro de la membrana externa, ello predijo que PorA, presenta una serie de plegamientos  $\beta$ -anfipáticos que atraviesan la membrana externa y generan 8 lazos hidrofílicos expuestos en la superficie bacteriana. Las PorA albergan tres regiones variables (RV): RV1-RV3. Estas se ubican en los lazos superficiales I y IV de la estructura propuesta para las PorA (Poolman y cols., 1995; Peeters y cols., 1999). Cada RV determina un subtipo, definidos por reacciones particulares con anticuerpos monoclonales (AcM) y se designan con número arábigo, precedido por el prefijo P1. Este sistema se introduce sin tener en cuenta el beneficio que reporta el conocimiento detallado de la estructura

antigénica de PorA y origina un esquema con tres formas de identificación (Poolman y cols., 1995; Feavers y cols., 1996; Ihle y cols., 2003).

Las variaciones antigénicas de PorB y PorA crean las bases de la serotipificación y subtipificación respectivamente. Los serotipos se designan también por números arábigos. Los sero/subtipos se identifican por ELISA de células enteras con AcM y aquellas cepas que no reaccionan con los AcM disponibles hasta la fecha, se les denominan como “no tipable” (NT), o “no subtipable” (NST), respectivamente (Abdillahi y Poolman, 1987). Hasta la fecha se definen 22 serotipos, algunos (2, 4 y 15), se vinculan con brotes y epidemias (Caugant, 1998; Popovic y cols., 2000; Sacchi y cols., 2001; Pirez y cols., 2002; Zerouali y cols., 2002; Jensen y cols., 2003<sup>b</sup>). En 1995, describieron al serotipo 22 entre cepas B, C y NT de Europa Central (Krizová y cols., 1996; Skoczynska y cols., 2000).

Las PME clase 4 (Rmp) están altamente conservadas en *N. meningitidis* y muestran homología con la proteína PIII de *N. gonorrhoeae*, y la OmpA de *E. Coli*. Algunos AcM (no bactericidas) dirigidos contra ella, bloquean los efectos bactericidas de otros Ac dirigidos contra los antígenos (Ag) de superficie, cuando se utilizan en altas concentraciones (Munkley y cols., 1991). No obstante, este efecto no se observa cuando experimentos similares *in vitro* se realizan con inmunoglobulinas específicas contra este Ag, purificados a partir del suero de personas inmunizadas con preparados de PME. La función de la PME clase 4 o su importancia *in vivo* en la patogénesis de la EM no está bien dilucidada (Poolman, 1995).

Las proteínas clase 5 (Opa, Opc) están expuestas en la membrana y se les consideran Ag vacuales (Sacchi y cols., 1995). Poseen una estructura trimérica y se han subdividido en Opa, expresadas por *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* y Opc (5C). Su grado de expresión es variable, y tanto Opa como Opc, muestran un alto grado de variación de fase (Meyer y van Putten., 1989). Las proteínas clase 5, juegan una importante función en la adhesión e invasión bacteriana a las células del huésped (Pujol y cols., 2000). Algunas Opa, pueden mediar la adhesión de *N. meningitidis* a las células del epitelio humano en los estadios iniciales de la enfermedad y Opc, puede intervenir en la adhesión a las células del epitelio y del endotelio humano (Virji y cols., 1992; Hardy y cols., 2000). Las Opa son denominadas también termolábiles y muestran pesos moleculares diferentes. Pueden producirse gran cantidad de proteínas Opa diferentes, éstas contribuyen a la evasión del sistema inmune y resultan similares a las PME de enterobacterias (Virji y cols., 1992). El estudio de las bases genéticas para la expresión variable de las Opa plantea que una simple cadena contiene varios loci, y los cambios en una secuencia respectiva localizada en la región que codifica para el péptido señal, dan lugar a diferentes tipos de Opa para una misma bacteria. La Opc tiene poca homología con Opa

al nivel de los aminoácidos, de igual forma, es bioquímica, genética e inmunológicamente distinta a otras proteínas clase 5. A diferencia de éstas, Opc es altamente conservada (de Vries y cols., 1998).

**Proteínas reguladas por hierro:** La habilidad de las bacterias patógenas para adquirir hierro en el hospedero constituye un elemento clave en la patogénesis (Rohde y Dyer., 2003). La disponibilidad del hierro en los fluidos tisulares de los mamíferos es baja. Estos fluidos, incluyendo las secreciones mucosales, contienen glicoproteínas de alta afinidad por el hierro, entre ellas, transferrina (Tf) y lactoferrina (Lf). Estas proteínas unen hierro de forma tal, que no queda hierro libre disponible para ser utilizado por las bacterias invasivas (Perkins-Balding y cols., 2004). Cuando existen altos niveles de hierro, las bacterias utilizan los sistemas de baja afinidad para tomarlo de forma pasiva. El primero y más estudiado involucra la síntesis de agentes quelantes del hierro (sideróforos), capaces de remover el hierro de la Tf y Lf. Algunos, pueden unir sideróforos producidos por otros organismos (sideróforos exógenos) (West y cols., 2001). *N. meningitidis* no produce sideróforos y desarrolla un mecanismo de adquisición mediado por receptores de la membrana externa, que interactúan directamente con la Tf o la Lf (Perkins-Balding y cols., 2004) o con la hemoglobina unida a la proteína sérica haptoglobulina (Lewis y cols., 1997). Dicho mecanismo involucra la expresión de proteínas importantes en el curso de la EM, que median la utilización del mineral. El conjunto de ellas se conoce como proteínas reguladas por hierro, e incluye al menos un receptor de Lf (Lbp), dos proteínas receptoras de Tf (Tbp), una proteína que se une al hierro (Fbp) y un receptor de hemoglobina (Hpu) (Lewis y cols., 1997). Durante el crecimiento en medios sin hierro, *N. meningitidis* expresa dos proteínas (TbpA, TbpB) de unión a la Tf. Estas se disponen de forma heterogénea *in vitro* e *in vivo* en la membrana externa del meningococo (Perkins-Balding y cols., 2004). TbpB es de naturaleza lipoproteica, y en ella se distinguen dos familias que difieren en cuanto propiedades antigénicas y peso molecular (Legrain y cols., 1993). Por la función definida que tienen TbpA y TbpB en la patogenia, su expresión en la superficie de la bacteria *in vivo*, su inmunogenicidad y porque los Ac que inducen muestran reactividad cruzada, actividad bactericida, y capacidad bloqueadora de la unión entre la Tf y el microorganismo, se consideran candidatos potenciales para preparados vacunales (Legrain y cols., 1993; West y cols. 2001; Perkins-Balding y cols., 2004).

**Lipooligosacáridos (LOS):** Según se ha podido determinar con AcM, estos Ag presentan un grupo de epitopos conservados (con reactividad cruzada) y variables (inmunotipo específico) (Poolman y cols., 1995). En dependencia de las condiciones del cultivo, la expresión cualitativa y cuantitativa de estos epitopos puede variar, no sólo entre cepas, sino también entre diferentes bacterias de un mismo cultivo y en la misma cepa (Poolman y cols., 1995; Berrington y cols., 2002). No está bien definido si estas diferencias influyen en la capacidad invasiva de *N. meningitidis* de forma

individual. Algunos inmunotipos (L1,8,10), parecen expresarse en portadores, mientras que L3,7,9 se detectan principalmente en cepas de enfermos (Jenning y cols., 1999). Los LOS son la causa principal del “shock” séptico; existe una relación directa entre los niveles de LOS (endotoxinas), severidad de la EM, y la posibilidad de sobrevida de los pacientes. Los LOS de *N. meningitidis* inducen una cascada de citocinas que incluye el factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 1 y 6. Estos activan el complemento y amplifican los niveles inhibitorios del activador del plasminógeno (van Deuren y cols., 2000). La función de los Ac anti-LOS en la protección humana no está bien dilucidada. Sin embargo, epitopos bactericidas parecen estar presentes en estos Ag. Los Ac contra LOS son bactericidas, capaces de causar lisis celular (Estabrook y cols., 1993) y muestran protección en las ratas durante modelos experimentales de infección (Saukkonen y cols., 1989). De igual forma, se reportan Ac funcionales (bactericidas) anti-LOS en el suero de niños enfermos con MM. No obstante, a que preparados vacunales con LOS puros no son factibles por la toxicidad del lípido A (Verheul y cols., 1993), se investiga en ratones, la capacidad protectora de una vacuna compuesta por vesículas de PME y LOS detoxificados contra *N. meningitidis* serogrupo B y por los resultados alcanzados, pudiera ser considerada para una posterior evaluación clínica (Jessouroun y cols., 2004).

Sobre la base de una combinación de modelos de SDS-PAGE, uso de antisueros específicos de conejo y AcM específicos, se describen 13 inmunotipos diferentes. A menudo, la mayoría de las cepas expresan más de un epítipo inmunotipo específico en sus LOS. La diferencia entre los 13 determinantes de inmunotipos radica en la parte oligosacáridica de la molécula. La glicosilación endógena del PC le confiere a *N. meningitidis* resistencia al efecto bactericida del suero (Verheul y cols., 1993). Los inmunotipos detectados en cepas de portadores muestran mayor heterogeneidad (Jennins y cols., 1999).

**IgA sérica:** Varios investigadores señalan que la IgA sérica bloquea la lisis mediada por el complemento iniciada por la IgG e IgM, de forma serogrupo específica. Se plantea que este bloqueo es una función de la relación IgA:IgG (Camaraza, 2002).

### **2.3.1 Marcadores epidemiológicos**

A pesar de que la EM se investiga desde hace muchos años y que se han obtenido avances en aspectos relacionados con esta entidad clínica (desarrollo de antimicrobianos, vacunas, métodos de diagnóstico), las infecciones aún persisten y tanto en su aspectos clínico, epidemiológico y de diagnóstico, existen interrogantes no bien resueltas todavía (Daley, 2003). Por esta razón, identificar los marcadores epidemiológicos de *N. meningitidis* constituye un objetivo fundamental en la caracterización de estas cepas y una herramienta valiosa en la vigilancia epidemiológica, tanto para la comprensión de la patogenia, como para estudios de evaluación de vacunas (van Deuren y cols.,

2000; Vázquez, 2002; Raghunathan y cols., 2004). Entre los marcadores de *N. meningitidis* tenemos a: Serogrupo, serotipo, subtipo, inmunotipo y la resistencia a la sulfadiacina sódica. Los cambios en el comportamiento de *N. meningitidis* frente a la penicilina, la convierten también en un marcador epidemiológico (Latorre y cols., 2000; Kyaw y cols., 2002a; Antignac y cols., 2003; Stefanelli y cols., 2004). En los últimos años, el desarrollo de procedimientos basados en el ADN para la tipificación genética de las bacterias, se emplea para la caracterización de cepas y aportan una valiosa información sobre la diversidad genética de este microorganismo (Caugant, 1998; Arreaza y cols., 2004; Vázquez y Berrón, 2004).

**2.3.1.1 Marcadores fenotípicos:** Confirmada la presencia de *N. meningitidis*, determinar el serogrupo por aglutinación en lámina con antisueros policlonales y/o monoclonales, constituye el primer paso en la caracterización fenotípica. Hasta la fecha, se han purificado los PC de los serogrupos A, B, C, X, Y, Z, W135 y L (Popovic y cols, 1999).

Basado en las diferencias estructurales del PC, PME y LOS, se propuso un sistema de nomenclatura uniforme, semejante al esquema O:K:H empleado para *E. coli* (Frasch y cols., 1985), donde, el PC permite identificar los serogrupos, las PME clase 2/3 a los serotipos, las PME clase 1 a los subtipos y los LOS a los inmunotipos (Ej: B:4:P1.19,15:L3,7,9).

El empleo de AcM contra PorB y PorA, permite una mejor caracterización en serotipos y subtipos respectivamente. Sin embargo, en algunos casos pueden quedar cepas sin clasificar (Poolman, 1995). El desarrollo de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con AcM resulta útil para la clasificación de *N. meningitidis* en sero/subtipos e inmunotipos (Scholten y cols., 1994; Poolman, 1995; Tzanakaki y cols., 2001). En 1999, Wedege reportó que uno de los AcM de referencia utilizado para identificar el subtipo P1.15, no constituía un AcM para éste, tal como se creía hasta ese momento. Apoyada por diferentes métodos, demostró que el AcM 21P1.15 era específico para el subtipo P1.19, localizado en la RV1 y desde ese momento, lo redesignó como 2-1 P1.19 (Wedege y cols., 1999).

Entre los subtipos más frecuentes en brotes y epidemias se citan los siguientes: P1.4, P1.16, P1.15 y P1.2. Mientras que, entre los sero/subtipos predominantes se destacan: 2a:P1.5,2; 2b:P1.5,2; B:15:P1.15; B:4:P1.15 y el B:4:P1.4, entre otros (Diermayer y cols., 1999; Zerouali y cols., 2002; Jensen y cols., 2003; Mastrantonio y cols., 2003; Patrik y cols., 2003). La especificidad del serotipaje con AcM varía entre el 72-100% y la del subtipaje oscila entre el 64-98%. Sin embargo, se presentan falsos negativos cuando los AcM no tienen una buena sensibilidad (Poolman, 1995).

Las variaciones de la estructura de los LOS posibilitan el inmunotipaje (Scholten y cols., 1994) y aunque los AcM facilitan su clasificación, la interpretación resulta a veces difícil. Las cepas pueden expresar varios determinantes de LOS por la influencia que ejercen sobre ellos las diferentes

condiciones del crecimiento (Poolman y cols., 1995). Frecuentemente, se omite la identificación de los inmunitipos porque su determinación no es siempre posible. Sin embargo, resulta útil en los estudios de patogenia y en las investigaciones epidemiológicas (Scholten y cols., 1994).

Aunque el sero/subtipaje con AcM posee algunas limitaciones, aún constituye una herramienta útil y atractiva por su fácil manejo, relativo bajo costo y el no-requerimiento de equipos sofisticados. Actualmente, se aplica en muchos países porque los métodos genotípicos resultan costosos y están principalmente disponibles para las regiones que poseen tecnologías desarrolladas (Poolman, 1995).

**2.3.1.2 Marcadores genotípicos:** Los avances en la genética molecular, proporcionan un nuevo enfoque a la epidemiología de la EM y brindan técnicas alternativas de diagnóstico con una ventaja potencial en la caracterización bacteriana. En las dos últimas décadas, y coincidiendo con el auge de conceptos como enfermedades emergentes y reemergentes, se produce un interés creciente por aspectos estrechamente vinculados con bacterias patógenas: incrementos aparentes de virulencia, mayor transmisibilidad o aumento de la resistencia a los antibióticos (Pollard y Dobson, 2000). En este contexto, los planteamientos sociopolíticos como el de la globalización contribuyen a la incorporación de ideas como las de la exposición global a agentes infecciosos antes confinados a pequeñas áreas remotas y endémicas, y la facilidad para la rápida dispersión de microorganismos con nuevas características de virulencia o resistencia (Smith y cols., 2000, Vázquez y Berrón, 2004).

Desde el punto de vista de los aportes de la microbiología a los estudios epidemiológicos, es básico diferenciar entre la epidemiología local y epidemiología global. Para dar respuesta a las necesidades de la epidemiología local, se han desarrollado los sistemas de tipificación microbiológicos que pudieran definirse como “clásicos” (fenotípicos y genotípicos) y en los últimos años, se han desarrollado sistemas que pudieran catalogarse como “universales”, por la posibilidad de ser aplicados en la práctica a la totalidad de las especies bacterianas. Entre éstos, se destacan el análisis de ADN mediante electroforesis en campo pulsado (ECP) (Tenover y cols., 1995), PCR arbitraria (PCR-A) (Gaetano-Anolles, 1993; Aakre y cols., 1998), la amplificación de fragmentos polimórficos al azar (RFLP) (Savelkoul y cols., 1999) y la EEM (Selander y cols., 1986), entre otros. Todos, resultan altamente discriminatorios y detectan pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano.

La EEM posee la deseable combinación del “poder discriminatorio” y detección/determinación de clones con independencia de su estabilidad (Selander y cols., 1986). Este método, puede definirse como un método genético indirecto y analiza la movilidad electroforética de un número concreto de enzimas metabólicas en geles de almidón. Las diferencias observadas en estas movilidades, corresponden con variaciones en el locus o el gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada

variante se define como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes, conforman el perfil alélico, que a su vez define el ET. El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidas a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables. En este caso, este marcador tiene algunas de las cualidades deseables en la epidemiología global (Caugant, 1998).

El MLST, junto con la clasificación antigénica clásica, facilita la asignación de diferentes cepas aisladas a determinadas líneas evolutivas o clústeres poblacionales, pudiendo clasificarlas en algunos casos, como cepas hipervirulentas (Maiden y cols., 1998; Vázquez y Berrón, 2004). En el MLST, las variaciones en los diferentes locus se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados, permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) genotipos. Esto posibilita identificar todas las variaciones y, además, la secuencia del ADN es un dato objetivo fácilmente intercambiable entre varios laboratorios (Maiden y cols., 1998). El principio del desarrollo de MLST se encuentra en los trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información generada a partir del análisis de isoenzimas con la obtenida mediante secuenciación de los genes analizados (Smith y cols., 1999).

**“Multilocus sequence typing” (MLST) en *N. meningitidis*:** Se desarrolló originalmente en este microorganismo porque se disponía de cepas previamente caracterizadas por EEM (Caugant y cols., 1987; Caugant, 1998). Además, la estructura poblacional de *N. meningitidis* se corresponde a la de una población no clonal con una gran presencia de procesos de recombinación (Smith y cols., 1993). Estos procesos de recombinación, provocan una rápida diversificación de los clones, lo que supone un aumento en la dificultad para reconocer las líneas clonales tras un proceso de evolución geográfica y/o temporal. En esta especie, en la que se ha reconocido la circulación de líneas hipervirulentas, una perfecta identificación de las mismas, incluso sometidas a los mencionados procesos de recombinación, es de gran ayuda para entender los procesos de dispersión de ondas y brotes (Mayer y cols., 2002). En este sentido, el MLST resulta un éxito para reconocer líneas clonales hipervirulentas, y puede trazar perfectamente su desplazamiento geográfico y temporal, de forma que, el método identifica todas las variantes genéticas de las líneas hipervirulentas que evolutivamente van surgiendo, asignando esas variantes a la misma línea clonal (Bygraves y cols., 1999). Esto ha permitido conocer que estas líneas clonales pueden evolucionar rápidamente, lo que les proporciona un mejor nivel de adaptación a los cambios ambientales. La misma o mayor tasa de diversificación se daría en los complejos clonales aislados de portadores (Jolley y cols., 2000; Vázquez y Berrón, 2004), si bien se trata de líneas bien diferenciadas de las definidas como hipervirulentas, características de casos de EM. En este aspecto, la identificación de la llegada de

nuevas líneas clonales hipervirulentas, que sustituyen a las que circulan en una zona geográfica concreta, puede predecir la aparición de ondas epidémicas (Alcalá y cols., 2002), lo que es de gran utilidad en la toma ágil de decisiones en salud pública. Así mismo, la aplicación del MLST facilita definir las relaciones epidemiológicas entre los pacientes y sus contactos familiares o convivientes (Tzanakaki y cols., 2001). Sin lugar a dudas, puede afirmarse que la biología molecular constituye un gran impacto en el conocimiento de todos los aspectos implicados en el control de la EM (Vázquez y Berrón, 2004).

**2.4 Patogenia:** El ser humano es el único hospedero natural para el cual *N. meningitidis* es patógena, constituyendo su hábitat natural y reservorio, la superficie de las mucosas del tracto respiratorio superior (TRS). Las cepas pueden colonizar el TRS, permanecer en la nasofaringe sin provocar síntomas ni signos clínicos evidentes de infección por espacios de tiempo variables que, sobre todo en el caso del serogrupo B, puede extenderse a varios meses (Vázquez, 2000, van Deuren y cols., 2000). *N. meningitidis* se transmite de persona a persona por vía aérea, aunque para que la transmisión se produzca deben cumplirse los requisitos de proximidad (menos de un metro de nariz a nariz) y continuidad (exposición por tiempos prolongados) (Bencic y cols., 1991; van Deuren y cols., 2000).

Se describen factores de riesgo que predisponen para la EM. Entre éstos se señalan: Alteraciones anatómicas del sistema inmune (asplenia) o alteraciones funcionales (deficiencia de properdina y algunos componentes del complemento) (Leggiadro, 2003). Aunque, son pocas las personas con estas condiciones, sí poseen una elevada predisposición para sufrir infecciones por *N. meningitidis*. Los individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) pudieran presentar también una mayor predisposición (Couldwell, 2001). Sin embargo, en éstos, las infecciones por *N. meningitidis* no resultan tan frecuentes como las producidas por otros microorganismos capsulados (Nuorti y cols., 2000). El sexo orogenital sin protección se asocia al aumento de portadores de *N. meningitidis* entre homosexuales (Carlin y cols., 1997). Existe también peligro de casos secundarios en núcleos familiares donde surge un caso clínico, el riesgo de contraer EM entre los miembros de esa familia, se eleva de 400-800 veces y resulta mayor en la raza negra y en aquellos que viven con condiciones socio-económicas deficientes (Rosenstein y cols., 1999). La exposición activa o pasiva al tabaco, así como las infecciones virales del TRS, aumentan el riesgo de contraer EM (Fischer y cols., 1997<sup>a</sup>; Peltola y McCullers, 2004; Pereiro y cols., 2004).

La puerta de entrada es la nasofaringe humana, a ese nivel coloniza, invade la mucosa y evita la acción de la IgA secretora mediante IgA proteasa. *N. meningitidis* daña las células nasofaríngeas no ciliadas, liberando para este fin una toxina soluble. Después de adherirse, mediante adhesinas, penetra en la mucosa por endocitosis y una vez que pasa del extremo apical al basal de la célula

epitelial, alcanza al torrente sanguíneo. En el compartimiento vascular puede ser destruida por la acción de los Ac séricos, el complemento y las células fagocitarias, o bien pueden multiplicarse iniciando la fase bacteriémica (Soberg, 1998). A este nivel, la defensa principal del hospedero es el sistema del complemento. La vía clásica requiere la presencia de Ac específicos, éstos activan la cascada del complemento y conducen finalmente a la lisis bacteriana. Cuando el hospedero carece de Ac específicos, depende de la vía alternativa del complemento. La capacidad de evadir esta vía, facilita a *N. meningitidis* para sobrevivir en la circulación sanguínea (Martínez, 1994; van Deuren y cols., 2000).

La liberación de LOS parece desempeñar un papel central en la aparición de la EM, éstos se liberan en la sangre durante la multiplicación y tras la autólisis del microorganismo, se establece una correlación entre los niveles de LOS en el plasma y la gravedad de esta entidad clínica (Soberg, 1998). En los cuadros fulminantes, los LOS inician y estimulan los principales sistemas de cascada asociados con la inflamación (sistemas de coagulación, complemento, fibrinólisis y calicreína-cinina), así como la producción de citocinas. La respuesta inflamatoria da lugar a una vasodilatación intensa, disminución del rendimiento cardíaco, agregación plaquetaria, coagulación intravascular diseminada (CID) y escape en los capilares. Finalmente, ocurre el shock séptico con síndrome de dificultad respiratoria y fallo multiórgano (Soberg, 1998; van Deuren y cols., 2000).

Para que ocurra MM se necesita que *N. meningitidis* atraviese la barrera hematoencefálica (BHE) e induzca una respuesta inflamatoria en el espacio subaracnoideo. Este aspecto es el menos aclarado en la fisiopatología de la MM. Se demuestra por técnicas microscópicas la presencia de bacterias en el interior de las células, indicando que la vía transcelular es probablemente la más aceptable para explicar el paso a través de la BHE. Este mecanismo se corrobora por la presencia de bacterias en el interior de células endoteliales de los capilares de cerebro (Nassif y cols., 1997). Ya en el LCR, por su pobre contenido en opsoninas, *N. meningitidis* se multiplica y para que la inflamación de las meninges se produzca, se requiere de suficiente inóculo (decenas de miles de bacterias por mm<sup>3</sup>). La permeabilidad de la BHE aumenta debido a mediadores de la inflamación producidos localmente, como el TNF $\alpha$ , interleucinas 1, 2, 6 y 8 secundarias al incremento de los niveles de LOS en el LCR, con aparición de edema cerebral por exudación de albúmina. En una fase avanzada, los mediadores inducen la activación de neutrófilos con producción de sustancias tóxicas que aumentan el daño de la BHE. Se activan otros mediadores (endorfinas, sistema de quininas, factores de la coagulación, metabolitos del ácido araquidónico y sustancia depresora del miocardio, entre otras), todas actúan sobre el miocardio, el sistema vascular y órganos vitales para producir shock y fallo multiorgánico (Martínez, 1994; van Deuren y cols., 2000).

## 2.5 Inmunidad y mecanismos de resistencia del hospedero

**Inmunidad:** Los Ac protectores se adquieren por dos vías: a) Forma natural: pasivamente por su paso a través de la placenta y por la lactancia materna; b) Forma activa: por infección con *N. meningitidis*, tanto por cepas capsuladas como por bacterias sin cápsula y por la inmunización (Goldschneider y cols., 1969<sup>a</sup>). El efecto de la inmunidad pasiva natural es relativamente corto, pero resulta eficaz en la protección de los niños, hecho que lo demuestra la baja incidencia de EM en los primeros 6 meses de vida (Shepard y cols., 2003). La sensibilidad aumenta progresivamente durante estos meses (Goldschneider y cols., 1969<sup>a</sup>) relacionándose con la disminución de la actividad bactericida del suero. En los niños entre los 6 meses-2 años, se encuentran bajos niveles de Ac, correlacionándose con una mayor frecuencia de EM (Vázquez, 2002). La protección natural puede adquirirse también por la exposición a bacterias con poca o ninguna relación taxonómica, pero que poseen epítopes semejantes. Muchas bacterias entéricas parecen tener reactividad cruzada con los serogrupos A y C (Camaraza, 2002). La presencia de Ac contra Ag de reactividad cruzada, podría explicar la protección en los niños pequeños.

**Mecanismos de resistencia del hospedero:** La protección contra la EM depende de mecanismos inespecíficos (mucosa, polimorfonucleares y complemento) y específicos (Ac) (Ochoa y Leiva., 2001). Los Ac contra *N. meningitidis* pueden ser específicos de grupo, de tipo o de reacción cruzada. Todos los meningococos comparten varios determinantes antigénicos con otras especies de *Neisseria* (*N. lactamica* y otras), y también con especies no pertenecientes al género *Neisseria* (*E. coli* K1, K2 y K 64, *Streptococcus faecalis*, entre otros) (Pollard y Frash, 2001).

La primera línea de defensa del hospedero y la más importante contra la infección por *N. meningitidis* y otros patógenos, es la integridad de la mucosa; una vez que atraviesa esta membrana y alcanza al torrente sanguíneo, la defensa principal es el sistema del complemento y la presencia de Ac específicos. La vía clásica requiere la formación de complejos Ag-Ac para activar el factor C1 y así sucesivamente a toda la cascada del complemento, culminando en la lisis bacteriana (Pollard y Frash, 2001). Cuando no existen Ac específicos, se activa la vía alternativa a partir del factor C3 y la capacidad de *N. meningitidis* para evadirla, le permite sobrevivir en la circulación sanguínea. El ácido siálico facilita la unión del factor H (proteína reguladora del complemento) al factor C3, impidiendo así la activación subsiguiente de toda la cascada (van Deuren y cols., 2000). Por otra parte, la presencia de Ac específicos y del sistema del complemento, juegan un papel importante en la defensa del hospedero, provocando la lisis bacteriana, la fagocitosis por monocitos o polimorfonucleares, o neutralizando los efectos mediados por la endotoxina (Goldschneider y cols., 1969<sup>b</sup>).

**2.6 Espectro clínico:** En dependencia de los órganos afectados, la infección por *N. meningitidis* puede ocasionar varias manifestaciones clínicas, éstas van desde una colonización asintomática de la nasofaringe hasta la MC fulminante (Síndrome de Waterhouse Friderichsen) (Schoeller y Schmutzhard, 2001). La infección resulta asintomática, si *N. meningitidis* queda restringida en la nasofaringe, tal como sucede en los portadores sanos. Las formas clínicas más frecuentes son la MC y la MM (van Deuren y cols., 2000). La secuencia clínica habitual es la de una infección del TRS, seguida de MC, MM y menos frecuentemente, se presentan manifestaciones focales (Schoeller y Schmutzhard, 2001).

**Infección de las vías respiratorias superiores:** Después de colonizar la nasofaringe, *N. meningitidis* puede permanecer en ella por períodos de tiempo variables (Vázquez, 2000). La mayoría de las personas no suelen presentar síntomas o signos clínicos evidentes de infección, pero pueden expresar fiebre antes del inicio de las manifestaciones generales. Algunos, revelan síntomas leves antes de la hospitalización: faringitis, rinorrea, tos, cefalea y conjuntivitis (Soberg, 1998).

**Meningococemia:** Entre el 30-40% de los casos de EM presentan MC sin signos clínicos de MM. Las manifestaciones clínicas van desde una bacteriemia transitoria y sintomatología leve, hasta casos fulminantes de pocas horas de duración. El inicio suele ser súbito, con fiebre (39-41<sup>0</sup>C), escalofríos, náuseas, vómitos, exantema, mialgias y artralgias. La característica más llamativa es el exantema maculopapular, petequial o equimótico que puede evolucionar y transformarse en un cuadro hemorrágico. Resultan indicadores de mal pronóstico: la erupción petequial diseminada, hipotensión, disminución o reducción de la circulación periférica y la ausencia de signos meníngeos (Soberg, 1998). Se señalan casos de MC asociados a un síndrome bronco-pulmonar sin otra sintomatología; generalmente, son pacientes con una edad avanzada (media de 71 años) y el diagnóstico se establece por la clínica y lesiones típicas en el RX del tórax. En estos casos predominan los serogrupos Y, B y C (Angelini y cols., 1997; Daley, 2003; Pratima y cols., 2004).

**Meningococemia fulminante:** Denominada síndrome de Waterhouse-Friderichsen, difiere de la forma más leve por su rápida y fulminante evolución. Se presenta en el 10-20% de los enfermos, caracterizándose por shock, CID y fallo multi-órgano (Soberg, 1998). Afecta a los lactantes y niños de corta edad (Shepard y cols., 2003); el inicio suele ser súbito, con rápida aparición de púrpura, hipotensión y una vasoconstricción periférica con extremidades frías y cianóticas. Las lesiones purpúricas aumentan de tamaño y afectan la piel, mucosas y órganos internos. Puede ocurrir depresión miocárdica, acidosis metabólica, oliguria, leucopenia y disminución de los niveles de los factores de la coagulación. El estado de la conciencia es variable y a pesar del tratamiento intensivo, el 50% de los pacientes mueren por insuficiencia cardiaca, respiratoria o ambas (Soberg, 1998; Daley, 2003).

**Meningococemia crónica:** Es poco frecuente y se asocia a un déficit inmunitario (Farron y cols., 1996). Aunque se describió desde 1902, su evolución clínica no está bien precisada; la mayoría de los casos evolucionan de forma favorable y a pesar de que puede ocurrir a cualquier edad, afecta preferiblemente a los mayores de 16 años (Hansen y cols., 2003). El diagnóstico se realiza por el aislamiento de *N. meningitidis* en el hemocultivo de casos con fiebre de una semana de evolución, artralgias y erupción cutánea. Con frecuencia, el LCR es negativo y la mayoría de los casos son producidos por el B. El mecanismo inmunopatológico responsable de la evolución crónica no está bien dilucidado, se describen varias hipótesis pero ninguna explica el por qué de la mayoría de estos casos. Algunos, presentan un déficit de la fase terminal del complemento (Farron y col., 1996).

**Meningitis meningocócica** Es la manifestación clínica más frecuente y la complicación más común de la MC. Sucede en alrededor del 50% de los casos y su cuadro clínico es similar al resto de las meningitis de etiología bacteriana (Soberg, 1998). Se inicia con fiebre, cefalalgia, vómitos, confusión, letargia, rigidez de nuca y puede progresar al coma en poco tiempo. En los lactantes, se inicia con síntomas inespecíficos y una fontanela tensa y abombada (Shepard y cols., 2003). En los pacientes de edad avanzada y en la MC, también puede comenzar sin signos clínicos específicos. Durante la MM ocurren convulsiones, parálisis de pares craneales, hemiparesia, u otros signos neurológicos focales (Duke y cols., 2003). Entre el 11-19% de los enfermos pueden quedar con secuelas (Soberg, 1998; Daley, 2003).

**Formas clínicas poco frecuentes:** a) La neumonía por *N. meningitidis* se reconoce hace más de 60 años. Sin embargo, el diagnóstico a partir de su aislamiento en el esputo no resulta confiable porque este microorganismo coloniza la nasofaringe de individuos sanos. En estos casos, la incidencia de sepsis generalizada es baja y los hemocultivos son casi siempre negativos. El serogrupo Y, se asocia con frecuencia a neumonía meningocócica primaria (Clarke y cols., 2001) y emerge como el agente etiológico más frecuente de EM en algunas regiones de Estados Unidos, zonas donde ocasiona un importante número de casos clínicos (Racoosin y cols., 1998; Rosenstein y cols., 1999); b) Uretritis meningocócica: *N. meningitidis* se aísla cada vez más frecuentemente del recto y tracto urogenital, sugiriendo una relación epidemiológica con la práctica del sexo oral-genital entre los homosexuales. Algunos, reportan un aumento de portadores no estacionales y el aislamiento a partir de exudados rectales y uretrales (Tsang y cols., 2003<sup>a</sup>); c) Otras localizaciones poco frecuentes son: Artritis, pericarditis, celulitis y conjuntivitis, entre otras (Vienne y cols., 2003; Cartolano y cols., 2003; Orden y cols., 2003).

**2.7 Epidemiología:** El hombre es el único huésped natural de *N. meningitidis*. La transmisión y fuente de nuevas infecciones pueden ocurrir por el contacto de persona a persona a través de las secreciones nasofaríngeas de un caso cercano y de los portadores, más que de los casos clínicos. En

adolescentes, del 15-25% pueden ser portadores, mientras que en la población general fluctúa del 5-10% y durante brotes y epidemias puede elevarse al 90% (Vázquez, 2000).

La MM ocasiona una alta morbi-mortalidad. En países industrializados, la mortalidad para MM fluctúa del 7-10%, mientras que para la MC se eleva al 19%. Sin embargo, en el Tercer Mundo la mortalidad por MC asciende al 70% (WHO, 1998). Los serogrupos A, B y C ocasionan la mayoría de los casos invasivos, aunque entre ellos existen diferencias con relación a su potencial epidémico (Sacchi y cols., 1998; Achtman y cols., 2001; Rosenstein y cols., 2001).

El serogrupo A provoca epidemias con altas tasas de morbi-mortalidad y predomina en la región central de África (cinturón de la meningitis), zona donde ocurren epidemias cíclicas que se inician en la estación seca y finalizan con el arribo de las lluvias. En 1996, la Organización Mundial de la Salud (OMS), señaló en Burkina Faso y Nigeria, uno de los mayores brotes de EM ocurridos en el mundo. Las cepas pertenecieron al fenotipo A:4:P1.9, del complejo clonal III-1 (Rosenstein y cols., 2001). Posteriormente, en el 2002, Burkina Faso reportó una epidemia por el serogrupo W<sub>135</sub> y vinculada con el peregrinaje de los musulmanes a La Meca. Algunas cepas se identificaron como A:21:P1.9, secuencia tipo 5 (ST-5) y del complejo clonal “subgrupo III”. El resto, perteneció al W<sub>135</sub>:22a:P1.5,2 (ST-11 y ET-37) (Ouedraogo-Traore y cols., 2002; Issa y cols., 2003).

Los serogrupos B y C, son responsables de la mayoría de los casos de Europa y América Latina. Los brotes y epidemias se presentan principalmente entre las poblaciones más humildes, hacinadas y que viven con malas condiciones higiénicas (Rosenstein y cols., 2001). El serogrupo B se describe principalmente en casos endémicos, aunque puede producir también brotes y epidemias. Muchas de las epidemias producidas por este serogrupo pertenecen al complejo clonal ET-5 (Caugant, 1998). Recientemente, Brasil notificó casos por cepas B:4:P1.19,15 (Sacchi y cols., 2001), el mismo fenotipo que provocó la epidemia de Cuba (Pérez y cols., 1999). A principios de los años 90, cepas B:4:P1.15 y del complejo clonal ET-5, ocasionaron brotes en Oregón (Diermayer y cols., 1999). A diferencia del serogrupo A, las epidemias del B pueden extenderse durante varios años y ocasionan tasas de incidencia bajas o moderadas (Rosenstein y cols., 2001). Entre los países con brotes importantes por el serogrupo B tenemos a: Chile (Cruz y cols., 1990), Argentina (Requeira y cols., 1994), Colombia (Galeano y Echeverry., 1995), Nueva Zelanda (Baker y cols., 2001), Brasil (Sacchi y cols., 2001), Uruguay (Pirez y cols., 2002), España (Vázquez, 2002), Francia (Antignac y cols., 2003), Noruega (Wedegge y cols., 2003) e Italia (Mastrantonio y cols., 2003), entre otros.

El serogrupo C es endémico en Estados Unidos, Canadá y Europa. Actualmente, ocasiona brotes en los países industrializados. En los años 90, Norteamérica señaló la emergencia de cepas C.2a:P1.5 pertenecientes al complejo ET-15 (Whalen y cols., 1995). Entre 1989-92, Canadá notificó cifras 10 veces superior a las reportadas con anterioridad y desde 1991, casos vinculados con nuevas cepas

ascienden en la comunidad, produciendo pequeños picos endémicos en poblaciones pequeñas y/o estudiantes universitarios (Tyrrell y cols., 2002; Patrick y cols., 2003). En España, durante la década del 80, la EM estuvo vinculada al serogrupo B (Vázquez, 2000), pero en los años 90, el fenotipo C:2b:P1.5,2 aumentó y ocasionó un cambio epidemiológico brusco en algunas regiones españolas (Alcalá y cols., 2002).

**Europa:** En 1987 estableció un sistema de vigilancia para evaluar el impacto y la epidemiología de la EM. Tomando como base los datos obtenidos a partir de ese sistema, las tasas de incidencia se dividieron en: países con una incidencia menor a 1/100 000 habitantes, de 1-3/100 000 y de más de 3/100 000. Dinamarca, Islandia, Malta, Holanda, Irlanda y Escocia, notificaron tasas de incidencia entre 3-6/100 000 habitantes, el resto se situó por debajo de esta cifra (Noah y Henderson., 1999). Entre 1994-98, los menores de 1 año presentaron las cifras más elevadas, le siguieron los de 1-4 años y otro pico ocurrió en adolescentes entre 15-19 años de edad (Connolly y Noah., 1999). El serogrupo C mostró porcentajes elevados en: Inglaterra, Escocia, Gales, Islandia, Grecia, Suiza, Repúblicas Eslovacas y Checa y España. Porcentajes elevados sucedieron también en Israel e Italia, países con tasas de incidencia por debajo de 1/100 000 (Mastrantonio y cols., 2003). Entre los países con elevadas proporciones del serogrupo B y porcentajes bajos de C, tenemos a: Alemania, Noruega, Dinamarca, Finlandia, Austria, Francia y Suecia. Este grupo incluyó a 2 países con tasas de incidencia por encima de 3/100 000 habitantes (Holanda y Bélgica) (Scholten y cols., 1994; van Looveren y cols., 1998).

**Asia:** En los años 80, una ola epidémica afectó a la India, Nepal y Mongolia (Cochi y cols., 1987). No obstante al predominio del A en esas regiones, Mongolia mostró posteriormente un ascenso del serogrupo B (Tsend y cols., 1992) y la India, también identificó este serogrupo (Suri y cols., 1994). En China, ocurrieron epidemias cada 8-10 años con picos máximos en 1959, 1967, 1977 y 1984. El serogrupo A provocó más del 95% de los casos (Zhen, 1987). Sin embargo, a pesar del predominio del A en Asia, un estudio de 182 cepas aisladas durante 30 años en Japón (1974-2003), acaba de revelar el predominio del serogrupo B, seguido del Y y el W<sub>135</sub> (Takahashi y cols., 2004).

**Nueva Zelanda y Australia:** En Nueva Zelanda, la incidencia aumentó a expensas del serogrupo B (80%) y más del 50% resultó B:4:P1.4. La incidencia resultó mayor en menores de 5 años (Baker y cols., 2001). En Australia, predominó el B (53%) y los fenotipos B:4:P1.4,7 y B:15:P1.7 pero en Victoria y Tasmania, prevaleció el fenotipo C:2a:P1.4,7. La incidencia por edades mostró una distribución similar a la de Europa (Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2003).

**Latinoamérica:** Con excepción de Brasil (Sacchi y cols., 2001), que en los años 70 padeció una epidemia por los serogrupos A y C, en el resto de los países latinoamericanos predominaron el B y el C. Entre estos países se encuentran: Chile (Cruz y cols., 1990), Argentina (Requeira y cols.,

1994), Colombia (Galeano y Echeverry., 1995), Estados Unidos (Popovic y cols., 2001), Canadá (Tsang y cols., 2003<sup>b</sup>), Ecuador (Pesantes, 2002) y Uruguay (Pirez y cols., 2002).

Argentina: Entre 1988-89, el serogrupo C provocó un brote de EM en Córdoba. Posteriormente, desde 1991-93, se produjo un alza por los serogrupos B (63%) y C (20%). El 32% se presentó en niños menores de 1 año y en 1994, inmunizaron con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> (Requeira y col., 1994).

Brasil: En la década del 90, Sao Paulo notificó la tasa de incidencia de EM más elevada del país con el predominio de cepas B:4:P1.15, clon que aún circulaba en 1999. Río de Janeiro, confirmó la prevalencia del serogrupo B y entre 1989-90, algunas regiones vacunaron con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> (Sacchi y cols., 2001).

Colombia: Desde 1988, hasta los primeros años de la década del 90, la incidencia de EM osciló del 0,5-1,0/100 000 habitantes, aunque ésta fue superior en los niños menores de 1 año. El 94% de las cepas aisladas correspondió al serogrupo B, situación epidemiológica que condujo a una campaña de inmunización con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en Iquique (Galeano y Echeverry., 1995).

Estados Unidos: *N. meningitidis* es el agente etiológico principal de meningitis bacteriana en niños y adultos jóvenes. Desde la década del 40, la población militar presenta un alto riesgo de contraer EM y desde 1971, todos los nuevos reclutas son inmunizados en sus primeros 5 días de servicio militar. Actualmente, aplican la vacuna tetravalente (A, C, Y, W<sub>135</sub>) (Brundage y cols., 2002). Los casos notificados en ese país, son principalmente ocasionados por los serogrupos B, C y el Y.

**Oriente Medio:** Ocurrieron brotes de EM por el serogrupo A (clon AIII-1) durante el peregrinaje a La Meca (Hajj), clon que llegó a Arabia Saudita a través de los peregrinos del Sur de Asia. La dispersión de cepas virulentas mediante los peregrinos que retornaron a su lugar de origen provocó casos en: Arabia Saudita, Egipto, Sudán, África Sub-Sahariana, Estados Unidos y Europa. La mayoría fueron ocasionados por los serogrupos A y W<sub>135</sub>. Actualmente, Arabia Saudita exige el certificado de vacunación contra estos serogrupos (Memish y Alrajhi., 2002).

**Cuba:** La epidemia de EM se inició a mediados de 1976, constituyó el principal problema de salud durante la década del 80 y en 1983, alcanzó la mayor tasa de incidencia (14,4/100 000 habitantes). Al inicio de la epidemia predominó el serogrupo C, pero a partir de 1979, fecha en que se inmunizó con A-C, la incidencia se elevó vertiginosamente a expensas del serogrupo B (Valcárcel y cols., 1991). Posteriormente, se vacunó con VA-MENGOC -BC<sup>®</sup> a toda la población de riesgo y en 1991, se incorporó al Programa Nacional de Inmunizaciones. Después de estas medidas, se erradicó la epidemia y actualmente, la EM muestra tasas de incidencia muy bajas, por debajo de las cifras del período pre-epidémico (Pérez y cols., 2003). Los hechos más importantes en la historia de la EM en Cuba se muestran en el anexo 2.

## 2.8 Estado de portador de *N. meningitidis*

Para comprender mejor la dinámica de la EM, resulta de especial interés e importancia, conocer el papel que desempeñan los portadores sanos (Vázquez, 2000). El hombre, es el único reservorio natural para *N. meningitidis* y la incapacidad de este microorganismo para colonizar otro huésped se basa en la hipótesis de que, sólo a partir del hombre, sea capaz de obtener el hierro, elemento fundamental para su crecimiento (Rohde y Dyer., 2003; Perkins-Balding y cols., 2004).

El estado de portador resulta un proceso inmunizante y da lugar a la producción de Ac bactericidas, la ausencia de portadores en niños pequeños, explica la mayor incidencia de EM entre la población infantil (Vázquez, 2000).

El carácter estacional de la EM, independientemente de las cepas circulantes y de la población afectada, indica la importancia de los factores ambientales en la aparición de casos invasivos. El efecto dañino del frío y la humedad baja sobre la mucosa de la nasofaringe, predisponen a la EM en determinadas épocas del año (Moore, 1992; Bruce y cols., 2001). Otros (Jensen y cols., 2003<sup>a</sup>), detectan diferencias significativas entre la variación estacional, la edad y el fenotipo circulante.

Las características de las cepas que colonizan los sujetos resultan un factor clave para el desarrollo de EM en algunos casos, frente a la condición del portador sano en otros. La presencia de algunos complejos clonales responsables de la mayoría de los casos, orienta hacia el papel e importancia de la virulencia de las cepas circulantes para el desarrollo de casos invasivos (Jensen y cols., 2003<sup>b</sup>). En las epidemias, la mayoría de los casos son ocasionados por cepas idénticas, demostrando que estas “cepas patógenas”, con específicas condiciones de virulencia, son esenciales para explicar las variaciones periódicas en la incidencia de EM. La naturaleza de las cepas que adquiere la población, determina en algunos casos un efecto beneficioso, y en otros, conducen al desarrollo de los casos invasivos (líneas hipervirulentas) (Issa y cols., 2003; Lawrence y Hanford., 2003). El aumento de casos clínicos puede vincularse con la introducción de “nuevas cepas” en la población; éstas expresan Ag a los que la población no ha estado expuesta anteriormente y, por consiguiente, no se encuentra protegida, aumentando los susceptibles y en consecuencia, la incidencia de casos de EM (Vázquez, 2000).

La prevalencia de portadores se investiga desde el siglo pasado. Sin embargo, antes de 1969, su cifra pudo ser sobrestimada dado que hasta esa fecha, *N. lactamica* se consideraba una variante de *N. meningitidis* con capacidad para degradar la lactosa (Cartwright, 1995<sup>d</sup>). La mayoría de los estudios de portadores se realizan en instituciones cerradas (Bruce y cols., 2001), grupos familiares (Simmons y cols., 2001) e individuos asociados a brotes y/o epidemias (Fitzpatrick y cols., 2000). Los estudios en la población general no seleccionada son escasos (Fontanals y cols., 1995; Verdu y cols., 2001; Kremastinou y cols., 2003; Pavlopoulou y cols., 2004) y en los niños pequeños, la

colonización ocurre principalmente por *N. lactamica*, especie no patógena para el hombre (Vázquez, 2000).

El porcentaje de portadores en la comunidad no se asocia con la incidencia de EM. Sin embargo, si se tiene en cuenta que los brotes se producen frecuentemente por un clon único (Caugant, 1998), cabe pensar que la prevalencia de portadores de esta “cepa epidémica”, mostraría correlación con la incidencia de EM. Esta circunstancia, determina la importancia del seguimiento epidemiológico de las cepas aisladas de casos clínicos, ya que pudieran utilizarse estos datos como un sistema de “alerta”, ante un posible aumento en el número de casos por un fenotipo previamente aislado en la población, o ante la aparición, de una nueva expresión antigénica. No obstante, si el aumento del número de casos y/o patogenia se asocian a cepas ya circulantes en la población, se puede pensar en bacterias diferentes con expresiones antigénicas iguales, por lo que en esta situación, los estudios de caracterización genotípica alcanzarían un carácter obligatorio (Vogel y cols., 1998; Vázquez, 2000).

Entre los factores que influyen en la tasa de portadores se citan los siguientes:

**Edad y sexo:** En comunidades abiertas occidentales, los portadores son poco frecuentes en los primeros años de vida (menos del 3%), aumentan en las dos primeras décadas de la vida (24-37%) y declinan lentamente después de los 24 años de edad (menos del 10%) (Jensen y cols., 2003<sup>a</sup>; van Deuren y cols., 2003; Pavlopoulou y cols., 2004). Algunos, no señalan diferencias entre el sexo femenino y masculino (Kremastinou y cols., 1999), mientras que otros notifican una mayor prevalencia entre los varones (García y cols., 2000; Simmons y cols., 2001).

**Estación del año:** Se han detectado diferencias estacionales entre portadores de *N. meningitidis* en países de Europa, América y África (De Wals y cols., 1983; Blakebrough y cols., 1982; Jha y Ghosh., 1995; Jensen y cols., 2003<sup>a</sup>). El carácter estacional de la EM en situaciones endémicas y epidémicas, independientemente de las características de las cepas y la población afectada, indica la importancia de los factores ambientales en la aparición de casos invasivos (Sánchez y cols., 2001). Las condiciones climatológicas desfavorables pueden lesionar la mucosa nasofaríngea y determinar un aumento de casos de EM en determinadas épocas del año (Moore, 1992).

**Hábito de fumar:** La relación entre el hábito de fumar y el portador se notificó desde la década del 80 (Stuart y col., 1989). El trabajo se refiere a que, tanto en portadores de *N. meningitidis* B, como en personas colonizadas por otros serogrupos, los portadores aumentaron en proporción directa con el número de cigarrillos consumidos por día. Otros señalan que el consumo de más de 20 cigarrillos al día, representa un riesgo 5,3 veces superior (Kremastinou y cols., 2003) y algo similar puede suceder en los fumadores pasivos (Simmons y cols., 2001). Sin embargo, algunos autores no refieren resultados significativos respecto al hábito de fumar (Kremastinou y cols., 1994; Davies y cols., 1996), mientras otros lo relacionan con la persistencia del portador (Riordan y cols., 1998). El

hábito de fumar provoca disminución de la IgA y de los niveles de IgM en la saliva. Además, afecta la flora bucal y facilita la colonización por *N. meningitidis*. El humo del cigarro puede interferir la acción ciliar de las células de la mucosa respiratoria y reducir las defensas locales frente a gérmenes patógenos (Kremastinou y cols., 1994; Cartwright, 1995<sup>b</sup>; Block y cols., 1999).

**Efecto inhibitorio de la flora:** Desde la I Guerra Mundial se demostró que cuando la presencia de *N. meningitidis* desciende en la nasofaringe, aumentan los neumococos y otras especies del género *Streptococcus*. La saliva de las personas sanas ejerce un efecto inhibitorio para *N. meningitidis*, mientras que, el mucus nasal no actúa de igual forma. El efecto inhibitorio de la saliva se debe en parte a su contenido de bacterias vivas, sobre todo de estreptococos. La carencia del efecto inhibitorio del mucus nasal, pudiera explicar el por qué *N. meningitidis* habita básicamente en la nasofaringe posterior (Cartwright, 1995<sup>b</sup>).

La flora nasofaríngea es compleja y está compuesta por microorganismos aeróbicos y anaeróbicos; lo que, unido a la carencia de métodos reproducibles capaces de cuantificar ambos grupos, hacen extremadamente difíciles a ese nivel, los estudios de interacción entre *N. meningitidis* y el resto de los miembros de la flora bacteriana (Brook y Gober, 2000). Además, la mayoría de los trabajos sólo incluyen la detección de la flora aeróbica. Al menos nueve especies bacterianas de la nasofaringe interfieren la colonización por *N. meningitidis*, todas son Gram positiva y la mayoría resultan estreptococos comensales (Olcen y cols. 1991). La presencia de *N. lactamica* en la nasofaringe se vincula con la formación de Ac bactericidas y protege contra la colonización por *N. meningitidis* y el desarrollo de EM (Olcen y cols. 1991; Cartwright, 1995<sup>b</sup>).

**Tonsilectomía:** Algunos, refieren el aumento de portadores y casos invasivos de EM en individuos que operados de las amígdalas, asociándolo a una disminución transitoria de la IgA después de este tipo de intervención quirúrgica (Kristiansen y cols., 1984; Sharma y cols., 2001).

**Infecciones virales:** Las infecciones virales influyen en la colonización nasofaríngea humana por *N. meningitidis* y otras bacterias (Moreno y Díaz., 2000). Además, predisponen a las infecciones bacterianas (Peltola y McCuller, 2004). Las infecciones respiratorias agudas (IRA) por virus, afectan las tasas de portadores de la comunidad y las tasa individuales. *N. meningitidis* se transmite de una persona a otra por el contacto prolongado y hace pensar que los portadores, al adquirir una IRA viral, diseminan fácilmente a *N. meningitidis* por la tos y el estornudo. Olcen y colaboradores (1981), identificaron cifras elevadas de portadores entre contactos intra-domiciliarios de casos con historia reciente de IRA del TRS. Sin embargo, Uno (2003), no señaló diferencias significativas entre los portadores de meningococo y la presencia de IRA de etiología viral.

**Hacinamiento:** El hacinamiento se asocia frecuentemente con la prevalencia de portadores y la ocurrencia de brotes de EM (Baker y cols., 2000). Esta prevalencia es mayor entre los sujetos que

conviven en campamentos militares, escuelas con régimen de internado, prisiones y comunidades cerradas o semicerradas. Entre los militares señalan índices de portadores que pueden alcanzar hasta el 50%, acompañados o no de casos clínicos (Andersen y cols., 2000). El número de portadores se eleva rápidamente después del ingreso de nuevos reclutas al ejército, y si ocurren casos clínicos, éstos se presentan durante las primeras semanas del entrenamiento (Cartwright, 1995<sup>b</sup>).

**Estado de portador y transmisión intra-domiciliaria:** Se observan altos índices de portadores entre familiares y contactos íntimos de casos de EM (Simmons y cols., 2001; Tzanakaki y cols., 2001). La prevalencia entre los familiares resulta mayor si el caso índice es un lactante, intermedio si tiene entre 1-4 años y disminuye, cuando el enfermo es un adulto (Blakebrough y Gilles., 1980). Esto sugiere que los lactantes y niños pequeños adquieren EM a partir de los contactos más íntimos de la familia, mientras que los adolescentes y adultos, adquieren a *N. meningitidis* fuera de su grupo familiar intra-domiciliario. La mayoría de los estudios entre familiares, muestran que los padres son los que habitualmente resultan portadores (Vázquez, 2000). Sin embargo, este patrón de dispersión no siempre coincide (Ronne y cols., 1993). Quizás sorprendentemente, un constante hallazgo entre estudios de convivientes es que, el aislamiento de meningococo entre contactos intra-domiciliarios resulta una excepción en lugar de la regla. En la mayoría de los casos, independientemente de la edad del caso índice, no identifican portadores entre los convivientes. Esto pudiera estar unido a una marcada pobre sensibilidad de los métodos y cultivos utilizados en la detección de los portadores (Cartwright, 1995<sup>b</sup>).

**Estado secretor de antígenos de grupos sanguíneos en la saliva:** El estado secretor es una condición genética que capacita a determinados individuos para eliminar Ag de grupos sanguíneos en la saliva. Existen dos categorías: el secretor y el no-secretor. Un secretor, es aquel sujeto capaz de secretar Ag del tipo sanguíneo en la saliva, mucus del tracto digestivo, cavidades respiratorias y otras. El 20% de la población resulta no-secretora (Cartwright, 1995<sup>b</sup>).

En individuos no-secretores se describen períodos más cortos de sangramiento, una viscosidad sanguínea más densa y una mayor probabilidad de alta agregación plaquetaria. Los no-secretores tienen una mayor predisposición a las afecciones del sistema digestivo (úlceras duodenales y pépticas), afecciones del sistema respiratorio (asma), enfermedades autoinmunes (esclerosis múltiple y espondilitis anquilosante), enfermedades metabólicas (diabetes) y enfermedades cardiovasculares (infarto del miocardio). También, se asocian con el alcoholismo y con una mayor predisposición a padecer infecciones bacterianas (*H. influenzae*, *N. meningitidis*) y micóticas (*C. albicans*) (Garraty, 1997). Aunque algunos no señalan asociación significativa entre los portadores e individuos no-secretores (Kremastinou y cols., 1999), otros refieren entre éstos, un mayor número de portadores de *N. meningitidis* (Zorgani y cols., 1994).

**Duración del estado de portador:** Los estudios puntuales de prevalencia no proveen datos acerca del tiempo de portación de *N. meningitidis*. Los hisopados repetidos a un mismo individuo por varios meses pueden dar idea de su persistencia, pero no están exentos de dificultades en el diseño e interpretación (Krisova y cols., 2004). La mayoría de los trabajos siguen a portadores conocidos para identificar cuando termina su estado. Sin embargo, no permiten hacer un estimado del punto de partida. Se pueden obtener uno o más hisopados negativos, seguidos de cultivos positivos a una cepa indistinguible del último aislamiento, lo cual pudiera interpretarse como un falso negativo, en un portador que continuó siéndolo (Pether y cols., 1988). Otros, señalan la necesidad de tres hisopados negativos para considerar libre de portadores a la población investigada (Cartwright, 1995<sup>b</sup>). En europeos y americanos la permanencia del portador de meningococo se estimó entre 9-10 meses (De Wals y cols., 1983). Sin embargo, en nigerianos señalaron un promedio de 4,1 meses (Blakebrough y cols., 1982): Mientras que, para alemanes adolescentes, notificaron un promedio de 10 semanas (Ehrhard y cols., 2002). El serogrupo parece estar también vinculado con la permanencia del estado de portador. Para los serogrupos A y C, señalan tasas altas de adquisición, junto a una corta permanencia del microorganismo en la nasofaringe (Blakebrough y cols., 1982). Sin embargo, para el serogrupo B, describen bajas tasas de adquisición y una larga persistencia, ésta puede prolongarse hasta los 2 años (Bencic y cols., 1991).

**2.9 Profilaxis antimeningocócica:** Las medidas básicas para la prevención de la EM son: la quimioprofilaxis y la inmunoprofilaxis, ambas, desempeñan un papel importante en el control de las tasas de portadores y, de esta forma, limitan la difusión de esta entidad clínica (Vázquez, 2000).

**2.9.1 Quimioprofilaxis:** Como en el resto de las enfermedades transmisibles, los casos clínicos pueden evitarse interrumpiendo la cadena de transmisión. La actuación, pues, en el estado de portador constituye una forma básica para el control de esta enfermedad y configura la base de la quimioprofilaxis. Esta medida resulta útil pero tiene limitaciones y debe utilizarse en circunstancias especiales (Kristiansen y Jenkins, 1997). Los contactos de pacientes con EM tienen un mayor riesgo para enfermar (riesgo relativo entre 1000-4000) (Olcen y cols., 1981) y cuando la enfermedad ocurre, portadores de la cepa patógena pueden detectarse entre los contactos del enfermo. Contactos que pueden desarrollar EM y dispersar las cepas de persona a persona, provocando eventualmente casos invasivos en sujetos sin vínculo aparente con el caso índice (Cartwright y cols., 1991). Los casos secundarios se reportan con una frecuencia del 0.5% (Cooke y cols., 1989). Esta cifra puede ser superior, si el tiempo de intervalo se extiende, o cuando se emplean técnicas más sensibles para identificar al agente causal (Ala'Aldeen y cols., 2000).

La sulfadiacina constituyó el mejor quimioprofiláctico en cuanto efectividad, bajo costo y ausencia de efectos secundarios. Sin embargo, desde los años 60, Millar y colaboradores (1963) notificaron

la resistencia a este antimicrobiano y a partir de ese momento, cepas con estas características se vincularon a brotes y epidemias (Aakre y cols., 1998; Caugant, 1998; Arreaza y cols., 2000<sup>b</sup>). La situación existente llevó a la búsqueda de otros antimicrobianos, sobre todo, aquellos que mostraron su eficacia “*in vitro*” frente a *N. meningitidis* (Vázquez, 2001; Hansman y cols., 2004). Se descartaron los siguientes antibacterianos: cefalexina, doxiciclina, eritromicina, oxitetraciclina, ampicilina y penicilina. Sin embargo, demostraron su eficacia: minociclina (Devine y cols., 1973), espiramicina (Engelen y cols., 1981), ofloxacina (Gilja y cols., 1993), ciprofloxacina (Arreaza y cols. 2000<sup>b</sup>), rifampicina y ceftriaxona (Simmons y cols., 2000).

La minociclina, se investigó como quimioproláctico en Europa y Estados Unidos. Resulta tan efectiva como la rifampicina y no se han descrito cepas resistentes, pero su empleo se cuestionó por los efectos vestibulares que produce. Sólo se aconsejó en los casos de resistencia a la sulfadiacina y rifampicina (Devine y cols., 1973).

Las quinolonas, penetran fácilmente el tejido faríngeo, las secreciones nasales y la saliva; tras la administración de una sola dosis, mantienen CMI elevadas por más de 12 horas y hacen posible la erradicación de *N. meningitidis* de la nasofaringe (Gilja y cols., 1993). Una dosis de ciprofloxacina, elimina el 97% de los portadores en 4 días y el 93% después de 2 meses (Gaunt y Lambert., 1988). Por producir lesiones en el cartílago de crecimiento, no se recomienda en niños ni embarazadas. La posibilidad de utilizar una dosis con eficacia probada, resulta útil para administrar en poblaciones militares (Visakorpi, 1989). A pesar de su eficacia, acaban de notificar en España, la primera cepa de *N. meningitidis* con SD a ciprofloxacina (Alcalá y cols., 2004). Mientras que, en Grecia, se refirieron al fallo de la rifampicina y ciprofloxacina para erradicar a *N. meningitidis* en un contacto de un caso fatal (Tsakris y cols., 2001).

La rifampicina, sustituyó a la sulfadiacina y es muy activa para reducir el número de portadores; su erradicación persiste entre 6-10 semanas después de su administración (Kristianse y cols., 1997; Simmons y cols., 2000). Actualmente, es el más utilizado, pero su administración puede conducir a la aparición de resistencia por mutaciones en el gen *rpoB* (gen que codifica para la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa) (Stefanelli y cols., 2001) y por alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (Abadi y cols., 1996). Algunos, describen fallos en la prevención de la EM y/o reducción del número de portadores (Yagupsky y cols., 1993). Además, se han descrito brotes por cepas de meningococo resistentes a la rifampicina (Cooper y cols., 1986).

Las cefalosporinas de tercera generación son eficaces frente a *N. meningitidis*. La ceftriaxona, por su larga vida media en sangre y fácil administración (una dosis al día), se emplea con éxito en el tratamiento y profilaxis de la EM (Simmons y cols., 2000; Cresti y cols., 2003).

La quimioprofilaxis, por evitar la aparición de casos secundarios, debe iniciarse lo antes posible (primeras 48 horas de aparecer el caso índice). La población diana serán los contactos estrechos de los casos, éstos tienen un mayor riesgo para enfermar (7-10 días), después de surgir el caso índice. El factor de riesgo para desarrollar una enfermedad sistémica no es el estado de portador, sino la adquisición reciente del mismo (Kristiansen y cols., 1998). Los hechos que determinan la reducción de casos tras esta medida son: a) Erradicar portadores colonizados por la cepa índice, impidiendo su difusión a la población susceptible, y b) Evitar que personas susceptibles sean colonizados de nuevo a partir de casos y/o portadores (Cartwright y cols., 1991). Para eliminar los portadores de *N. meningitidis*, se debe tener en cuenta que pese a su eficacia clínica, algunas pautas antibióticas empleadas (penicilina intravenosa) no resultan adecuadas. De este modo, los convalecientes de EM y correctamente tratados, pueden continuar como portadores y constituyen una importante fuente de infección (Sáez-Nieto y cols., 1990). Estos portadores deben recibir tratamiento quimioprofiláctico antes del alta hospitalaria, a no ser que previamente fueran tratados con una cefalosporina de tercera generación.

Si bien el empleo de quimioprofilácticos en grupos de riesgo bien definidos reduce la tasa de ataque de EM, su empleo masivo en colectivos abiertos y situaciones epidémicas no parece estar indicado por: a) Dificultad para su administración a un gran colectivo durante cortos períodos de tiempo, esto puede producir la transmisión de cepas virulentas desde sujetos aún no tratados, a aquellos que lo fueron en un principio; b) La duración de un proceso epidémico suele ser prolongada, excediendo el período de tiempo en que la pauta estándar de la quimioprofilaxis se considera eficaz (Riedo y cols., 1995). La quimioprofilaxis está justificada en personas que habitan en el mismo domicilio del caso índice, niños que comparten la misma aula o un mismo grupo de guardería infantil, reclusos que conviven en la misma celda y en el personal de salud que estuvo en contacto con las secreciones nasofaríngeas del enfermo. En ausencia de esta quimioprofilaxis, una vigilancia personal estrecha durante los primeros 10 días de la aparición del caso, asegura el tratamiento rápido y adecuado de cualquier caso sospechoso que aparezca en este período de tiempo (Vázquez, 2000).

**2.9.2 Inmunoprofilaxis:** La emergencia de cepas resistentes y la ausencia de una quimioprofilaxis eficaz en algunos casos, renovó el interés por la inmunoprofilaxis. Según Artenstein, los factores que llevaron al desarrollo de vacunas útiles frente a la EM fueron: La demostración de una respuesta inmunológica frente a los Ag capsulares (relacionada con protección frente a la infección) y el aislamiento y purificación de estos Ag, con la demostración de la inducción de Ac protectores en el hombre (Artenstein, 1975; Vázquez, 2002).

En 1969, se obtuvieron PC purificados de los serogrupos A y C; estos compuestos resultaron inmunógenos para el hombre y constituyeron el punto de partida de las vacunas polisacáridicas

(Gotschlich y cols., 1969; Domínguez y cols., 1998). Las vacunas de los serogrupos A y C, son efectivas en el control de brotes y la protección de viajeros a zonas endémicas, pero muchos no las recomiendan para el uso rutinario debido al corto tiempo de protección que confieren y la pobre inmunogenicidad que producen en menores de 2 años, los que a su vez, tienen el mayor riesgo de enfermar (Frasch, 1995; Vázquez, 2002).

En los años 70, los Servicios de Vigilancia del Reino Unido, Bélgica y Estados Unidos, detectaron el aumento de casos por *N. meningitidis* Y y W<sub>135</sub>. Su incremento condujo a la obtención de una vacuna tetravalente (A + C + Y + W<sub>135</sub>). Esta vacuna resultó segura e inmunogénica y actualmente, se aplica en grupos de riesgo durante brotes o epidemias (Plotkin, 1999). En la actualidad, debido a los brotes de EM que se presentan entre musulmanes que acuden anualmente a La Meca, Arabia Saudita exige la inmunización con esta vacuna tetravalente (Memish y Alrajhi., 2002).

En 1931, Avery y Goebel, demostraron que la unión del PC a las proteínas mejoraba la respuesta inmune, dándole un carácter timo dependiente y una mayor efectividad en niños menores de 2 años. El desarrollo de esquemas sintéticos para la preparación de conjugados PC-proteínas clínicamente aceptables, permitió bordear las limitaciones de las vacunas de PC convencionales (Plotkin, 1999). La evidencia más convincente del principio de la conjugación, es aquel donde unen de forma covalente al PC con una proteína transportadora o “carrier”, para obtener una respuesta timo dependiente, por ejemplo, la vacuna del Reino Unido, donde el transportador proteico fue el toxoide tetánico, toxoide diftérico o la mutante diftérica atóxica CRM (Borrow y cols., 2002; Lederman, 2003). Esta estrategia proporcionó buenos resultados en vacunas contra *H. influenzae* b y *S. pneumoniae* serotipos 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F y 23F. Estos preparados vacunales, pueden aplicarse a partir de los 2 meses de edad y originan una protección de larga duración (Stein, 1992; Black, y cols., 2000). No obstante, queda por determinar sí, al igual que en el caso de *H. influenzae* b, las nuevas vacunas conjugadas contra *N. meningitidis*, interfieren con el portador. Recientemente, señalaron en España e Inglaterra, el efecto de la vacuna conjugada C sobre el estado de portador de *N. meningitidis* (Maiden y Stuart., 2002; Fernández y cols., 2003).

Aunque el PC del serogrupo B fue purificado por Gotschlich a mediados de los años 60, fueron Wyle y colaboradores quienes evaluaron por primera vez en humanos, una vacuna del serogrupo B (Wyle y cols., 1972). Este PC, un polímero de ácido siálico unido por enlaces  $\alpha$ 2-8, parecía ser la elección lógica, pero los resultados de éste y otros estudios, revelaron su pobre inmunogenicidad (Tappero y cols., 1999). Se demostró que los Ac inducidos por el PC del B durante la infección natural y/o inmunización son principalmente de tipo IgM con baja avidéz (Colino y Outschoom., 1998; Tappero y cols., 1999; Borrow y cols., 2002).

Todos estos factores, contribuyeron al empleo de estructuras no capsulares para el desarrollo de vacunas contra *N. meningitidis* B, entre ellas, las vacunas elaboradas con vesículas de la membrana externa entre las que se destaca VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, preparado constituido por vesículas de la membrana externa del meningococo B y PC del serogrupo C, adsorbidos a un gel de Hidróxido de Aluminio (Sierra y cols., 1991). En 1989, se aplicó por primera vez en nuestro país en forma de campaña y a partir de 1991, se incorporó al Programa Nacional de Inmunizaciones (Pérez y col., 2003) y se ha utilizado desde hace más de 10 años en Cuba y otros países (Sotolongo y González., 1999; González de Aledo y Vilorio, 2004). En Cuba mostró un 83,5% de protección y erradicó la epidemia. Transcurridos más de 10 años de su admisión al Programa Nacional de Inmunizaciones, la incidencia de EM se sitúa por debajo de las cifras pre-epidémicas (Pérez y cols., 2003).

No obstante a los logros alcanzados en el campo de las vacunas contra los principales agentes etiológicos de las meningitis bacterianas, debe mantenerse una estrecha vigilancia de la evolución de estos microorganismos en la era post-vacunal, por su notable tendencia a provocar variantes producto de la recombinación genética (Vázquez, 2002).

### **2.10 Sensibilidad antimicrobiana de *N. meningitidis***

A la introducción de cada nuevo antimicrobiano, le siguió la emergencia de bacterias con mecanismos de resistencia capaces de contrarrestar su eficacia. Esto ha provocado que cada día se disponga de un arsenal menor de fármacos eficaces. Actualmente, la emergencia de cepas resistentes y su diseminación es uno de los problemas más acuciantes que enfrenta la infectología clínica (González, 2002). La consecuencia directa de este fenómeno, es la aparición de cepas multiresistentes y la solución de este problema involucra muchas esferas donde, la vigilancia epidemiológica y el control de los antimicrobianos, aportarán mejores resultados que el diseño y la producción de nuevos medicamentos (van Deuren y cols., 2000). Se realizan intentos para detener esta problemática que ya se extiende por todo el mundo, tal es el caso de las bacterias que producen infecciones del sistema nervioso central e infecciones del tracto respiratorio (Duke y cols., 2003).

*N. meningitidis* no escapa a esta problemática y la SD a la penicilina, que apenas se describía antes de la década del 80 (Devine y Hagerman, 1970), después de 1985, se convirtió en un problema cada vez más frecuente (Sáez-Nieto y Vázquez, 1997; Richter y cols., 2001; Sosa y cols., 2001; Kyaw y cols., 2002<sup>a</sup>; Antignac y cols., 2003). Además, se señala resistencia a sulfonamidas (Bennett y cols., 2003), rifampicina (Oppenheim, 1997; Nolte y cols., 2003) y al cloranfenicol (Galimand y cols., 1998; Shultz y cols., 2003).

En el manejo de la infección por *N. meningitidis* se emplean dos grupos de antimicrobianos bien diferenciados (terapéuticos y quimioprolácticos). Sobre estos últimos, realizamos con anterioridad

un comentario breve, y entre los terapéuticos, la penicilina, cloranfenicol y cefalosporinas de tercera generación son los más utilizados en las infecciones sistémicas (Oppenheim, 1997).

La penicilina, por su escasa toxicidad, sustituyó a la sulfadiazina sódica en el tratamiento de los casos invasivos (Campos, 1997) y suministrada a altas dosis, es una alternativa válida para el tratamiento de la EM (Bastida y cols., 1998; Trotter y cols., 2002). Desde su primera aplicación y durante muchos años, no hubo cambios significativos respecto a la sensibilidad de *N. meningitidis* frente a este antimicrobiano. Sin embargo, existen estudios puntuales sobre el aislamiento de cepas con bajo nivel de resistencia (Domínguez y Minguella., 1985). Cuando se detectó la primera cepa con SD en España, la situación se consideró un problema emergente, de amplia distribución geográfica y gran diversidad poblacional (Sáez-Nieto y Vázquez, 1997). Este cambio, se debe al menos en parte, a una disminución de la afinidad de este antimicrobiano por la proteína fijadora de penicilina 2 (PBP<sub>2</sub>). El descenso de esta afinidad se encontró también en *Neisserias* saprofitas y los estudios de genética poblacional, atribuyeron su aparición a los procesos de recombinación que sustituyeron partes del gen *penA* de la PBP<sub>2</sub>, por las correspondientes regiones de este gen de las *Neisserias* comensales (Stefanelli y cols., 2003). Aunque este tipo de resistencia apareció en clones no pre-existentes y no relacionados, se describe comúnmente entre cepas del serogrupo C (Campos, 1997; Toro y cols., 1997). Los mecanismos de transmisión genética (transducción, conjugación y transformación) se consideran importantes en el origen de la SD a la penicilina. La secuenciación de los genes *penA* de *N. lactamica*, *N. polysacchareae* y *N. flavescens*, demostraron que los fragmentos de los genes *penA* de cepas de *N. meningitidis* con SD a la penicilina, son idénticos a los fragmentos correspondientes de estas especies no patógenas, las que de modo natural, presentan SD a este antimicrobiano (Lujan y cols., 1990; Orus y Viñas, 2000; Arreaza y cols.; 2002). Por otro lado, la resistencia de *N. meningitidis* a la penicilina por  $\beta$ -lactamasa es extremadamente rara y sólo se señala en casos aislados (Dillon y cols., 1983; Botha, 1988; Fontanals y cols., 1989).

El cloranfenicol, descrito desde 1947, demostró cuatro años después su eficacia para el tratamiento de la MM y resulta aún un excelente antimicrobiano frente a *N. meningitidis* (Puddicombe y cols., 1984). La resistencia al cloranfenicol es poco frecuente, aunque Francia y Vietnam reportaron cepas resistentes (CMI mayor a 64 mg/L), debido a la producción de una acetiltransferasa y alertan sobre la emergencia de cepas similares en otras regiones del mundo (Oppenheim, 1997). Por el momento, esta observación no ha tenido lugar en África, país donde se emplea para el tratamiento de la MM (Tondella y cols., 2001). Si bien es cierto que en África, predomina el serogrupo A, los aislamientos de Francia y Vietnam pertenecían al serogrupo B. Además, los estudios son escasos y es factible que la presión ejercida en África por el uso del cloranfenicol, permita el desarrollo de resistencia en este continente donde por motivos económicos, resulta una de las pocas alternativas terapéuticas.

En España, su uso es ocasional y constituye una opción válida de tratamiento en los pacientes alérgicos a la penicilina y cefalosporinas de tercera generación (Galimand y cols., 1998).

Las cefalosporinas de tercera generación, resultan eficaces contra *N. meningitidis* (Arreaza y cols., 2000<sup>a</sup>; Antignac y cols., 2003). La ceftriaxona, parece indicada especialmente en las epidemias de países subdesarrollados (Scholz y cols., 1998) y muestra también su utilidad para erradicar a los portadores (Simmons y cols., 2000).

Las pruebas para la sensibilidad *in vitro* de bacterias patógenas, no sólo proporcionan orientación para la elección de los antibacterianos, sino que se utilizan también con fines epidemiológicos y con la intención de detectar mecanismos de resistencia (Baquero y cols., 1997). Si bien, en los casos graves resulta importante determinar la CMI por métodos manuales o automatizados, estas técnicas implican un costo no solventado para su uso rutinario, en particular para la economía de los países latinoamericanos (Baquero y cols., 1997).

Los Laboratorios miden la actividad antimicrobiana por métodos cualitativos y cuantitativos. Los primeros, emplean la difusión del antimicrobiano concentrado en un disco de papel, polidiscos o tabletas e identifican a los microorganismos en sensibles, moderadamente resistentes y resistentes cuando se enfrentan a un antimicrobiano específico (método de difusión). Este método, se basa en líneas de regresión que muestran buena correlación entre los diámetros de las zonas de inhibición y el valor de las CMI, empleando cepas idénticas. Sus principales dificultades estriban en: su no-interpretación cuantitativa, no-aplicabilidad en organismos de crecimiento lento y su inexactitud para predecir la sensibilidad a antimicrobianos que difunden mal en los medios de cultivo. Entre estos métodos tenemos el de Kirby-Bauer (Bauer y cols., 1966; Vázquez y cols., 2003).

Los métodos cuantitativos determinan la menor concentración del antimicrobiano que inhibe el crecimiento del agente biológico, no están bajo la influencia de la velocidad de su crecimiento, permiten conocer la CMI de los antimicrobianos a evaluar, son cómodos, posibilitan analizar simultáneamente a varios microorganismos y representan una ventaja para los laboratorios que procesan un elevado número de cepas (Baquero y cols., 1997). Los métodos cuantitativos se utilizan con fines investigativos y epidemiológicos en Laboratorios de Referencia, pero resultan engorrosos y de un costo elevado, pueden realizarse en caldo o en agar y en ambos están descritos el micro y el macro-método (Baquero y cols. 1997).

La sensibilidad *in vitro* de *N. meningitidis* se ha realizado por diferentes métodos (Pascual y cols., 1996; Campos, 1998; Nicolas y cols., 1998). Debido a su diversidad, resulta difícil comparar los resultados entre diferentes laboratorios. En un intento por solucionar esta problemática, Centros Nacionales y de Referencia de Europa, realizaron un estudio de interacción con diferentes métodos para medir la sensibilidad antimicrobiana de *N. meningitidis* (Vázquez y cols., 2003).

**2.11 Transporte y conservación de cepas de *N. meningitidis*:** Este microorganismo es lábil y difícil de preservar vivo por largos períodos. Los subcultivos frecuentes y el almacenamiento, conducen a la pérdida de su viabilidad y virulencia, así como pueden ocasionar también cambios en sus propiedades antigénicas. La mayoría, recomiendan la liofilización y criopreservación como los métodos ideales para preservar a este microorganismo (Gibson y Houry., 1986; Siberry y cols., 2001). Entre los principios que deben tomarse en cuenta para la conservación de *N. meningitidis* se citan: Su sensibilidad a las variaciones de pH, deshidratación y cambios de temperatura, así como su frecuente autólisis. El LNRM del Instituto Pasteur, no recomienda la conservación a  $-20^{\circ}\text{C}$ , ya que a esta temperatura no se inhiben las exopeptidasas del espacio periplásmico que representan un papel importante en la autólisis de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* (Guibourdenche y Riou., 1997).

Los métodos de elección para preservar a *N. meningitidis* por largos períodos de tiempo son la liofilización y criopreservación ( $-60$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), en sangre de conejo desfibrinada, agua peptonada glicerinada o leche descremada. Desdichadamente, ambos métodos (los más confiables), no son factibles para muchos países debido a la irregularidad del suministro eléctrico, costo de los equipos necesarios para su realización y las dificultades para su mantenimiento. Sin embargo, cuando no es posible disponer de estos recursos, se evalúan métodos alternativos de más bajo costo (Siberry y cols., 2001).

Las cepas de *N. meningitidis* pueden transportarse y conservarse en medios de cultivo que ofrecen tiempos variables de viabilidad (horas, semanas, meses). De acuerdo con el tiempo de viabilidad que proporcionan, los medios de transporte-conservación se clasifican en: a) Los que mantienen la viabilidad a corto plazo (24-48 horas): Medio Transgrow, Medio TGV (transporte gérmenes vivos) y Medio Stuart; b) Los que mantienen la viabilidad a mediano plazo (1-24 semanas): ACH, CTA, ADA, Medio de Dorset (MD) y el Medio de Transporte-Aislamiento; c) Los que mantienen la viabilidad a largo plazo (1 año o más): Liofilización y criopreservación (Abalain y cols., 1985; Sotolongo, 1995). El empleo de estos métodos, dependerá de las posibilidades de cada laboratorio pero es importante tener en cuenta que para su inoculación, siempre debe partirse de cultivos puros y jóvenes (no más de 24 horas de incubación) (Abalain y cols., 1985; Sotolongo, 1995).

La obtención de cepas viables es fundamental para el trabajo de los laboratorios de referencia, éstos requieren del envío sistemático de las cepas, en condiciones adecuadas por parte de los laboratorios suministradores. La remisión de *N. meningitidis* a los centros de referencia en condiciones óptimas, forma parte de la vigilancia epidemiológica de la EM y contribuye extraordinariamente al conocimiento, identificación y caracterización de los aislamientos correspondientes a enfermos y portadores de períodos endémicos y epidémicos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

**3.1 Reactivos, medios de cultivo y equipos:** Los reactivos, medios de cultivo y equipos empleados en este trabajo, aparecen descritos en el anexo 3.

**3.2 Universo de trabajo y número de cepas procesadas :** El universo de trabajo estuvo constituido por el total de cepas de *N. meningitidis* conservadas en el cepario del Instituto Finlay (N = 1472), de éstas, 1017 pertenecían al período epidémico y 455 al post-epidémico. La muestra, correspondió al número de aislamientos de enfermos y portadores que fue posible investigar. En todos los casos, la selección se realizó de forma aleatoria y fue mayor del 20%. A continuación, se presenta su distribución y el número de cepas estudiadas en cada grupo y etapa.

Etapas	Cepas	No. Cepas conservadas	No. Cepas estudiadas	%
Epidémica	Enfermos	548	279	50,91
Epidémica	Portadores	469	104	22,17
Epidémica	Total	1017	383	37,65
Post-epidémica	Enfermos	163	150	92,02
Post-epidémica	Portadores	292	195	66,78
Post-epidémica	Total	455	345	75,82

**3.3 Cepas:** Las cepas estudiadas se agruparon, según su procedencia y objeto de estudio:

a) **Cepas utilizadas en los ensayos de los medios de transporte -conservación:** 221 cepas de *N. meningitidis*: 205 (enfermos) y 16 (portadores), pertenecientes al cepario del Instituto Finlay. Su distribución para cada ensayo se desglosa desde **3.4.4.1-3.4.4.4**

b) **Cepas utilizadas en la caracterización fenotípica (enfermos y portadores):** 728 cepas de *N. meningitidis* aisladas durante un período de 20 años (1982-02), pertenecientes al cepario del Instituto Finlay. Su distribución y características, aparece descrito en **3.5.1**.

c) **Cepas para el estudio de EEM:** 91 cepas de *N. meningitidis* B, aisladas de enfermos en el período 1985-92 y pertenecientes al cepario del Instituto Finlay.

d) **Cepas para el estudio de la sensibilidad a la penicilina:** 283 cepas de *N. meningitidis*, aisladas de enfermos y portadores durante el período 1982-02, pertenecientes al cepario del Instituto Finlay. Su distribución y características, aparece descrita en **3.7.1**.

e) **Cepas de Referencia:** Se emplearon como controles para las pruebas serológicas, pruebas bioquímicas de identificación y para la inoculación de los medios de transporte y conservación.

- **Cepas patrón de serogrupos de *N. meningitidis*:** A (M139), B (M166), C (M137), X (M405), Y (M406), Z (M406) y W<sub>135</sub> (M603), donadas gentilmente por el Dr. JA. Sáez-Nieto del Instituto

“Carlos III”, Majadahonda, España. Además, se utilizó la cepa vacunal cubana de *N. meningitidis* B (385/83) del cepario del Instituto Finlay.

- **Cepas patrón de serotipos y subtipos de *N. meningitidis*:** M1080 (1:P1.1,7), B16B6 (2a:P1.2), 2996 (2b:P1.2), 870227 (4:P1.10), M990 (6:P1.6), M982 (9:P1.9), S3032 (12:P1.12,16), S3446 (14:P1.6,14), H355 (15:P1.15), H44/76 (15:P1.7,16) y 882066 (NT:P1.4), donadas gentilmente por el Dr. JA. Sáez-Nieto del Instituto “Carlos III”, Majadahonda, España. Además, se utilizó la cepa vacunal cubana de *N. meningitidis* B (385/83) del cepario del Instituto Finlay.

- **Cepas patrón de inmunotipos de *N. meningitidis*:** M978 (L:8), 7880 (L:10) y 385/83 (L:3,7,9), del cepario del Instituto Finlay.

- **Cepas patrón para estudios isoenzimáticos de *N. meningitidis*:** C264/85 y C67/89 (ET-5), A35/92 y A64/92 (ET-37), A33/93 y A39/93 (ET-A4), caracterizadas y donadas gentilmente por la Dra. D. Caugant del Instituto Nacional de Salud Pública, Oslo, Noruega.

- **Otras cepas patrón:** *N. lactamica* (NCTC 10617), *N. gonorrhoeae* (MA1660), *N. polysaccharea* (N-1506), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Moraxella catarrhalis*, donadas gentilmente por el Dr. JA. Sáez-Nieto del Instituto Nacional de Salud “Carlos III”, Majadahonda, España.

- **Cepas controles para el método de sensibilidad a la penicilina:** *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, pertenecientes al cepario del Instituto Finlay.

### 3.4 Medio de Transporte y Conservación (TC)

**3.4.1 Composición del Medio TC:** Para preparar 1 L de medio se pesaron los siguientes compuestos: Nitrato Férrico 0.01 g.; L-glutamina 10.0 g.; Bicarbonato de Sodio 0.75 g.; Cbruro de Sodio 3.0 g.; Cloruro de Calcio 0.1 g.; Cloruro de Magnesio 0.1 g.; Ácido Tioglicólico 1.0 g.; Agar Noble 3.0 g.; Carbón 10.0g.; Almidón Soluble 5.0 g., Gelatina 10.0 g. y MOPS (3-{N-Morpholino} propane-sulfonic acid) 20.92 g. El pH final se ajustó a  $7.3 \pm 1$  (Sotolongo, 1995).

**3.4.2 Elaboración del Medio TC:** Después de pesar los componentes individualmente, tres de ellos: Agar, Gelatina y Almidón, se disolvieron y calentaron por separado hasta su disolución total en una parte del volumen de agua a utilizar. Seguidamente, se mezclaron todos los componentes y ya disueltos, se ajustó el pH ( $7.3 \pm 1$ ). Posteriormente, el medio se distribuyó (4 mL), en tubos con fondo plano de 90/15 mm y durante este proceso, se mantuvo en movimiento constante a  $90^{\circ}\text{C}$  en un agitador magnético con calor. Después de su distribución, se esterilizó a  $121^{\circ}\text{C}$ , 15 minutos, se dejó enfriar a la temperatura del laboratorio ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) y al día siguiente, se añadió a cada tubo, 200-300  $\mu\text{l}$  de líquido ascítico (LA) humano estéril. Se realizó prueba de esterilidad por incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una semana y posteriormente se almacenó a  $20-25^{\circ}\text{C}$  hasta su empleo. Se preparó también otro lote de Medio TC sin la adición de LA.

**3.4.3 Inoculación del Medio TC:** A partir de un cultivo puro de *N. meningitidis* de 18-24 horas de incubación en Agar Mueller Hinton más Suplemento Nm (AMHSN) (Sotolongo, 1995), se tomó mediante asa estéril desechable, un inóculo abundante de cada una de las cepas a conservar y éste, se depositó en las paredes del tubo, cercano a la superficie del medio, hasta lograr una suspensión densa en el LA. El medio inoculado, se incubó a 37 °C, 18-24 horas y posteriormente, se mantuvo a 20-25 °C durante el ensayo. En todos los experimentos, se realizaron resiembras periódicas a placas Petri de AMHSN y en cada oportunidad, se identificó el crecimiento bacteriano obtenido hasta serogrupo. La viabilidad se comprobó transcurridas las primeras 24 horas de incubación a 37 °C, la segunda verificación de viabilidad se hizo a los 7 días de conservación (20-25 °C), y posteriormente se continuó con resiembras periódicas cada 4 semanas hasta completar 6 meses (24 semanas). La descripción del Suplemento Nm aparece en el anexo 4.

### **3.4.4 Ensayos realizados con el Medio TC**

#### **3.4.4.1 Viabilidad de *N. meningitidis* en Medio TC**

**Cepas:** Se utilizaron 56 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, aisladas de enfermos y remitidas al LNRM. Para su inoculación en el Medio TC, las cepas se sembraron inicialmente en placas Petri de AMHSN (Sotolongo, 1995). Después de su incubación a 37 °C durante 18-24 horas, en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y previa comprobación de pureza por tinción de Gram, las cepas se inocularon en las diferentes variantes del Medio TC. En todos los ensayos, se realizaron resiembras periódicas a placas de AMHSN a las 24 horas, 7 días de conservación y cada 4 semanas hasta completar 6 meses. Después de cada resiembra, las placas se incubaron a 37 °C, 18-24 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>, identificándose el crecimiento bacteriano obtenido (según la periodicidad descrita), a partir de cada uno de los tubos de Medio TC inoculados.

Para este ensayo se confeccionaron tres grupos de estudio:

- a) Primer grupo: Compuesto por 25 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, se inoculó en Medio TC con LA, se incubó 18-24 horas a 37 °C y posteriormente, se conservó a 20-25 °C durante un período de 6 meses (24 semanas).
- b) Segundo grupo: Compuesto también por 25 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, se inoculó en Medio TC sin LA, se incubó 18-24 horas a 37 °C y posteriormente, se mantuvo 24 semanas a la temperatura de 20-25 °C.
- c) Tercer grupo: Compuesto por 6 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, se inoculó en Medio TC sin LA, se incubó 18-24 horas a 37 °C y a diferencia de los 2 grupos anteriores, se mantuvo a 37 °C durante 6 meses (24 semanas). En los tres ensayos, la viabilidad de las cepas se comprobó mediante subcultivos a placas Petri de AMHSN, según la metodología ya descrita.

#### 3.4.4.2 Viabilidad de *N. meningitidis* en Medio TC y otros medios de transporte -conservación

**Cepas:** Se utilizaron 21 cepas de *N. meningitidis*: 20 pertenecientes al serogrupo B (aisladas de enfermos) y 1 serogrupo A (cepa de referencia). Antes de la inoculación en Medio TC con LA y en el resto de los medios investigados, las cepas se sembraron paralelamente en placas Petri de Agar Chocolate (ACH) y AMHSN, se incubó 18-24 horas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y luego de confirmar la pureza del cultivo por tinción de Gram, se procedió a la inoculación en los diferentes medios de transporte y conservación investigados.

**Elaboración del resto de los medios de transporte y conservación:** Excepto el Medio TC con LA, que se elaboró e inoculó de la forma ya descrita, el resto, se preparó según las instrucciones del fabricante. Para su distribución y esterilización (121 °C, 15 minutos), se emplearon tubos con fondo plano (90/15 mm) y la siembra se realizó por punción. Ya inoculados, los medios se incubaron 18-24 horas a 37 °C y a partir de ese momento, se almacenaron 6 meses (24 semanas) a la temperatura de 20-25 °C. Durante el ensayo, se realizaron resiembras periódicas a placas de AMHSN, según la periodicidad descrita anteriormente. Estas placas se incubaron a 37 °C, 18-24 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y en cada oportunidad, se verificó hasta serogrupo, el crecimiento bacteriano obtenido a partir de cada uno de los medios inoculados. Se investigaron los siguientes medios: ACH, Cistina Tripticasa Agar (CTA), Agar Dextrosa Almidón (ADA) y Medio TC con LA.

#### 3.4.4.3 Viabilidad de *N. meningitidis* remitidas desde Turquía en Medio TC

**Cepas:** Se estudiaron 16 cepas de *N. meningitidis* (4 serogrupo A, 3 serogrupo B, 1 serogrupo Z, 1 serogrupo W<sub>135</sub>, y 7 cepas NA), aisladas de portadores en la República de Turquía e inoculadas en Medio TC con LA, una semana antes de su transportación a Cuba. Las cepas se remitieron al Laboratorio de Microbiología de la Dirección de Asistencia Científico Técnica Aplicada (DACTA) de Instituto Finlay, se sembraron, identificaron, inocularon y conservaron según la metodología ya descrita (Sotolongo, 1995). Se realizaron resiembras periódicas a placas de AMHSN durante 24 semanas y en cada oportunidad, se identificó hasta serogrupo, el crecimiento bacteriano obtenido.

#### 3.4.4.4 Viabilidad de *N. meningitidis* conservadas 12 años en Medio TC

**Cepas:** El Laboratorio de Microbiología de DACTA almacenaba desde 1985, en Medio TC con LA a 20-25 °C, 128 cepas de *N. meningitidis* B. Después de 12 años conservadas con las condiciones ya descritas, se constató que el medio inoculado mantenía sus características en cuanto a la hidratación, consistencia y apariencia. Esto nos motivó a comprobar la viabilidad e identificación de las cepas almacenadas en él. Cada una de las cepas conservadas en Medio TC, se sembraron en AMHSN, se incubaron a 37 °C, 18-24 horas en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y cada crecimiento bacteriano obtenido, se identificó según la metodología descrita anteriormente (Sotolongo, 1995).

#### 3.4.4.5 Criterios de viabilidad de *N. meningitidis* en Medio TC y otros medios de transporte-conservación

- a) Cepa viable: Si el crecimiento bacteriano obtenido a partir de las resiembras periódicas realizadas a placas de AMHSN, se correspondió con las cepas de *N. meningitidis* inoculadas.
- b) Cepa no viable: Si a partir de las resiembras periódicas realizadas a placas de AMHSN, no se obtuvo crecimiento bacteriano o éste, después de su identificación, no resultó *N. meningitidis*.

#### 3.4.4.6 Análisis estadístico de los resultados de los medios de transporte-conservación

Para los ensayos realizados con los medios de transporte y conservación se utilizaron:

- Prueba de significación para el análisis de sobrevida para varias muestras (extensión de los test de Gehan-Wilcoxon, Peto y “log-rank”).
- Test “long-rank” de análisis de sobrevida para parejas de muestras.
- Adicionalmente, se calcularon las medianas de las curvas de sobrevida, que en nuestro caso, es el momento en que se mantienen viables sólo el 50% de las cepas en estudio.
- Gráfico de sobrevida (Kaplan-Meier).
- En todas las figuras se marcó con una línea transparente el valor 0.5. La intersección de esta línea con cada curva, indica la mediana correspondiente (prolongación en el eje X).

### 3.5 Caracterización fenotípica de cepas de *N. meningitidis*.

#### 3.5.1 Cepas aisladas de enfermos y portadores

**Criterios de selección:** La cantidad de cepas de *N. meningitidis* procesadas siempre fue el máximo permitido por los recursos disponibles en DACTA. En todos los casos, la selección se realizó de forma aleatoria y la fracción del muestreo fue mayor del 20% (3.2). Se estudiaron 728 cepas aisladas durante 20 años (1982-02). Para su distribución e identificación, se tuvo en cuenta la incidencia de la EM que refleja el Anuario Estadístico de Salud en Cuba (2003), respecto a la incidencia y mortalidad por EM, 1976-03 (<http://www.sld.cu/anuario/indice.html>). Tomando en cuenta los aislamientos disponibles, las cepas se dividieron en dos etapas: a) Las de la etapa epidémica, correspondieron al período entre 1982-92 (incidencia de EM desde 12,8-1,3/100 000 habitantes) y las de la post-epidémica, pertenecieron a los aislamientos disponibles de los años 1993-02 (incidencia de EM desde 0,9-0,3/100 000 habitantes). En ambos grupos, las cepas procedieron de enfermos y portadores. Para su identificación y descripción, se empleó la siguiente terminología: EEE = enfermos de la etapa epidémica; PEE = portadores de la etapa epidémica; EEPE = enfermos de la etapa post-epidémica y PEPE = portadores de la etapa post-epidémica. Su número, distribución e identificación se muestra a continuación:

CEPAS (N = 728)								
1982-1992			1993-2002			1982-2002		
EEE	PEE	Total	EEPE	PEPE	Total	EEE + PEE	EEPE + PEPE	Total
279	104	383	150	195	345	383	345	728

La metodología de trabajo para todas las cepas incluyó: Cultivo y replicación bacteriana, identificación de género, especie y seroagrupamiento, según métodos convencionales (Sotolongo, 1995). Para la determinación de sero/subtipos e inmunotipos se utilizó el ELISA de células enteras con AcM (Abdillahi y Poolman 1987), modificado por García (1991).

**3.5.2 Cultivo y replicación bacteriana:** Las cepas se mantenían almacenadas en Medio TC con LA (20-25 °C), liofilizadas (4-8 °C) y/o crioconservadas en Leche Desnatada al 10% (-70 °C). A partir de la conservación correspondiente, se realizaron subcultivos a placas Petri de Agar Mueller Hinton más suero bovino al 5% (AMHSB), incubándose a 37 °C durante 18-24 horas y atmósfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%. Si en el momento de la lectura, el cultivo se encontraba contaminado, las cepas de *N. meningitidis* se reaislaron en AMHSB más VCN (suplemento inhibidor compuesto por 3 µg/mL de vancomicina, 750 µg/mL de colistina, 1250 µg/mL de nistatina) y se incubaron manteniendo las condiciones descritas previamente (Sotolongo, 1995).

**3.5.3 Pruebas de identificación y confirmación de cepas de *N. meningitidis*:** En todos los cultivos obtenidos se siguió el siguiente proceso de identificación: Tinción de Gram, producción de citocromo-oxidasa, producción de catalasa, detección de la actividad  $\gamma$ -Glutamil-aminopeptidasa, detección de la actividad  $\beta$ -Galactosidasa, detección de lipasas, detección de DNasa, producción de polisacárido en medio con 5% de sacarosa y utilización de carbohidratos (Glucosa, Maltosa, Lactosa, Sacarosa) (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.1 Producción de citocromo-oxidasa:** Se empleó una solución de Hidrocloruro de Tetrametil-Parafenilendiamina al 1%, la cual se impregnó en una tira de papel de filtro. Las colonias de las cepas a investigar, se extendieron sobre esta tira de papel y transcurridos unos pocos segundos, se observó la reacción producida.

Lectura e interpretación: En los casos positivos, inmediatamente se observó el ennegrecimiento de la estría realizada en el papel de filtro; en los casos negativos, no se produjo este cambio de color (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.2 Producción de catalasa** Se colocó una gota de Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% sobre una lámina portaobjetos. Luego, con la ayuda de un asa estéril desechable, una asada de la cepa a investigar se depositó sobre esta gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Lectura e interpretación: En los casos positivos, a los pocos segundos, se observó la producción de burbujas y en los negativos, no se visualizó esta reacción (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.3 Detección de la actividad g-Glutamil-aminopeptidasa:** Se determinó mediante el sistema Enzyline  $\gamma$ -GT 20S. Una suspensión bacteriana de las cepas a investigar, se depositó en la solución del reactivo preparada en el momento del ensayo (según instrucciones del fabricante), se mantuvo a la temperatura del laboratorio (20-25 °C) durante 30 minutos y posteriormente se realizó la lectura.

Lectura e interpretación: En los casos positivos, a los pocos minutos, la suspensión bacteriana tomó un color amarillo intenso y en los negativos, no hubo cambio de color alguno (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.4 Detección de la actividad b-Galactosidasa:** Se emplearon discos comerciales de ONPG (Ortonitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido). Se preparó una suspensión densa de las cepas a investigar en 0.5 mL de agua destilada, se añadió un disco de ONPG y se dejó 30 minutos a la temperatura del laboratorio (20-25 °C).

Lectura e interpretación: En los casos positivos, apareció en pocos minutos, un color amarillo intenso de la suspensión y en los negativos, no se produjo cambio de color (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.5 Detección de Lipasas:** Se utilizó el medio de Agar Tributirina Base más Tributirato de Glicerina en placas Petri y para su preparación, se siguieron las instrucciones del fabricante. Se sembró de forma circular (4 cepas por placa), por puntos de inoculación de aproximadamente 10 mm de diámetro, luego se incubó a 37 °C, 18-72 horas y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

Lectura e interpretación: En los casos positivos (colonias lipolíticas), se observaron halos claros alrededor de las cepas inoculadas. En las no lipolíticas, el medio de cultivo conservó su aspecto turbio alrededor del inóculo (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.6 Detección de DNasa:** Se utilizó Agar DNasa en placas Petri y para su preparación se siguieron las instrucciones del fabricante. Se sembró de forma circular (4 cepas por placa), por puntos de inoculación de aproximadamente 10 mm de diámetro; se incubó a 37 °C, 18-24 horas y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y posterior a la incubación, la placa se inundó con HCl.1N.

Lectura e interpretación: En los casos positivos, al inundar la placa con HCl, apareció un halo transparente alrededor de las cepas con actividad desoxirribonucleasa. En las cepas negativas, no se produjo esta reacción (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.7 Producción de polisacárido en medio con 5% de sacarosa:** Las cepas se inocularon en placas Petri de Agar Cerebro Corazón, preparado según instrucciones del fabricante. La siembra se realizó de forma circular (4 cepas por placa), por puntos de inoculación de aproximadamente 10 mm de diámetro; se incubó a 37 °C, 18-72 horas y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Posterior a la incubación, se añadieron algunas gotas de Lugol sobre el crecimiento bacteriano obtenido.

Lectura en interpretación: En los casos de producción de polisacárido, al añadir el Lugol sobre el cultivo, las colonias tomaron un color negro. En los casos negativos, no se produjo este cambio de color (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.8 Utilización de carbohidratos:** Como medio base se empleó Agar Mueller Hinton y como indicador se utilizó una solución de Azul de Bromotimol al 1,5%. Al medio base, se le añadieron los azúcares (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa) a una concentración del 1%, previamente esterilizados de forma independiente (filtros Sartorius 0.22  $\mu\text{m}$ ) en soluciones al 10%. Para la siembra, se tomó mediante asa estéril desechable, un inóculo bacteriano abundante y se sembró en placas Petri con cada uno de los azúcares incorporados al medio base. La siembra se realizó en un área de 10 mm de diámetro, se estudiaron simultáneamente entre 20-25 cepas por placa y se incubó a 37  $^{\circ}\text{C}$ , sin  $\text{CO}_2$ .

Lectura e interpretación: Se interpretó como reacción positiva, si alrededor de las cepas problemáticas, existió un cambio de color del indicador de pH (Azul de Bromotimol), de azul a amarillo. En los casos negativos, no se observó esta reacción (Sotolongo, 1995).

**3.5.3.9 Seroagrupamiento de cepas de *N. meningitidis*:** Se realizó por aglutinación en láminas portaobjetos con antiseros de grupos comerciales (A, B, C, X, Y, Z,  $\text{W}_{135}$ ). A partir de un cultivo puro, se realizó una suspensión densa en PBS. Posteriormente, una gota de cada suspensión se enfrentó a cada uno de los antiseros serogrupo específicos, se realizó una ligera rotación de la mezcla y durante 2 minutos, se observó la aparición de aglutinación (Sotolongo, 1995).

Lectura e interpretación: El resultado se definió en función del antisuero que aglutinó al ponerse en contacto con la suspensión bacteriana. Las cepas que no aglutinaron, las que lo hicieron con más de uno de los antiseros probados y aquellas que no aglutinaron con ninguno de éstos, se identificaron como cepas de *N. meningitidis* NA.

**3.5.3.10 Determinación de sero/subtipos e inmutipos:** Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras con AcM, según el protocolo descrito por Abdillahi y Poolman (1987), modificado por García (1991). Esta modificación consistió en disminuir a 1 hora el tiempo de incubación con el conjugado, y el empleo de Tween 20, en sustitución de Tween 80. Para determinar los sero/subtipos se empleó un panel comercial de AcM, del Instituto Nacional de Investigaciones para el Hombre y el Ambiente de Holanda (RIVM). Se utilizó, además, el AcM P1.19, donado por el Instituto Nacional para Control Biológico y Estándares del Reino Unido (NIBSC) y los AcM de inmutipos suministrados también por el NIBSC.

a) AcM para la determinación de serotipos: MN3C6B (1), MN2D3F (2a), MN2C3B (2b), MN14 G21 (4), MN5C8C (14), MN15A14H6 (15); b) AcM para la determinación de subtipos: MN14C2.3 (P1.1), MN16C13F4 (P1.2), MN20B9.34 (P1.4), MN22A9.19 (P1.5), MN19D6.13 (P1.6), MN14

C11.6 (P1.7), MN5A10F (P1.9), MN20F4.17 (P1.10), MN20A7.10 (P1.12), MN24H10.75 (P1.13), MN21G3.17 (P1.14), MN3C5C (P1.15), MN5C11G (P1.16) y al AcM P1.19 (NIBSC); c) AcM para la determinación de inmunitipos: 9-2-L3,7,9 (L3,7,9), 2-1-L8 (L8) y 14-1L10 (L10).

### 3.5.3.11 Criterios de identificación de cepas de *N meningitidis*

Los criterios que se tomaron en cuenta para considerar a las cepas como *N. meningitidis* fueron:

- |  |  |
|--|--|
| ⇒ Tinción de Gram: Diplococos Gram negativos<br>arriñonados.                             | ⇒ $\gamma$ -Glutamil-aminopeptidasa: Positiva.                         |
| ⇒ Oxidasa: Positiva.   | ⇒ $\beta$ -Galactosidasa: Negativa.                                    |
| ⇒ Catalasa: Positiva.  | ⇒ Lipasa: Negativa.  |
| ⇒ Utilización de azúcares: Glucosa y maltosa<br>positivas, lactosa y sacarosa negativas. | ⇒ DNasa: Negativa.   |
|  | ⇒ Producción de polisacárido en medio con 5% de<br>sacarosa: Negativa. |

Seroagrupamiento: Se determinó en función del antisuero que aglutinó al ponerse en contacto con la suspensión de *N. meningitidis*. Las cepas que no aglutinaron, las que lo hicieron con más de uno de los antisueros investigados y aquellas que no aglutinaron con ninguno, se identificaron como cepas de *N. meningitidis* NA.

Sero/subtipos/inmunitipos: La identificación de los sero/subtipos e inmunitipos se realizó tomando en cuenta las reacciones positivas frente a los AcM investigados.

Las cepas que no mostraron reacción positiva alguna frente a los AcM de serotipos, subtipos e inmunitipos, se identificaron como NT, NST, NIT (no inmunitipable), respectivamente.

### 3.5.3.12 Análisis estadístico de la caracterización fenotípica

Se calcularon proporciones, frecuencias absolutas y relativas. Además, se utilizó el test  $X^2$  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.

## 3.6 Determinación del tipo electroforético (ET) por electroforesis de enzimas multilocus (EEM)

**3.6.1 Cepas estudiadas por EEM:** 91 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B, aisladas en el período de 1985-92 y pertenecientes al cepario del Instituto Finlay. Se siguió la metodología descrita en 3.5, pero por no disponer en ese momento de los AcM de LOS y del P1.19, éstos no pudieron ser identificados en este grupo de cepas.

**3.6.2 Estudio del polimorfismo enzimático. Enzimas investigadas:** El estudio se realizó por electroforesis en geles de almidón (Selander y cols., 1986) y se investigaron un total de 14 enzimas: Enzima Málica (ME); Glucosa 6fosfosfato (GGP); Peptidasas (PEP); Isocitrato Deshidrogenasa (IDH); Aconitasa (ACO); Glutamato Deshidrogenasa-NAD (GD1); Glutamato Deshidrogenasa-NADP (GD2); Alcohol Deshidrogenasa (ADH); Fumarasa (FUM); Fosfatasa Alcalina (ALK); Indofenol Oxidasa 1 (IP1); Indofenol Oxidasa 2 (IP2); Adenilato Kinasa (ADK); Deshidrogenasa

desconocida (UDH). Las soluciones estabilizadoras para estas enzimas, así como las soluciones de tinción se prepararon siguiendo la metodología descrita por Selander y colaboradores (1986).

**3.6.3 Preparación de los extractos enzimáticos:** La obtención de los extractos enzimáticos se realizó según Selander y colaboradores (1986). Para obtener suficiente concentración de enzimas en los lisados microbianos, las cepas se sembraron en placas Petri de Agar Mueller Hinton con sangre de carnero al 5 % (AMHSC), se incubaron a 37 °C, 18-24 horas y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Concluida esta incubación, se colectó la biomasa con hisopo estéril y se transfirió a un Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de Caldo Mueller Hinton, se incubó a 37 °C durante 18 horas en una zaranda orbital a 170 rpm. Previamente, a todos los cultivos se les realizó un control de pureza por tinción de Gram. Las células que se obtuvieron por centrifugación, se resuspendieron en 2 mL de una solución de lisis (10nM Tris-1mM EDTA-0.5 mM NADP, pH 6.8). El ajuste del pH se realizó mediante la adición de aproximadamente 18 mL de HCl concentrado. La suspensión se manipuló con cuidado, garantizando que no quedaran agregados de células, y posteriormente se congeló a -20 °C durante 72 horas. Los lisados obtenidos se descongelaron y filtraron a través de filtros de 0.45 µm (Sartorius), y los extractos enzimáticos colectados, se almacenaron debidamente rotulados a -70 °C, hasta la realización de la electroforesis.

**3.6.4 Electroforesis en geles de almidón:** Se emplearon cámaras horizontales elaboradas en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC), de acuerdo al protocolo propuesto por la Dra. Caugant del Instituto Nacional de Salud de Oslo, Noruega. Para la preparación de los geles y la corrida electroforética, se mantuvo el sistema de corrida diseñado para cada enzima (Selander y cols., 1986). Entre las muestras a estudiar, se insertaron extractos enzimáticos correspondientes a las cepas patrones descritas en 3.3. El grado de separación de los electromorfos dependió del pH del gel y/o la corrida y de la concentración del almidón en el gel.

**3.6.5 Tinción específica de las enzimas:** La tinción se basó en poner de manifiesto la actividad enzimática sobre el propio gel por adición del sustrato, coenzima y un indicador de oxidoreducción que dio origen a un compuesto coloreado. Concluida la corrida, los geles se retiraron cuidadosamente de los moldes y a cada uno de ellos, se le realizaron cuatro cortes transversales de modo de que cada gel facilitó el estudio de 4 enzimas diferentes. Las enzimas se enumeraron en 3.6.2 y las soluciones empleadas para el revelado o tinción, así como las condiciones específicas para cada una, fueron descritas por Selander y colaboradores (1986). Se puso especial cuidado para garantizar que todos los geles quedaran cubiertos por la solución de tinción y se incubaron a 37 °C en la oscuridad hasta la aparición de las bandas. La visualización de estas bandas se realizó entre los 10-30 minutos siguientes y una vez observadas, se eliminó la solución de tinción, se lavó con agua

destilada (excepto en los casos donde la tinción se realizó sobre fase sólida en agar) y se añadió la solución fijadora compuesta por: Ácido Acético, Metanol y agua (1:5:5) (Selander y cols., 1986).

**3.6.6 Lectura de los geles:** La movilidad electroforética para cada una de las cepas procesadas se realizó visualmente, comparando la movilidad relativa de los electromorfos (alelos) para cada una de las enzimas. Cada uno fue enumerado en orden decreciente de migración anódica, intercalando entre los extractos a estudiar, lisados de cepas con variante de electromorfo conocida para una enzima específica. Cada cepa se caracterizó por su combinación de electromorfos de las enzimas estudiadas, que configuraron un ET. Por lo tanto, cada ET, agrupó a las cepas que presentaron una movilidad electroforética idéntica en todas las enzimas.

**3.6.7 Análisis estadístico de los resultados de la EEM:** Los datos se exponen en tablas de contingencia y los estimadores empleados fueron: media aritmética y proporciones, así como indicadores propios de la diversidad genética. Para las pruebas de comparación se empleó el método de  $X^2$ . Los niveles de significación se situaron en 0.05 y 0.01. Para determinar la diversidad genética en los “loci”, fue necesario conocer la frecuencia de los distintos alelos. La diversidad genética se calculó empleando simultáneamente dos paquetes estadísticos: ETDI versión 2.2 desarrollado por el Dr. Whittam TS, del Departamento de Biología, Universidad Estatal de Pennsylvania, Estados Unidos (Selander y cols., 1986), donado por la Dra. Caugant y el paquete estadístico (Estela versión 3.01) desarrollado por el Dr. Loren del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, España (Fusté y cols., 1996), donado gentilmente por el propio autor. El índice de asociación se calculó según Smith y colaboradores (1993).

### 3.7 Sensibilidad a la penicilina de cepas de *N. meningitidis*

**3.7.1 Cepas de *N. meningitidis* estudiadas :** El Laboratorio de Microbiología de DACTA, disponía de recursos suficientes para realizar un estudio de sensibilidad a la penicilina que comprendiera aproximadamente 300 cepas y se pudieron investigar 283: 141 aislamientos de la etapa epidémica y 143 de la post-epidémica. Todas pertenecían al cepario del Instituto Finlay y para su distribución e identificación se tuvieron en cuenta los criterios ya descritos en **3.5.1**.

Entre los aislamientos de EEE y PEE se incluyeron cepas correspondientes a la etapa 1982-92 y entre los EEPE y PEPE, se conservaban viables aislamientos pertenecientes a los años 1998-02. La distribución e identificación de las cepas, se desglosa a continuación:

CEPAS (N = 283)								
1982-1992			1998-2002			1982-2002		
EEE	PEE	Total	EEPE	PEPE	Total	EEE + PEE	EEPE + PEPE	Total
76	65	141	14	128	142	141	142	283

En estas 283 cepas, se aplicó la misma metodología de trabajo descrita en **3.5**

**3.7.2 Método de sensibilidad antimicrobiana a la penicilina:** La sensibilidad a la penicilina se investigó por el método de dilución en agar, determinándose la CMI, de acuerdo a las normas y recomendaciones del Comité Nacional de Estándares del Laboratorio Clínico (NCCLS, 2003).

**3.7.3 Determinación de la CMI:** A partir del polvo de penicilina, con una potencia de 1 000  $\mu\text{g/mL}$ , se preparó la “solución madre” (concentración de 960  $\mu\text{g/mL}$ ). Posteriormente, de esta “solución madre” diluida 1:10, se realizó diluciones dobles en agua destilada estéril y se obtuvieron los rangos de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) investigados (0.004, 0.008, 0.016, 0.032, 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Como medio de cultivo se utilizó AMHSC, al que se le añadió en el momento de la preparación, 2 mL de las diluciones dobles de penicilina previamente obtenidas, dispensándose finalmente 20 mL del medio AMHSC en placas Petri estériles (10x100). Se hicieron también placas controles de AMHSC sin penicilina. El inóculo bacteriano, se obtuvo a partir de un cultivo puro de *N. meningitidis* en AMHSB, incubado 18-20 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Previa comprobación de pureza por tinción de Gram, se realizó suspensión del microorganismo en 4 mL de SSTF, hasta alcanzar una turbidez similar a la del patrón 0.5 de McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Inmediatamente, las suspensiones se diluyeron 1:10 y se depositaron en el multirreplicador (Steer), mediante pipetas estériles. A continuación, las suspensiones bacterianas se inocularon en placas Petri de AMHSC sin penicilina (placa control) y en placas de AMHSC con las diluciones de penicilina (0.004-4  $\mu\text{g/mL}$ ). El replicador depositó 0.002 mL de cada una de las suspensiones bacterianas, inoculando alrededor de  $10^4$  UFC. Concluida la siembra, se incubó 18-24 horas a 37 °C y atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. En todas las ocasiones, se incluyeron placas controles (AMHSC sin penicilina). En estas placas se observó el crecimiento adecuado de *N. meningitidis* y las cepas controles (*E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 29213). Transcurrido ese período de tiempo, se procedió a la lectura e interpretación por dos personas diferentes (NCCLS, 2003).

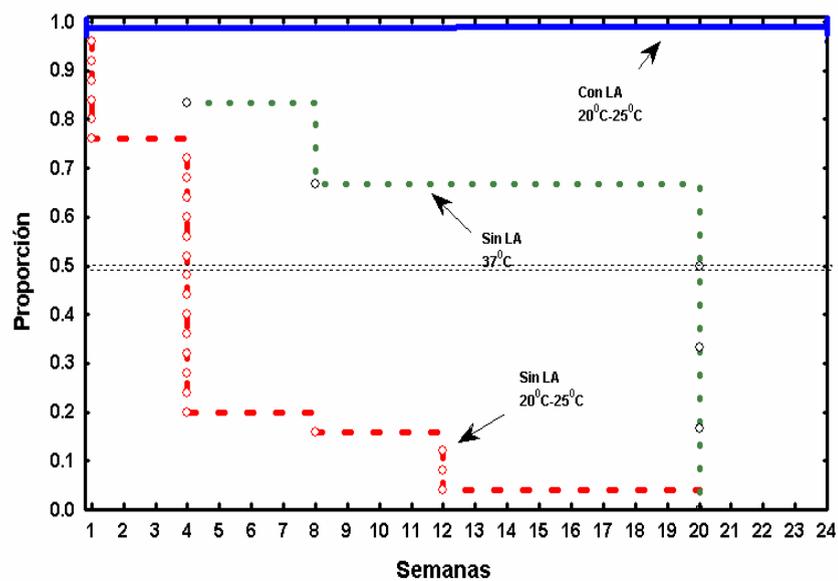
**3.7.4 Criterios de interpretación de la CMI:** La lectura e interpretación se realizó colocando las placas cultivadas sobre un fondo oscuro. No se tomó en cuenta el crecimiento bacteriano apenas visible, ni el de una sola colonia. Se interpretó como CMI, la menor concentración de penicilina capaz de inhibir el crecimiento bacteriano y se emplearon las categorías de sensible (S), sensibilidad disminuida (SD) y resistente (R), según los rangos de CMI establecidos para este antimicrobiano. S = CMI:  $\leq 0.06$   $\mu\text{g/mL}$ ; SD = CMI: 0.12- 1 $\mu\text{g/mL}$  y R = CMI:  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  (NCCLS, 2003).

**3.7.5 Análisis estadístico de la sensibilidad a la penicilina:** Se calcularon proporciones, frecuencias absolutas y relativas. Además, se utilizó el test  $\chi^2$  o el test exacto de Fisher para el análisis tradicional de tablas de contingencia. Para proporciones de interés, se calcularon intervalos de confianza por el método aproximado de Wilson.

## **4. RESULTADOS**

#### 4. RESULTADOS

**4.1 Medio TC:** Al analizar los resultados obtenidos con las variantes del Medio TC (incorporación o ausencia de LA) y temperaturas de incubación ensayadas (37 y 20-25 °C), la proporción de cepas de *N. meningitidis* viables, fue superior en TC con LA conservado a 20-25 °C. En esta variante, todas las cepas mantuvieron su viabilidad durante las 24 semanas del experimento. Sin embargo, en TC sin LA incubado a 37 °C, la viabilidad descendió a partir de la cuarta semana y no se recuperó ninguna cepa, en la resiembra correspondiente a las 20 semanas. En la modalidad de TC sin LA conservado a 20-25 °C, la pérdida de *N. meningitidis* se inició desde los primeros 7 días y al igual que en la modalidad anterior, no hubo crecimiento bacteriano en la resiembra realizada a las 20 semanas (Figura 1). La prueba de significación del análisis de sobrevida para varias muestras rechazó ( $p = 0.00001$ ) la igualdad de las tres variantes y el Test de “long-rank”, comprobó que todas las modalidades fueron significativamente diferentes entre si ( $p \leq 0.00053$ ).



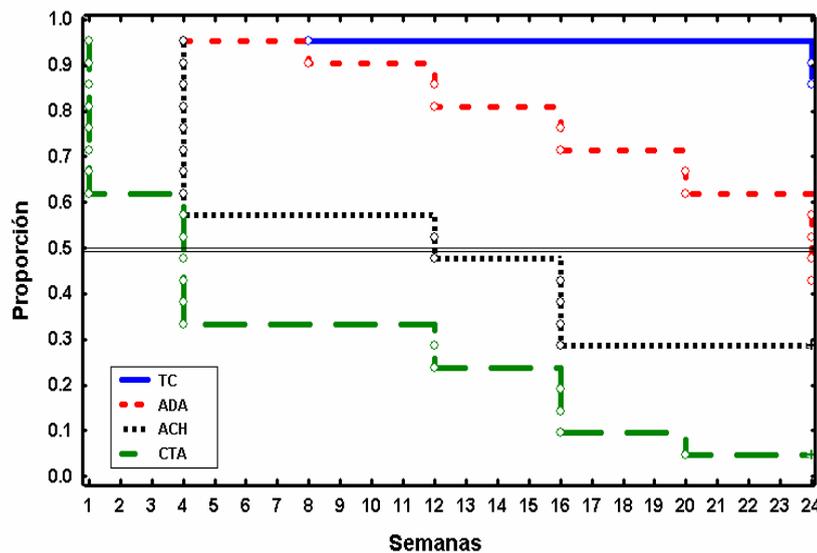
Leyenda: LA = Líquido ascítico

Figura 1. Viabilidad de cepas de *N. meningitidis* en Medio TC. Comparación de los resultados según la temperatura de incubación e incorporación o ausencia de líquido ascítico

La Figura 2, muestra la proporción de aislamientos viables en los diferentes medios investigados. La curva de viabilidad de las cepas de *N. meningitidis* en el Medio TC con LA (TC+LA) es la más externa y por lo tanto, la de mejor comportamiento a priori. La prueba de significación múltiple detectó diferencias ( $p = 0.00001$ ) entre los medios inoculados a partir de los cultivos en AMHSN. En todos los casos, las comparaciones entre las parejas de medio fueron significativas. Estos

últimos niveles de significación pueden verse en el anexo 6. Las medianas obtenidas fueron de: 24, 24, 12 y 4 semanas para los medios TC+LA, ADA, ACH y CTA, respectivamente.

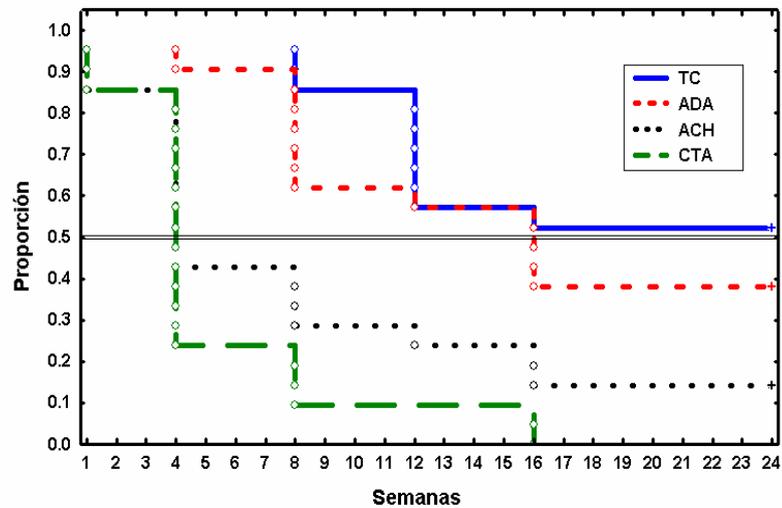
La Figura 3, expone los resultados del ensayo realizado con las mismas condiciones anteriores, pero en esta oportunidad, los medios investigados se inocularon a partir de cepas cultivadas en ACH. En esta variante, el Medio TC+LA resultó nuevamente la mejor opción. Las medianas fueron de 24, 16, 4 y 4 semanas para TC, ADA, ACH y CTA, respectivamente. Hubo diferencias entre los distintos medios ( $p = 0.00001$ ). Sólo las parejas TC y ADA, así como ACH y CTA, no fueron significativamente diferentes ( $p > 0.12$ ). Los niveles de significación aparecen en el anexo 7. Al compararlo con los resultados del ensayo anterior, se observó que para cada tipo de medio, las medianas obtenidas fueron iguales o mayores que en éste.



Leyenda: TC = Transporte-Conservación; ADA = Agar Dextrosa Almidón; ACH = Agar Chocolate; CTA = Cistina Tripticasa Agar

Figura 2. Viabilidad de *N. meningitidis* en diferentes medios de transporte y conservación inoculados a partir de cepas cultivadas en AMHSN

Los resultados del Medio TC + LA, conservado a 20-25 °C para el traslado de cepas desde Turquía, se reflejan en la Figura 4. En esta oportunidad, la mediana fue de 16 semanas. Un resultado no esperado ni planificado, resultó el hallazgo de cepas de *N. meningitidis* viables (14,1%), entre 128 aislamientos almacenados en TC + LA (20-25 °C) durante un período de 12 años (Figura 5).



Leyenda: TC = Transporte-Conservación; ADA = Agar Dextrosa Almidón; ACH = Agar Chocolate; CTA = Cistina Tripticasa Agar

Figura 3. Viabilidad de *N. meningitidis* en diferentes medios de transporte y conservación inoculados a partir de cepas cultivadas en ACH

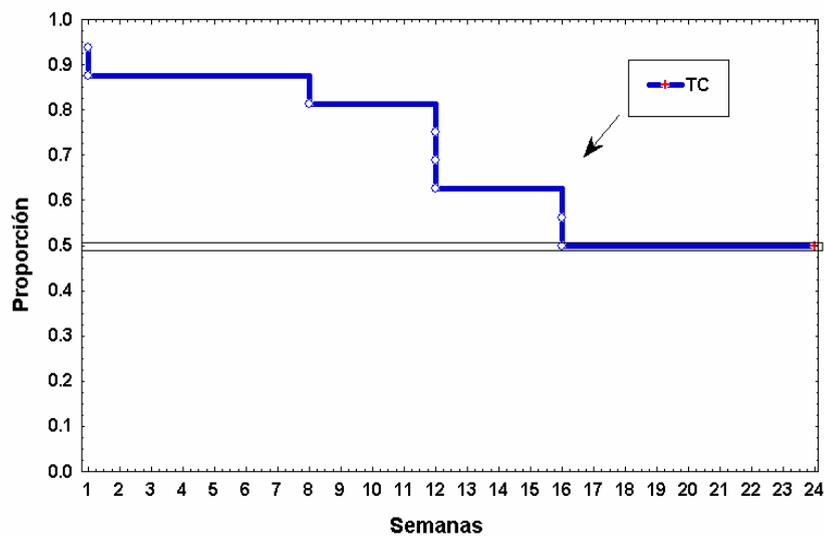


Figura 4. Viabilidad de cepas de *N. meningitidis* transportadas en Medio TC desde Turquía

**4.2 Caracterización fenotípica:** La Tabla 1, muestra los serogrupos de *N. meningitidis* detectados en cepas aisladas durante la epidemia (EEE y PEE). En ambos grupos predominó el serogrupo B, pero en los EEE (96,77%), el porcentaje fue superior al de los PEE (67,30%). El serogrupo C, sólo se aisló entre EEE (1,43%). Sin embargo, al analizar y comparar las cepas NA ( $p < 0.05$ ), éstas prevalecieron entre los aislamientos correspondientes a PEE (32,70%).

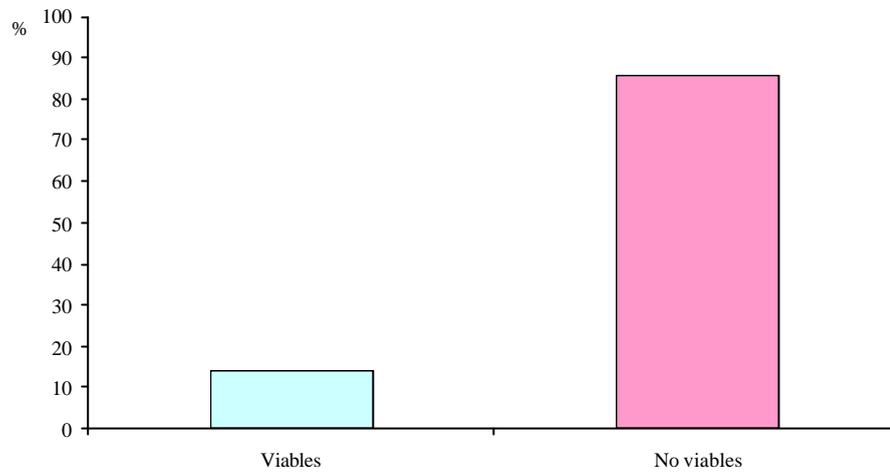


Figura 5. Viabilidad de cepas de *N. meningitidis* en Medio TC, después de 12 años conservadas a la temperatura de 20-25 °C

Tabla 1. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores correspondientes a la etapa epidémica, según serogrupos

Serogrupos	EEE		PEE		Total	
	N	%	N	%	N	%
B	270	96,77	70	67,30	340	88,78
C	4	1,43	0	0,0	4	1,04
NA*	5	1,80	34	32,70	39	10,18
Total	279	100,0	104	100,0	383	100,0

\* p < 0.05 entre cepas de EEE y PEE

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; NA = No agrupable

El serotipo 4 (Tabla 2), predominó en EEE (85,66%) y PEE (70,20%). Sin embargo, el serotipo 15, mostró porcentajes bajos en ambos grupos. Al analizar las cepas NT ( $p < 0.05$ ), el mayor número de aislamientos se detectó entre los PEE (23,08%), a diferencia del 6,45% encontrado en EEE. Otros serotipos, estuvieron pobremente representados en las cepas de PEE: 2b (0,96%) y 1 (0,96%).

La Tabla 3, refleja la diversidad de subtipos presentes en las cepas del período epidémico. En EEE y PEE prevaleció el P1.19,15, aunque resultó superior en EEE (78,49%). Sin embargo, las P1.NST predominaron entre los aislamientos de PEE (17,30%) y el subtipo P1.15, mostró porcentajes bajos

y similares en ambos grupos: EEE (3,58%) y PEE (2,88%). El subtipo P1.5,2 (2,50%), se detectó en cepas correspondientes a EEE.

Tabla 2. Distribución de las cepas *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica, según serotipos

Serotipos	EEE		PEE		Total	
	N	%	N	%	N	%
4	239	85,66	73	70,20	312	81,46
15	22	7,89	5	4,80	27	7,05
2b	0	0,0	1	0,96	1	0,26
1	0	0,0	1	0,96	1	0,26
NT*	18	6,45	24	23,08	42	10,97
Total	279	100,0	104	100,0	383	100,0

\*  $p < 0.05$  entre cepas de EEE y PEE

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; NT = No tipable

Al analizar y comparar los resultados correspondientes al inmunotipaje ( $p > 0.05$ ), el inmunotipo L3,7,9 estuvo presente en la mayoría de las cepas. Ambos grupos mostraron cifras similares: EEE (85,66%) y PEE (88,46%). Sin embargo, los inmunotipos L3,7,9,8 y L8, exhibieron cifras inferiores y semejantes. El número de cepas NIT resultó bajo: EEE (2,86%) y PEE (1,92%) (Tabla 4).

La Tabla 5, muestra la gran diversidad de asociaciones fenotípicas de ambos grupos, aunque esta variedad resultó mayor entre los EEE. El fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 presentó los porcentajes más altos: EEE (65,60%) y PEE (48,08%). Sin embargo, entre los EEE, la asociación B:4:P1.19,15:L3,7,9,8 le siguió en orden de frecuencia (9,31%) y en los PEE, el segundo lugar correspondió al fenotipo NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (11,54%). Dentro del serogrupo C, 3 cepas se identificaron como C:4:P1.19:L3,7,9 (1,07%) y 1, perteneció al fenotipo C:NT:P1.15:L3,7,9 (0,36%).

La Tabla 6, expone los serogrupos detectados en los EEPE y PEPE. Existió diferencia significativa al comparar los resultados entre las cepas del serogrupo B y las NA ( $p < 0.05$ ). En los EEPE, el 100% resultó B, mientras que entre PEPE, el porcentaje disminuyó al 26,67%. Sin embargo, en PEPE, prevalecieron las cepas NA (70,77%), contrastando con su no detección en los aislamientos de EEPE. Existieron también cepas W<sub>135</sub> (1,54%), Y (0,51%) y Z (0,51%) en cepas de PEPE.

Al analizar los serotipos correspondientes a la etapa post-epidémica (Tabla 7), se observó que las cepas NT se distribuyeron fundamentalmente entre los PEPE (60,51%), mientras que el serotipo 4

prevalció en los EEPE (88,0%) ( $p < 0.05$ ). En las cepas de enfermos de esta etapa no existió una gran variedad de serotipos, la diversidad resultó mayor entre PEPE.

Tabla 3. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica, según subtipos

Subtipos	EEE	PEE	Total
	N (%)	N (%)	N (%)
P1.19,15	219 (78,49)	64 (61,54)	283 (73,89)
P1.NST	17 (6,10)	18 (17,30)	35 (9,14)
P1.12,15	4 (1,43)	0 (0,0)	4 (1,05)
P1.5,2	7 (2,50)	0 (0,0)	7 (1,83)
P1.15	10 (3,58)	3 (2,88)	13 (3,39)
P1.4	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.16	3 (1,08)	0 (0,0)	3 (0,79)
P1.5,13	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.13	1 (0,36)	4 (3,84)	5 (1,30)
P1.12,16	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.7,19	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.6	1 (0,36)	8 (7,70)	9 (2,35)
P1.19	6 (2,15)	5 (4,80)	11 (2,88)
P1.7,15	4 (1,43)	0 (0,0)	4 (1,04)
P1.2	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.5	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.19,13	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
P1.12	0 (0,0)	1 (0,97)	1 (0,26)
P1.7,1	0 (0,0)	1 (0,97)	1 (0,26)
Total	279 (100,0)	104 (100,0)	383 (100,0)

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; NST = No subtipable

Las cepas de la etapa post-epidémica mostraron una gran diversidad de subtipos (Tabla 8), variedad que resultó más evidente entre PEPE. El análisis y la comparación de los subtipos identificados en este período, mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en: a) P1.NST: EEPE (10,0%), PEPE (30,78%); b) P1.4: EEPE (0,67%), PEPE (15,39%); c) P1.13: EEPE (0,67%), PEPE (13,84%) y d) P1.19,15: EEPE (78,0%), PEPE (5,65%). En las cepas de enfermos de la etapa post-epidémica, prevaleció el subtipo P1.19,15 (78%), mientras que en los aislamientos de PEPE, el segundo lugar lo ocuparon las cepas identificadas como P1.NST (30,78%).

Tabla 4. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica, según inmunotipos

Inmunotipos	EEE		PEE		Total	
	N	%	N	%	N	%
L3,7,9	239	85,66	92	88,46	331	86,42
L3,7,9,8	27	9,68	9	8,66	36	9,40
L8	5	1,80	1	0,96	6	1,56
LNIT	8	2,86	2	1,92	10	2,62
Total	279	100,0	104	100,0	383	100,0

$p > 0.05$

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; NIT = No inmunotipable

Los inmunotipos correspondientes a las cepas de la etapa post-epidémica, exhibieron una mayor diversidad ( $p > 0.05$ ), variedad que resultó más evidente en PEPE. El inmunotipo L3,7,9 predominó en EEPE (98,66%) y PEPE (92,30%). Además, el número de cepas NIT resultó muy bajo (Tabla 9).

Los fenotipos correspondientes al período post-epidémico se exponen en la Tabla 10. En los EEPE, no existió gran variedad, la mayoría se identificó como B:4:P1.19,15:L3,7,9 (77,34%). El resto de los fenotipos detectados, estuvo representado por un reducido número de aislamientos. No sucedió así entre las cepas de PEPE; en este grupo, la diversidad de asociaciones resultó mayor, aunque prevalecieron las cepas identificadas como NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (18,46%), NA:NT:P1.13:L3,7,9 (12,30%), B:4:P1.4:L3,7,9 (11,28%) y NA:15:P1.6:L3,7,9 (8,71%). Entre los PEPE, el fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 sólo se detectó en 10 cepas (5,12%).

Tabla 5. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica, según fenotipos

Fenotipos	EEE	PEE	Total
	N (%)	N (%)	N (%)
B:4:P1.19,15:L3,7,9	183 (65,60)	50 (48,08)	233 (60,84)
B:4:P1.19,15:L3,7,9,8	26 (9,31)	9 (8,66)	35 (9,14)
B:15:P1.15:L3,7,9	8 (2,88)	0 (0,0)	8 (2,09)
B:NT:P1.NST:L3,7,9	8 (2,88)	1 (0,96)	9 (2,35)
B:4:P1.NST:L3,7,9	6 (2,16)	1 (0,96)	7 (1,83)
B:4:P1.5,2:L3,7,9	5 (1,79)	0 (0,0)	5 (1,30)
B:4:P1.12,15:L3,7,9	4 (1,43)	0 (0,0)	4 (1,04)
B:15:P1.7,15:LNIT	4 (1,43)	0 (0,0)	4 (1,04)
B:NT:P1.19,15:L8	3 (1,07)	0 (0,0)	3 (0,78)
NA:4:P1.19,15:L3,7,9	3 (1,07)	0 (0,0)	3 (0,78)
C:4:P1.19:L3,7,9	3 (1,07)	0 (0,0)	3 (0,78)
B:15:P1.16:L3,7,9	3 (1,07)	0 (0,0)	3 (0,78)
B:15:P1.NST:L3,7,9	2 (0,71)	0 (0,0)	2 (0,53)
B:4:P1.19,15:LNIT	2 (0,71)	0 (0,0)	2 (0,53)
NA:NT:P1.19,15:L3,7,9	2 (0,71)	4 (3,85)	6 (1,57)
B:NT:P1.5,2:L3,7,9	2 (0,71)	0 (0,0)	2 (0,53)
B:4:P1.4:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:4:P1.5,13:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:15:P1.13:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:15:P1.12,16:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:15:P1.7,19:LNIT	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:15:P1.6:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
C:NT:P1.15:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:15:P1.2:L8	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:4:P1.19:LNIT	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:4:P1.NST:L8	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:NT:P1.15:L3,7,9	1 (0,36)	1 (0,96)	2 (0,53)
B:4:P1.19:L3,7,9	1 (0,36)	4 (3,85)	5 (1,30)
B:4:P1.19:L3,7,9,8	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:NT:P1.5:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
B:NT:P1.19,13:L3,7,9	1 (0,36)	0 (0,0)	1 (0,26)
NA:NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	12 (11,54)	12 (3,13)
NA:15:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	5 (4,81)	5 (1,30)
NA:NT:P1.13:L3,7,9	0 (0,0)	4 (3,85)	4 (1,04)
NA:NT:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	2 (1,92)	2 (0,53)
NA:NT:P1.NST:LNIT	0 (0,0)	2 (1,92)	2 (0,53)
B:4:P1.15:L3,7,9	0 (0,0)	2 (1,92)	2 (0,53)
NA:2b:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
B:NT:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
NA:4:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
NA:NT:P1.12:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
NA:1:P1.1,7:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
B:4:P1.19:L8	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
NA:P1.19:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,96)	1 (0,26)
<b>Total</b>	<b>279 (100,0)</b>	<b>104 (100,0)</b>	<b>383 (100,0)</b>

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; NA = No agrupable; NT = No tipable; NIT = No inmunotipable

Tabla 6. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores correspondientes a la etapa post-epidémica, según serogrupos

Serogrupos	EEPE		PEPE		Total	
	N	%	N	%	N	%
B*	150	100,0	52	26,67	202	58,56
NA*	0	0,0	138	70,77	138	40,00
W <sub>135</sub>	0	0,0	3	1,54	3	0,86
Y	0	0,0	1	0,51	1	0,29
Z	0	0,0	1	0,51	1	0,29
Total	150	100,0	195	100,0	345	100,0

\*  $p < 0.05$  entre cepas EEPE y PEPE

Leyenda: EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica; NA = No agrupable

Tabla 7. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores correspondientes a la etapa post-epidémica, según serotipos

Serotipos	EEPE		PEPE		Total	
	No	%	No	%	No	%
NT*	8	5,33	118	60,51	126	36,53
1	0	0,0	1	0,51	1	0,28
4*	132	88,0	46	23,59	178	51,60
14	0	0,0	5	2,56	5	1,45
15	10	6,67	25	12,83	35	10,14
Total	150	100,0	195	100,0	345	100,00

\*  $p < 0.05$  entre cepas de EEPE y PEPE

Leyenda: EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica; NA = No agrupable; NT = No tipable

Tabla 8. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa post-epidémica, según subtipos

Subtipos	EEPE		PEPE		Total	
	No	%	No	%	No	%
P1.NST*	15	10,00	60	30,78	75	21,73
P1.2	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.5,2	4	2,66	0	0,00	4	1,16
P1.4*	1	0,67	30	15,39	31	8,98
P1.5	0	0,00	7	3,59	7	2,02
P1.6	0	0,00	24	12,31	24	6,95
P1.7	0	0,00	12	6,16	12	3,47
P1.7,10	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.7,13	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.10	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.10,4	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.12	0	0,00	7	3,59	7	2,02
P1.13*	1	0,67	27	13,84	28	8,11
P1.14	0	0,00	7	3,59	7	2,02
P1.15	4	2,66	3	1,54	7	2,02
P1.19	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.19,15*	117	78,00	11	5,65	128	37,10
P1.10,13	0	0,00	1	0,51	1	0,29
P1.12,15	4	2,66	0	0,00	4	1,14
P1.16	2	1,34	0	0,00	2	0,58
P1.12,16	1	0,67	0	0,00	1	0,29
P1.5,13	1	0,67	0	0,00	1	0,29
Total	150	100,0	195	100,0	345	100,0

\*  $p < 0.05$  entre cepas de EEPE y PEPE

Leyenda: EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica; NA = No agrupable; NST = No subtipable

Tabla 9. Distribución de cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa post - epidémica, según inmunotipos

Inmunotipos	EEPE		PEPE		Total	
	No	%	No	%	No	%
L3,7,9	148	98,66	180	92,30	328	95,07
L3,7,9,8	1	0,67	1	0,51	2	0,57
L10	0	0,0	4	2,06	4	1,16
L3,7,8,9,10	0	0,0	1	0,51	1	0,29
L8	0	0,0	3	1,54	3	0,88
LNIT	1	0,67	6	3,08	7	2,03
Total	150	100,0	195	100,0	345	100,0

p>0.05

Leyenda: EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica; NIT = No inmunotipable

**4.3 Caracterización por EEM:** La Figura 6, muestra el predominio del serotipo 4 (67%), en las 91 cepas epidémicas del serogrupo B estudiadas también por EEM. Los serotipos 15 (29,7%) y 2b (3,3%) mostraron porcentajes inferiores.

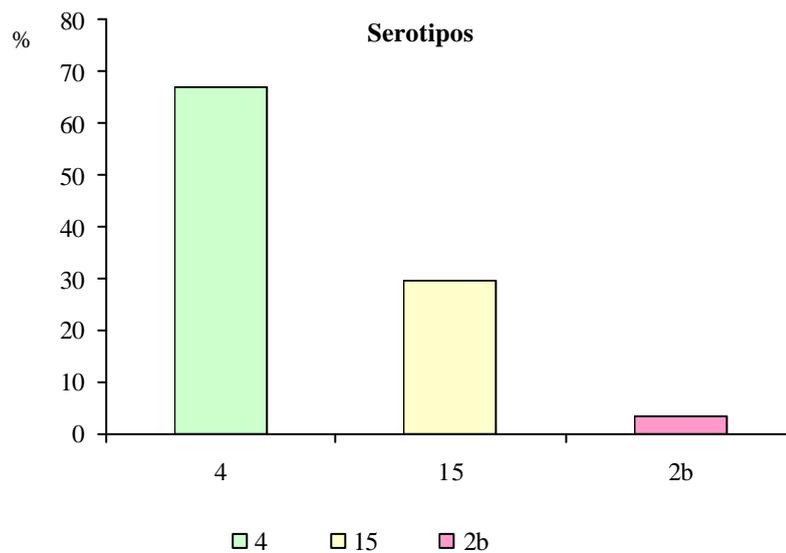


Figura 6. Serotipos entre 91 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B estudiadas por EEM

Tabla 10. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa post-epidémica, según fenotipos

Fenotipos	EEPE N (%)	PEPE N (%)	Total N (%)
NA:NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	36 (18,46)	36 (10,44)
NA:NT:P1.13:L3,7,9	0 (0,0)	24 (12,30)	24 (6,96)
B:4:P1.4:L3,7,9	1 (0,66)	22 (11,28)	23 (6,67)
NA:15:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	17 (8,71)	17 (4,93)
B:4:P1.19,15:L3,7,9	116 (77,34)	10 (5,12)	126 (36,52)
NA:NT:P1.12:L3,7,9	0 (0,0)	7 (3,58)	7 (2,02)
NA:NT:P1.7:L3,7,9	0 (0,0)	6 (3,07)	6 (1,74)
NA:NT:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	6 (3,07)	6 (1,74)
NA:NT:P1.4:L3,7,9	0 (0,0)	4 (2,05)	4 (1,16)
B:4:P1.NST:L3,7,9	6 (4,0)	4 (2,05)	10 (2,89)
NA:NT:P1.NST:L10	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
B:NT:P1.14:L3,7,9	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
W <sub>135</sub> :NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
NA:14:P1.7:L3,7,9	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
B:NT:P1.NST:L3,7,9	7 (4,67)	3 (1,51)	10 (2,89)
NA:15:P1.14:LNIT	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
NA:NT:P1.5:L3,7,9	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
NA:NT:P1.NST:LNIT	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
NA:15:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	3 (1,51)	3 (0,87)
NA:NT:P1.15:L3,7,9	0 (0,0)	2 (1,02)	2 (0,58)
NA:NT:P1.5:LNIT	0 (0,0)	2 (1,02)	2 (0,58)
B:NT:P1.13:L3,7,9	0 (0,0)	2 (1,02)	2 (0,58)
B:NT:P1.4:L3,7,9	0 (0,0)	2 (1,02)	2 (0,58)
B:14:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:4:P1.19:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:NT:P1.12,13:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:15:P1.14:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
B:4:P1.7:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:NT:P1.NST:L3,7,9,10	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:15:P1.19:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
Y:NT:P1.2:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:NT:P1.10,13:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:4:P1.13:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:14:P1.7,10:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
B:4:P1.4:L8	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
B:NT:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:NT:P1.10,4:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:4:P1.4:L10	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:NT:P1.10:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:4:P1.7:L10	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
B:15:P1.NST:L3,7,9	2 (1,34)	1 (0,51)	3 (0,87)
NA:1:P1.5:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:4:P1.5:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:NT:P1.7,10:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
Z:NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
NA:4:P1.19,15:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
B:4:P1.15:L3,7,9,8	0 (0,0)	1 (0,51)	1 (0,29)
B:4:P1.12,15:L3,7,9	4 (2,67)	0 (0,0)	4 (1,16)
B:4:P1.5,2:L3,7,9	4 (2,67)	0 (0,0)	4 (1,16)
B:15:P1.15:L3,7,9	4 (2,67)	0 (0,0)	4 (1,16)
B:15:P1.16:L3,7,9	2 (1,34)	0 (0,0)	2 (0,58)
B:NT:P1.5,13:L3,7,9	1 (0,66)	0 (0,0)	1 (0,29)
B:15:P1.12,16:L3,7,9	1 (0,66)	0 (0,0)	1 (0,29)
B:4:P1.19,15:L3,7,9,8	1 (0,66)	0 (0,0)	1 (0,29)
B:15:P1.13:L3,7,9	1 (0,66)	0 (0,0)	1 (0,29)
Total	150 (100,0)	195 (100,0)	345 (100,0)

Predominó el subtipo P1.15 (94,5%), entre las 91 cepas de *N. meningitidis* B aisladas durante la etapa epidémica y estudiadas por EEM. Los subtipos restantes (P1.10; P1.16; P1.NST), mostraron porcentajes muy bajos (Figura 7) y la asociación fenotípica predominante en este grupo de cepas correspondió al B:4:P1.15 (67%) (Figura 8).

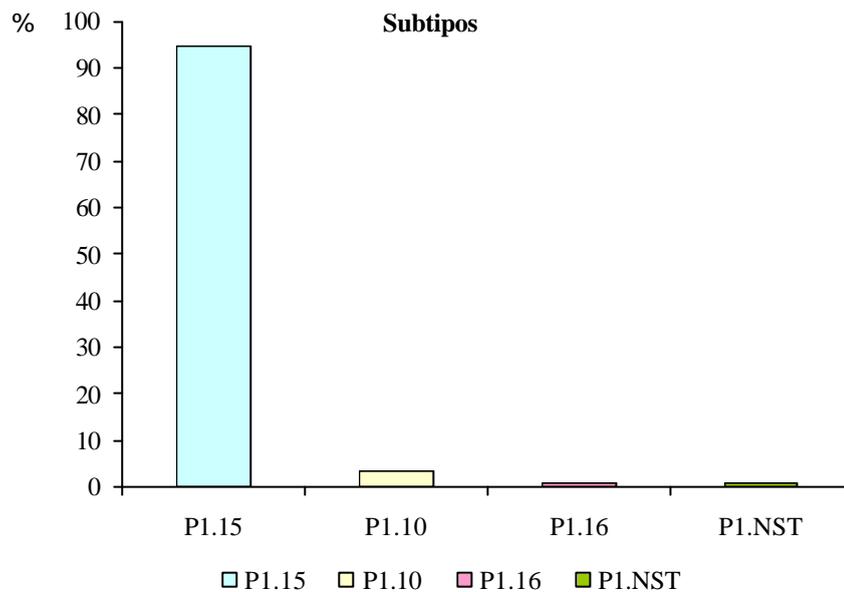


Figura 7. Subtipos entre 91 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B estudiadas por EEM

Los ET detectados por EEM entre los diferentes complejos clonales, se reflejan en la Figura 9. Al complejo ET-5 perteneció la mayoría de las cepas estudiadas (69%). El resto, se distribuyó entre el cluster A-4 (3,3%) y entre ET no asociados a ninguno de los tipos predominantes, éstos fueron denominados como “otros” (26,7%).

Mediante EEM se detectaron 26 ET (Tabla 11) y entre éstos, la media de la diversidad genética ( $H$ ) por locus fue de 0,573, con un error estándar de 0,035. Este valor expresó la probabilidad de que dos ET seleccionados de forma aleatoria, tuvieran diferentes electromorfos para una enzima dada. Entre los aislamientos, la diversidad genética fue de 0,343 con un error de 0,027. El análisis del cluster reveló que de los 91 aislamientos, 85 divergieron a una distancia genética menor que 0,45, indicando que existía relación genética entre ellos.

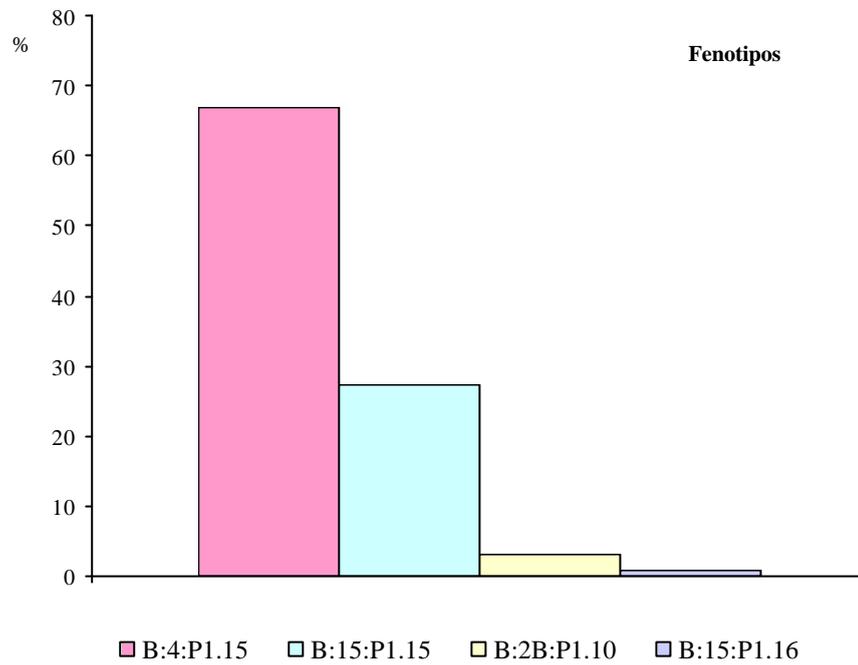


Figura 8. Fenotipos entre 91 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B estudiadas por EEM

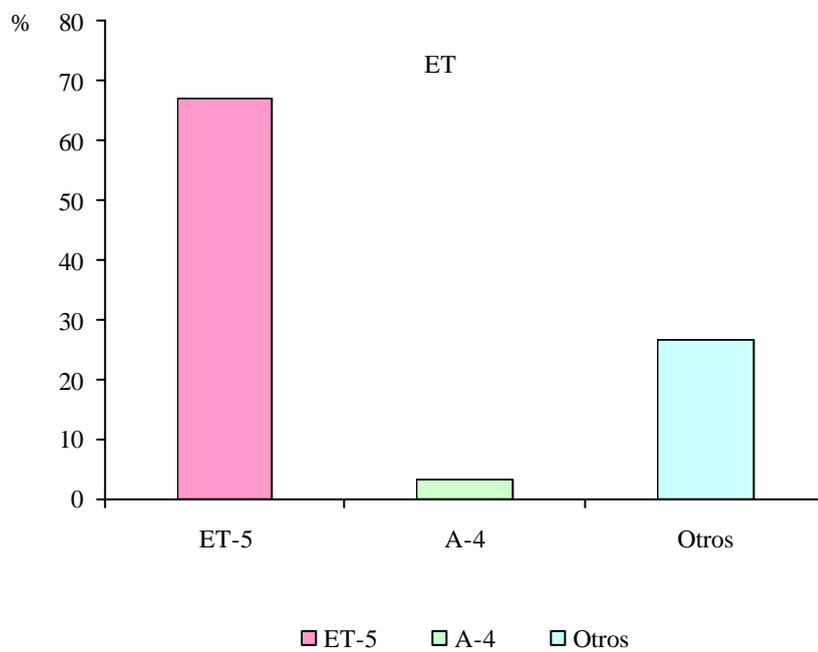


Figura 9. Tipos electroforéticos (ET) de 91 cepas de *N. meningitidis* serogrupo B estudiadas por EEM

La Tabla 12, muestra la combinación de sero/subtipos entre los complejos clonales detectados por EEE. Todas las cepas fueron B y entre ellas, se identificaron 3 serotipos (2b, 4, 15) y 3 subtipos (P1.10, P1.15, P1.16); sólo un aislamiento resultó NST. En la categoría “otros”, se incluyeron 27 cepas con un patrón muy diferente al de los clones agrupados en los ET predominantes.

**4.4 Sensibilidad a la penicilina:** Predominaron las cepas sensibles a la penicilina (87,27%) y ninguna fue resistente. Sin embargo, hubo cepas con SD (12,72%). El porcentaje de aislamientos con esta característica fue superior en PEPE (20,32%). En cepas de EEE, el 10,53% mostró SD y entre PEE, el porcentaje de aislamientos con esta característica fue menor (3,07%) (Tabla 13). En este caso, los intervalos de confianza se superponen y por lo tanto, no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ). Al comparar el comportamiento entre PEE y PEPE, se observó que la SD estuvo presente en el 3,07% de las cepas de PEE, pero en PEPE, el porcentaje de aislamientos con SD aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) y el intervalo del 95% de confianza [7.9%; 25.6%], no se superpuso.

Al analizar las CMI de las cepas de EEE y su asociación con los fenotipos detectados (Tabla 14), la mayoría de los aislamientos pertenecieron al rango de sensibles. Las CMI con mayores porcentajes correspondieron a 0,032  $\mu\text{g/mL}$  (34,24%) y 0,063  $\mu\text{g/mL}$  (46,09%). Sólo 8 cepas (10,52%) tuvieron una CMI de 0.125  $\mu\text{g/mL}$  y pertenecieron a los fenotipos: B:15:P1.19,15:L3,7,9 (5,26%), B:4:P1.19,15:L3,7,9,8 (2,63%) y B:4:P1.19,15:L3,7,9 (2,63%).

Entre los PEE sucedió algo similar al análisis anterior (Tabla 15). Predominaron las cepas sensibles y los aislamientos con mayores porcentajes correspondieron a las siguientes CMI: 0,032  $\mu\text{g/mL}$  (35,39%) y 0,063  $\mu\text{g/mL}$  (53,85%). Mostraron SD a la penicilina, 2 aislamientos del fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 (3,07%).

El número de cepas de enfermos investigadas y correspondientes al período post-epidémico fue pequeño. En ellas, prevaleció la asociación B:4:P1.19,15:L3,7,9 (92,86%) y todas se inhibieron con una CMI de 0.004  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 16). La situación fue diferente en los PEPE (Tabla 17). Este grupo mostró una mayor diversidad, predominaron las cepas siguientes: NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (20,31%), NA:NT:P1.13:L3,7,9 (15,63%) y B:4:P1.15:L3,7,9 (7,81%). Aunque, prevalecieron las cepas con CMI de 0.016  $\mu\text{g/mL}$  (14,06%), 0.032  $\mu\text{g/mL}$  (18,75%) y 0.063  $\mu\text{g/mL}$  (44,53%), 16 aislamientos (12,50%) mostraron SD (CMI de 0.125  $\mu\text{g/mL}$ ) y 9 cepas (7,03%), se inhibieron con una CMI de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ . La SD a la penicilina se observó principalmente en los fenotipos: NA:NT:P1.NST:L3,7,9 (3,13%) y NA:NT:P1.6:L3,7,9 (2,35%), ambos se inhibieron con una CMI de 0.125  $\mu\text{g/mL}$  y en esta última asociación, 2 (1,50%) mostraron una CMI de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabla 11. Variantes alélicas para las 14 enzimas estudiadas y ET detectados en 91 aislamientos de *N. meningitidis* B aisladas durante la epidemia

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

Leyenda: ME = Enzima Málica; G6P = Glucosa 6Fosfato Deshidrogenasa; PEP = Peptidasas; IDH = Isocitrato Deshidrogenasa; ACO = Aconitasa; GDI=Glutamato Deshidrogenasa-NAD; GD2=Glutamato Deshidrogenasa NAD-P; ADH = Alcohol Deshidrogenasa; FUM = Fumarasa; ALK = Fosfatasa Alkalina; IP1= Indofenol Oxidasa 1; IP2 = Indofenol Oxidasa 2; ADK = Adelinato Kinasa; UDH = Deshidrogenasa desconocida.

Tabla 12. Serotipos y subtipos entre los complejos clonales detectados en 91 cepas de *N. meningitidis* aisladas durante la epidemia

ET	Serotipo	Subtipo	N (%)
A-4	2b	P1.10	3 (3,3)
ET-5	4	P1.15	57 (62,6)
		P1.15	3 (3,3)
	15	P1.16	1 (1,1)
Otros	4	P1.15	3 (3,3)
		P1.15	23 (25,3)
	15	P1.NST	1 (1,1)
Total			91 (100,0)

Tabla 13. Sensibilidad a la penicilina entre cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica y post-epidémica

Sensibilidad	EEE	PEE	EEPE	PEPE	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
S	68 (89,47)	63 (96,93)	14 (100,0)	102 (79,68)	247 (87,27)
SD*	8 (10,53)	2 (3,07)	0 (0,0)	26 (20,32)	36 (12,73)
R	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	76 (100,0)	65 (100,0)	14 (100,0)	128 (100,0)	283 (100,0)

\* p < 0.05 entre cepas de PEE y PEPE

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica; S = Sensible; SD = Sensibilidad disminuida; R = Resistente.

Tabla 14. Fenotipos y CMI de la penicilina entre cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa epidémica

CMI (µg/mL)	0.008		0.016		0.032		0.063		0.125		Total	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
B:4:P1.19,15:L3,7,9	1	1,32	1	1,32	9	11,84	8	10,53	2	2,63	21	27,63
B:4:P1.19,15:L3,7,9,8	0	0,0	0	0,0	8	10,53	3	3,95	2	2,63	13	17,11
B:15:P1.19,15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	1	1,32	4	5,26	4	5,26	9	11,84
B:NT:P1.19,15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	2	2,63	5	6,58	0	0,0	7	9,21
B:4:P1.19,15:L8	0	0,0	0	0,0	1	1,32	2	2,63	0	0,0	3	3,95
NA:NT:P1.19,15:L3,7,9	0	0,0	1	1,32	1	1,32	1	1,32	0	0,0	3	3,95
B:15:P1.7,15:LNIT	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2,63	0	0,0	2	2,63
NA:4:P1.19,15:L3,7,9,8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	2,63	0	0,0	2	2,63
C:4:P1.19:L3,7,9	1	1,32	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	2	2,63
C:NT:P1.15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	1	1,32
NA:NT:P1.5,2:L3,7,9	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32
B:NT:P1.15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
NA:4:P1.19,15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
B:4:P1.5,2:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	1	1,32
B:4:P1.19:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
B:4:P1.19,19:L8	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
B:15:P1.19:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	1	1,32
B:15:P1.6:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
B:4:P1:NST:L8	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	1	1,32
B:4:P1.19:LNIT	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32
B:NT:P1.5,2:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
B:15:P1.15:L3,7,9	0	0,0	1	1,32	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32
B:NT:P1.NST:LNIT	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,32	0	0,0	1	1,32
Total	2	2,64	5	6,60	26	34,24	35	46,09	8	10,52	76	100,0

Leyenda: CMI = Concentración mínima inhibitoria; NA = No agrupable; NT = No tipable; NIT = No inmunotipable

Tabla 15. Fenotipos y CMI de la penicilina entre cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en la etapa epidémica

CMI (µg/mL)	0.008		0.016		0.032		0.063		0.125		Total	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
B:4:P1.19,15:L3,7,9	1	1,54	3	4,61	16	24,62	20	30,77	2	3,07	42	64,62
NA:NT:P1.NST:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	4	6,16	3	4,61	0	0,0	7	10,77
NA:4:P1.19,15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	4,61	0	0,0	3	4,61
NA:15:P1.6:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	2	3,07	0	0,0	0	0,0	2	3,07
NA:NT:P1.6:L3,7,9	1	1,54	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	2	3,07
NA:2b:P1.NST:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
NA:4:P1.NST:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
NA:NT:P1.3:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
NA:NT:P1.13:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
B:4:P1.9:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
B:4:P1.15:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
NA:1:P1.17:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
B:4:P1.19,15:L8	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	0	0,0	1	1,54
B:4:P1.7,16:L3,7,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,54	0	0,0	1	1,54
Total	2	3,08	3	4,61	23	35,39	35	53,85	2	3,07	65	100,0

Leyenda: CMI = Concentración mínima inhibitoria; NA = No agrupable; NT = No tipable

Tabla 16. Fenotipos y CMI de la penicilina en cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en la etapa post epidémica

	0,004	0,008	0,032	0,063	0,125
Fenotipos	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
B:4:P1.19,15:L3,7,9	13 (92,86)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
B:15:P1.12,16:L3,7,9	1 (7,14)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	14 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Leyenda: CMI = Concentración mínima inhibitoria

Cuando se analizó el total de cultivos procesados en ambos períodos y se tomó en consideración las diferentes CMI investigadas (Tabla 18), existió un claro predominio de cepas sensibles a la penicilina. La mayoría de los aislamientos de *N. meningitidis* se inhibieron con una CMI de 0.032 (25,44%) y 0.063  $\mu\text{g/mL}$  (44,87%). Entre las cepas con SD a la penicilina, 27 (9,54%) no crecieron con una CMI de 0.125  $\mu\text{g/mL}$  y 9 (3, 18%) se inhibieron con la concentración de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ . El mayor número de cepas inhibidas con CMI de 0.125 y 0.25  $\mu\text{g/mL}$ , pertenecieron a PEPE (13,28 y 7,03%), respectivamente.

La Figura 10, presenta la  $\text{CIM}_{50}$  y  $\text{CMI}_{90}$  de la penicilina entre cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante ambas etapas. El 50% acumulado de EEE y PEE, así como el de las cepas de PEPE fue de 0.036  $\mu\text{g/mL}$ . Mientras que, el 90% acumulado osciló entre 0.059 y 0.08  $\mu\text{g/mL}$ . En los aislamientos correspondientes a EEE, el 90% acumulado resultó diferente (CMI de 0.066  $\mu\text{g/mL}$ ).

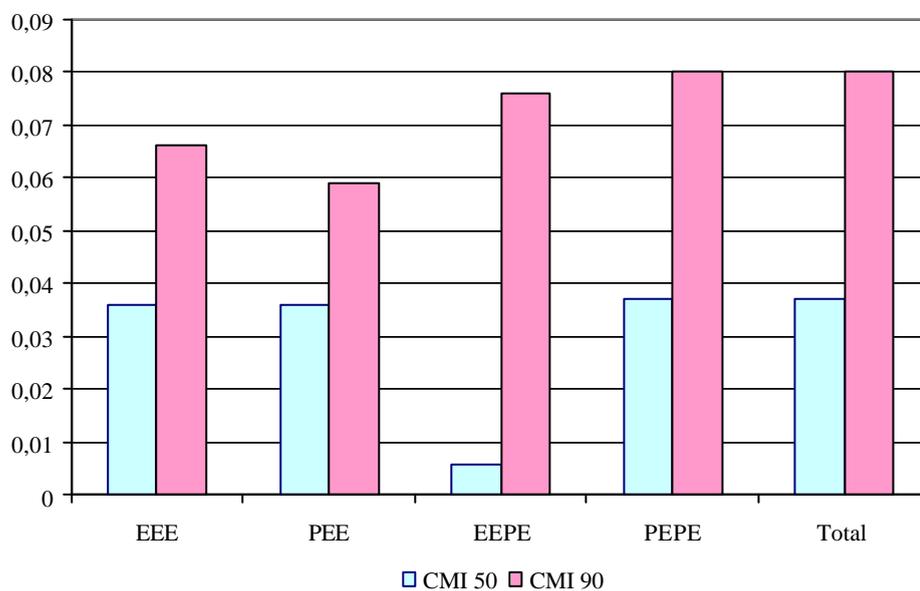
Tabla 17. Fenotipos y CMI de la penicilina en cepas de portadores aisladas durante la etapa post-epidémica

CMI (µg/mL)	0,004	0,008	0,016	0,032	0,063	0,125	0,25	Total
Fenotipos	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
NA:NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	2 (1,56)	2 (1,56)	3 (2,35)	15 (11,72)	4 (3,13)	0 (0,0)	26 (20,31)
NA:NT:P1.13:L3,7,9	1 (0,78)	0 (0,0)	2 (1,56)	2 (1,56)	13 (10,15)	1 (0,78)	1 (0,78)	20 (15,63)
B:4:P1.15:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	3 (2,35)	6 (4,69)	0 (0,0)	0 (0,0)	10 (7,81)
NA:15:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	7 (5,46)	1 (0,78)	0 (0,0)	9 (7,03)
NA:NT:P1.7:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)	2 (1,56)	1 (0,78)	0 (0,0)	6 (4,69)
NA:NT:P1.12:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)	1 (0,78)	1 (0,78)	1 (0,78)	1 (0,78)	6 (4,69)
NA:NT:P1.6:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)	2 (1,50)	5 (3,91)
NA:NT:P1.NST:L10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)
NA:14:P1.7:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	2 (1,56)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)
NA:NT:P1.15:L3,7,9	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)
W <sub>135</sub> :NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (2,35)
B:NT:P1.4:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)
NA:15:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)
NA:NT:P1.5:LNIT	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1(0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	2 (1,56)
NA:NT:P1.4:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)	2 (1,56)
NA:4:P1.4:L:10	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)
NA:NT:P1.NST:LNIT	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	1(0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)
NA:15:P1.14:LNIT	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (1,56)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	3 (2,35)
NA:NT:P1.5:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	2 (1,56)
B:NT:P1.13:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:NT:P1.10:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:4:P1.1.7:L10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
B:15:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:1:P1.5:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:4:P1.5:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
B:4:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:15:P1.14:LNIT	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:NT:P1.5:L3,7,9,10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)
B:NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
Z:NT:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:4:P1.15:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
B:14:P1.NST:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	1 (0,78)
B:NT:P1.14:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	1 (0,78)
NA:15:P1.14:L3,7,9	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	1 (0,78)
NA:NT:P1.13:L3,7,9,10	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)
B:4:P1.14:L8	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	1 (0,78)
<b>Total</b>	<b>1 (0,78)</b>	<b>3 (2,35)</b>	<b>18 (14,06)</b>	<b>24 (18,75)</b>	<b>57 (44,53)</b>	<b>16 (12,5)</b>	<b>9 (7,03)</b>	<b>128 (100)</b>

Tabla 18. CMI de la penicilina en cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica y post epidémica

CMI (µ/mL)	EEE	PEE	EEPE	PEPE	Total
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
0.004	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (0,78)	1 (0,35)
0.008	2 (2,63)	2 (3,07)	14 (100,0)	3 (2,34)	21 (7,42)
0.016	5 (6,57)	3 (4,61)	0 (0,0)	18 (14,06)	26 (9,18)
0.032	26 (34,20)	23 (35,38)	0 (0,0)	23 (17,96)	72 (25,44)
0.063	35 (46,05)	35 (53,84)	0 (0,0)	57 (44,53)	127 (44,87)
0.125	8 (10,5)	2 (3,07)	0 (0,0)	17 (13,28)	27 (9,54)
0.25	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (7,03)	9 (3,18)
Total	76 (100,0)	65 (100,0)	14 (100,0)	128 (100,0)	283 (100,0)

Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica.



Leyenda: EEE = Enfermos etapa epidémica; PEE = Portadores etapa epidémica; EEPE = Enfermos etapa post-epidémica; PEPE = Portadores etapa post-epidémica

Figura 10. CMI<sub>50</sub> y CMI<sub>90</sub> de la penicilina en cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores durante la etapa epidémica y post epidémica.

## **5. DISCUSIÓN**

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1 Medio TC

Los medios de cultivo son preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, que constituyen el micro-mundo de los microorganismos en condiciones del laboratorio y pretenden ser un reflejo de su hábitat natural con relación a satisfacer sus más vitales y principales necesidades como ser vivo. En dependencia de las exigencias de los microorganismos en cuestión, así será la composición de estos medios de cultivo (Popovic y cols., 1999).

El transporte-conservación de cepas de *N. meningitidis* resulta una actividad imprescindible para realizar investigaciones microbiológicas y epidemiológicas vinculadas con la EM. Las *Neisserias* patógenas son lábiles y difíciles de conservar por períodos de tiempo prolongados. Esta condición dificulta su obtención y traslado desde su hospedero a laboratorios especializados y constituye un obstáculo a vencer, cuando se necesita la recuperación óptima de las mismas, con vistas a lograr un mejor diagnóstico e identificación (Popovic y cols., 1998).

La obtención de cepas de *N. meningitidis* resulta fundamental para el trabajo de los laboratorios de investigación y referencia, éstos, requieren del envío sistemático de las mismas en condiciones adecuadas por parte de los laboratorios suministradores. Frecuentemente, la transportación de cepas no resulta exitosa, la viabilidad se pierde, si *N. meningitidis* no posee las condiciones adecuadas para sobrevivir (Popovic y cols., 1998). Con este propósito, se investigan métodos y/o medios de cultivo capaces de garantizar esta viabilidad durante el tiempo necesario para alcanzar su destino, actividad que adquiere mayor relevancia, si las cepas se remiten a lugares distantes (Ajello y cols., 1984; Abalain y cols., 1985; Popovic y cols., 1998).

Se señala que la criopreservación a  $-70^{\circ}\text{C}$  y la liofilización, resultan los métodos ideales para la preservación de microorganismos por períodos prolongados (Gibson y Khoury., 1986; Koroleva, 1990; Siberry y cols., 2001). Sin embargo, cuando no existe la posibilidad de utilizar estos métodos, las cepas pueden transportarse y conservarse en diferentes medios de cultivo, en los cuales el lapso de viabilidad varía (horas, semanas, meses) (Abalain y cols., 1985).

En cualquiera de los medios o métodos a utilizar, los resultados estarán íntimamente relacionados con el estado fisiológico de *N. meningitidis* en el momento de la inoculación. Entre los factores que influyen en el resultado final se citan: Los componentes del medio, la temperatura durante la transportación, el período de tiempo transcurrido entre su envío y recepción, así como la presencia o ausencia del  $\text{CO}_2$  durante la remisión (Abalain y cols., 1985). Cuando las cepas de *N. meningitidis* se inoculan con un estado fisiológico óptimo (cultivos de 18-24 horas) y libres de contaminación, aumenta la posibilidad de obtener subcultivos viables (Abalain y cols., 1985).

*N. meningitidis* es muy sensible a las variaciones del pH (pH ideal  $7,2 \pm 0,2$ ), a la deshidratación y a los cambios de temperatura (Abalain y cols., 1985; Ajello y cols., 1984; Wasas y cols., 1999).

Desgraciadamente, la liofilización y crioconservación, que resultan los métodos más confiables para mantener la viabilidad por largos períodos de tiempo, no son factibles para muchos países en desarrollo debido al alto costo de los equipos necesarios, las dificultades para su mantenimiento y la irregularidad del suministro eléctrico (Siberry y cols., 2001). Cuando no es posible disponer de estos recursos, se evalúan métodos alternativos y de más bajo costo (Popovic y cols., 1998). Se han diseñado medios para este propósito, pero en dependencia de sus componentes, requerimientos en la transportación y almacenamiento, ofrecen porcentajes variables de viabilidad (Ajello y cols., 1984; Abalain y cols., 1985; Wasas y cols., 1999).

Por no disponer en Cuba de un medio de cultivo eficaz para el transporte-conservación de las cepas de meningococo aisladas en diferentes regiones del país, y constituir el estudio de sus marcadores epidemiológicos una herramienta valiosa en la vigilancia epidemiológica de la EM, se diseñó y evaluó el Medio TC. Entre sus propiedades fundamentales cuenta con elementos básicos para el crecimiento de las *Neisserias* patógenas, tales como: Compuestos que neutralizan el efecto tóxico de los ácidos grasos (Carbón y Almidón), sustancias que ejercen un efecto protector sobre las especies bacterianas (Gelatina), un agente reductor (Ácido Tioglicólico) y un estabilizador de pH (MOPS) (Ajello y cols., 1984), entre otros. Además, la adición del LA humano, facilita el cultivo de microorganismos exigentes (Abalain y cols., 1985). Otros beneficios del Medio TC son: Posibilidad de conservarse a la temperatura ambiente, no requerir la presencia de CO<sub>2</sub> durante la transportación y garantizar la viabilidad de *N. meningitidis* durante períodos prolongados.

En nuestro estudio, el Medio TC con LA almacenado a 20-25 °C, resultó superior al medio descrito por Wasas y colaboradores (1999), quienes al utilizar el MD, lograron el 100% de la viabilidad de 20 cepas de meningococo conservadas durante tres semanas a 21 °C. Este porcentaje disminuyó al 95%, cuando el período de almacenamiento se prolongó a 32 días. Anteriormente, habían señalado en el mismo medio, el 100 % de viabilidad de 45 cepas de neumococo guardadas a 21 °C durante 44 días (Wasas y cols., 1998).

El tiempo de viabilidad en Medio TC con LA, resultó también superior al que señalan en el medio bifásico descrito por Ajello y colaboradores (1984). Este medio, compuesto por una fase sólida y otra líquida, se denomina "Trans-Isolate Medium" (Medio de Transporte-Aislamiento), y además de contar con algunos elementos presentes en el Medio TC (MOPS, Gelatina, Almidón, Carbón), resultó útil para mantener y transportar a los tres agentes etiológicos más frecuentes de las meningitis bacterianas (*N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae*). El Medio de Transporte-Aislamiento, se recomendó y utilizó fundamentalmente para la remisión de muestras clínicas (LCR)

y a pesar de las contaminaciones esporádicas que suelen presentarse, posibilitó la recuperación del 73% de los cultivos primarios de *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* a partir de LCR inoculados con 2-4 semanas de antelación a su procesamiento en el laboratorio.

Nuestros resultados fueron superiores al descrito por el LNRM del Instituto Pasteur (Abalain y cols., 1985). Este laboratorio, que recomienda también la adición de LA para el transporte-conservación de las *Neisserias* patógenas, describe durante los primeros 15 días de almacenamiento más del 80% de recuperación, aunque la viabilidad puede prolongarse, si los cultivos permanecen almacenados a 37 °C.

Indiscutiblemente, al diseñar el Medio TC y comparar las variables ensayadas, la presencia del LA influyó positivamente en la recuperación de nuestras cepas de *N. meningitidis*. Por los porcentajes de viabilidad obtenidos, consideramos que la adición del LA sirvió como suplemento enriquecedor y aportó elementos nutritivos vitales que prolongaron la viabilidad de este microorganismo.

La recuperación de cepas en Medio TC con LA, resultó superior a la obtenida en el resto de los medios ensayados (ADA, ACH, CTA). Entre éstos, el ADA se describe como un medio útil para la preservación de *Neisserias* patógenas durante 6-8 semanas, cuando los cultivos permanecen entre 35-37 °C (Difco Manual, 1954). Mientras que, el ACH y el CTA, se definen como medios básicos, simples y adecuados para preservar microorganismos lábiles (*N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Haemophilus sp*). Ambos medios, se utilizaron en la transportación de *N. meningitidis* desde África hasta América, con una viabilidad del 71 y 22% de recuperación después de transcurridos 9 y 14 días de tránsito, respectivamente (Ajello y cols., 1984).

El Medio TC con LA superó el porcentaje de viabilidad descrito por Popovic y colaboradores (1998), al investigar el almacenamiento de 8 cepas de *N. meningitidis* en paquetes de Sílice Gel. Al utilizar este método con diferentes temperaturas de almacenamiento, detectó el 100% de viabilidad durante 90 días, cuando los cultivos permanecieron a 4 °C. Sin embargo, el rango de viabilidad disminuyó entre 17-61 días, al alternar la temperatura de conservación entre 4-20-25 °C y resultó aún inferior (10-49 días), si las cepas permanecieron todo el tiempo a la temperatura del laboratorio (20-25 °C). Al emplear estos paquetes de Sílice Gel para transportar cepas de *N. meningitidis* desde Atlanta a Laos, Nigeria, recobraron la totalidad de los cultivos después de 11 días de tránsito a la temperatura ambiente (Popovic y cols., 1998).

Wasas y colaboradores (1999), compararon la viabilidad de 20 cepas de *N. meningitidis* y 20 de *H. influenzae* en MD y otros 5 medios de cultivo almacenados entre 20-25 °C. El 100% de las cepas de meningococo mantuvieron la viabilidad durante 3 semanas, disminuyendo al 95% a los 32 días. En el resto de los medios, la recuperación de ambos microorganismos resultó pobre y apenas sobrepasó los primeros 7 días de conservación.

Se han descrito y recomendado medios para el transporte-conservación de *Neisserias* patógenas. Sin embargo, el tiempo máximo de viabilidad que proporcionan no supera las 72 horas y entre ellos, la mayoría están descritos para gonococo (Abalain y cols., 1985; Wade y Graver., 2003).

Los medios inoculados a partir de cepas cultivadas en AMHSN exhibieron mejores resultados, se logró una viabilidad más prolongada, resultado que pudo estar relacionado con el empleo de medios más enriquecidos. La incorporación de suplementos nutritivos a los medios de cultivo proporciona a *N. meningitidis* condiciones fisiológicas óptimas en el momento de la inoculación. Los resultados en el Medio TC inoculado a partir de cepas cultivadas en AMHSN, sugieren que, cuando las cepas a conservar, se toman de un medio más enriquecido, *N. meningitidis* cuenta con mejores condiciones nutricionales, beneficio que influye positivamente en los resultados finales a lograr.

El Medio TC con LA, constituye una solución a la problemática de la transportación-conservación de cepas de *N. meningitidis* entre regiones distantes por la disponibilidad de sus componentes, fácil elaboración, no requerir la presencia de CO<sub>2</sub> durante la transportación y porque la remisión se realiza a la temperatura ambiente. Por lo anteriormente descrito, el Laboratorio de Microbiología de DACTA, lo utilizó con éxito para el traslado de cepas aisladas en Turquía y por los resultados alcanzados, lo empleó posteriormente en la remisión de cepas aisladas en Nigeria, Burkina Faso, Zambia, República Dominicana y Ecuador (datos no publicados). Además de permitir la caracterización de cepas aisladas en esos países, se pudo establecer trabajos de colaboración con los mismos.

El hallazgo de cepas de *N. meningitidis* viables en el Medio TC después de 12 años almacenadas a 20-25 °C, lo ubica entre los medios que permiten la viabilidad a largo plazo. No hemos encontrado en la bibliografía consultada, reportes de medios de transporte-conservación que posibiliten una recuperación durante un período de tiempo tan prolongado, sólo la liofilización y crioconservación, mantienen la viabilidad por más de 1 año (Gibson y Khoury., 1986).

Para la crioconservación se recomiendan crioconservantes variables y temperaturas que oscilan entre -20 a -80 °C, aunque a esta última, corresponden los mayores porcentajes de recuperación (Kajjalainen y cols., 2004). Gibson y Khoury (1986), conservaron 97 especies bacterianas (276 cepas) entre -70 a -80 °C durante 40 meses. Entre estos microorganismos incluyeron 3 cepas de *N. meningitidis*, las cuales logró recuperar sin dificultad durante un período de 28 meses.

## **5.2 Caracterización fenotípica**

### **5.2.1 Distribución de *N. meningitidis* en enfermos y portadores de la etapa epidémica, según serogrupos**

En Cuba, en 1983, el serogrupo B representó el 95,3% de las cepas aisladas de enfermos y en 1984, la Encuesta Nacional de Portadores reveló un 12% de portadores con un franco predominio de *N.*

*meningitidis* B, seguido por cepas NA. La situación epidémica de esa etapa pudo haber influido en los resultados de la Encuesta Nacional (Valcárcel y cols., 1991). En 1984, se realizó también en Ciudad de La Habana, un estudio de portadores entre contactos efectivos de casos presuntivos y confirmados de EM. Sin embargo, el trabajo detectó un número de portadores superior (30,8%) y al igual que en los resultados anteriores, prevaleció el serogrupo B (82,3%). Además, se demostró la relación directa existente entre el serogrupo y los serotipos que compartían la supremacía en la incidencia general de EM en Cuba y los detectados en los estudios de foco (Suárez, 1984).

En nuestro trabajo, existió entre las cepas invasivas correspondientes a EEE, un número reducido de aislamientos del serogrupo C, hallazgo quizás vinculado con la campaña de inmunización masiva realizada por el MINSAP en 1979 con la vacuna francesa A-C, con el objetivo de yugular la epidemia de EM que se inició en Cuba a mediados de la década del 70. Desde su comienzo, y hasta el momento de la inmunización, predominaron los serogrupos C y B. Posterior a esa campaña con A-C, se produjo un franco ascenso y predominio del B en cepas aisladas de enfermos y portadores (Valcárcel y cols., 1991; Pérez y cols., 1999).

Cuando revisamos la situación en otros países, durante el transcurso de la epidemia de EM en Cuba, encontramos que en los años comprendidos entre las décadas del 70 y el 80 hubo brotes en Europa, región donde la prevalencia del serogrupo B se destacó en España y Noruega, por citar algunos países (Vázquez, 1993; Caugant, 1998). La EM representó también un serio problema de salud para algunas regiones de América Latina. Brasil, padeció al inicio de los años 70, una de las mayores epidemias del mundo por *N. meningitidis* A y C. Sin embargo, unos años después la situación epidemiológica se tornó diferente y a partir de 1986, el serogrupo B ocasionó el 80% de los casos invasivos (Sacchi y cols., 2001). Al concluir la década del 80 y el inicio de los años 90, otros países de América Latina notificaron el aumento del serogrupo B, entre ellos tenemos a: Chile (Castillo y cols., 1994), Argentina (Requeira y cols., 1994), Colombia (Echeverry y cols., 1995) y Estados Unidos (Tondella y cols., 2000).

Aunque en nuestra investigación, el número de cepas del serogrupo C fue bajo y su aislamiento no se detecta en Cuba desde hace algunos años, este serogrupo 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 de invasivos de Europa (Antignac y cols., 2003; Caniça y cols., 2004).

Situación totalmente diferente se presenta en África, sobre todo, en aquellos países que integran el denominado “cinturón de la meningitis”, región donde irrumpen epidemias explosivas y periódicas por *N. meningitidis* A (Rosenstein y cols., 2001) y W<sub>135</sub> (Ouedraogo-Traore y cols., 2002). El serogrupo A, aunque no se notifica en Cuba desde hace varios años, en los inicios de la epidemia se señaló en un número reducido de cepas (Valcárcel y cols., 1991).

### 5.2.2 Distribución de *N. meningitidis* en enfermos y portadores de la etapa epidémica, según sero/subtipos, inmunotipos y fenotipos

Al igual que Galguera y colaboradores (1994), en nuestro trabajo prevaleció el sero/subtipo 4:P1.15 entre las cepas de EEE. Galguera, que investigó aislamientos correspondientes a un período de 12 años (1980-92), detectó al sero/subtipo 4:P1.15 en el 85.4% de las cepas. Sin embargo, otras asociaciones fueron menos frecuentes: 15:P1.15 (9%), 15:P1.16 (2,1%) y B:2 (2,4%).

Entre las cepas investigadas en nuestro trabajo y correspondientes a EEE, predominó el serotipo 4, también frecuentemente asociado a *N. meningitidis* B en diferentes países. Entre éstos, podemos mencionar a: España (Vázquez, 1993), Estados Unidos (Tondella y cols., 2000) y Brasil (Sacchi y cols., 2001). En Estados Unidos, el 27,5% de las cepas perteneció al serotipo 4 y entre los subtipos más frecuentes detectaron al P1.7,16 (14,3%) y al P1.19,15 (9,8%) (Tondella y cols., 2000).

No coincidieron nuestros resultados con los de Ashton y colaboradores (1991) en Canadá, quienes al analizar 362 aislamientos del período 1977-86 y 221 correspondiente a la etapa desde 1987-89, señalaron el predominio del serotipo 2 (30%) y el subtipo P1.2 (18,5%), en cepas de la etapa 1977-86. Sin embargo, en los aislamientos pertenecientes al período 1987-89, resultaron más frecuentes los serotipos 4 (21,7%) y 15 (20,8%) y el subtipo P1.2 (11,8%), prevaleció nuevamente.

Actualmente, cepas de *N. meningitidis* del serogrupo B asociadas al sero/subtipo 4:P1.4 (B:4:P1.4), provocan tasas elevadas de EM en Holanda (van Looveren y cols, 1998), Australia (Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2003) y Nueva Zelanda (Martin y cols., 1998).

Identificar las características antigénicas de *N. meningitidis* resulta útil para conocer la dispersión de casos de EM y para determinar las estrategias de control más adecuadas, las cuales pueden variar entre los diferentes países. En los años 80, desarrollaron AcM dirigidos contra un grupo de LOS. Su disponibilidad permitió realizar fácilmente y a gran escala, estudios de inmunotipificación pero a pesar de la existencia de estos AcM, son escasos los trabajos que incluyen la caracterización hasta inmunotipo, quizás por su no disponibilidad en la mayoría de los laboratorios que realizan la vigilancia epidemiológica de *N. meningitidis* (Jones y cols, 1992). Para identificar nuestras cepas, a pesar de no haber podido utilizar todos los AcM desarrollados hasta la fecha, el número de cepas NIT fue bajo. No encontramos en la bibliografía consultada, suficientes artículos que incluyeran la identificación de inmunotipos en los estudios de caracterización. Uno de esos trabajos (Jenning y cols., 1999), señaló a los determinantes de inmunotipos L8, L9, L10 y L11, principalmente entre las cepas del serogrupo A, mientras que entre los serogrupos B y C, predominaron del L1 al L9.

Por otro lado, Scholten y colaboradores (1994) en Holanda, evaluaron el ELISA de células enteras con AcM para la inmunotipificación de 675 cepas invasivas del período 1989-90 y 57 pertenecientes al año 1974 (previamente inmunotipificados por microprecipitación). Los inmunotipos detectados

por ELISA, coincidieron con los obtenidos por la técnica de microprecipitación. Los inmunotipos predominantes fueron: L3 (37%), L3,8 (22%), L2 (14%), L1,8 (9%) y L4 (6%). La distribución resultó diferente entre los serogrupos. En las cepas A (N = 13) predominaron L10 y L3 y sólo 1 cepa, resultó NIT. En el serogrupo B (N = 425), 7 aislamientos fueron NIT. Mientras que, L3 y los inmunotipos relacionados (L3,1, L3,1,8 y L8) representaron el 69%. Además, L2 (10%) y L4 (4 %), estuvieron también presentes en este serogrupo B. En contraste con los resultados anteriores, casi la mitad de las 105 cepas del serogrupo C fueron L2 (30%) o L4 (15 %). L1, L8 y L1,8 comprendieron el 17 % de los aislamientos del B y 5% del A. El resto de los serogrupos, estuvieron pobremente representados y mostraron varios determinantes de inmunotipos.

Alea (2001), detectó también al inmunotipo L3,7,9 como predominante en las cepas por ella investigadas, el 55,11% correspondió a cepas de enfermos y el 84% a portadores.

En nuestro trabajo prevaleció el fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9, cifra inferior al 95,5% de las cepas B:4:P1.15 señalada por Galguera y colaboradores (1994), al estudiar 100 aislamientos de enfermos por ELISA de células enteras con AcM. Sin embargo, no incluyeron en su estudio la búsqueda del subtipo P1.19, ni el inmunotipaje.

Cepas B:4:P1.15 resultaron las de mayor circulación en Cuba durante la epidemia, sobre todo, después de la inmunización realizada con A-C en el año 1979 (Valcárcel y cols., 1991). Por otro lado, Alea (2001), en cepas invasivas correspondientes al período epidémico, identificó al fenotipo B:4:P1.19,15:L3,7,9 en un porcentaje inferior (23,47%).

Durante los años de la epidemia de Cuba, el serogrupo B constituyó uno de los agentes etiológicos más frecuentes de EM en Europa, excepto para Finlandia, país donde en la década del 70, el serogrupo A resultó el principal agente etiológico de esta entidad clínica (Caugant, 1998). Sin embargo, durante los períodos de menor incidencia de EM en Europa, prevalecieron las cepas del serogrupo B, aunque en una proporción baja. La epidemia de Noruega, que comenzó en 1974, mostró al fenotipo B:15:P1.7,16 como su principal agente causal. La situación existente en ese país, condujo al desarrollo de una vacuna elaborada a partir de la cepa prevalente y después de aplicada entre adolescentes noruegos, tuvo una eficacia del 57%, motivo por el cual no se recomendó para su aplicación posterior (Caugant, 1998).

De los brotes registrados en España, dos ocurrieron entre los años 70 y 80. El análisis de las cepas desde 1978-87 mostró la superioridad del B (84%), seguido por el C (7%) y el A (6,7%) (Vázquez, 1993). Posteriormente, en 743 cepas invasivas en el período 1990-92, prevalecieron los fenotipos B:4:P1.15 (39,8%), C:2b:P1.NST (55,8%) y NA:2b:P1.NST (35,6%) (Vázquez y cols., 1994).

En Holanda (Scholten y cols., 1993) durante la década del 80, se caracterizaron por ELISA de células enteras con AcM, 2 357 cepas de enfermos correspondientes al período 1958-90. Dentro del

B, los fenotipos más frecuentes fueron: 2a:P1.2, 2b:P1.2, 4:P1.4, 4:P1.15, 15:P1.16 y 15:P1.7,16. Sus autores manifestaron que el aumento de la incidencia de la EM en los años 80, estuvo vinculado a la combinación de varios factores, donde la cepa circulante, el huésped y condiciones ambientales, representaron el papel principal. El aumento de la migración en Europa facilitó la circulación, transmisión y adquisición de las cepas locales prevalentes.

Un trabajo similar al nuestro realizó el LNRM del Instituto Pasteur cuando investigó por ELISA de células enteras con AcM, un total de 291 cepas de *N. meningitidis* aisladas en 1988 (Riou y cols., 1990). El 74,5% de esos aislamientos correspondieron a enfermos y el 25,4% a portadores. Entre los serogrupos identificados predominó el B (61,8%), seguido por los serogrupos C (31,6%), A (3,6%) y el Y (1,6%). Los serotipos 2a, 2b, 15 y 16 pertenecieron principalmente al serogrupo B de los casos invasivos, mientras que entre las cepas B de portadores, prevalecieron los serotipos 4 y 14. Difiere también de nuestros resultados, el que las asociaciones fenotípicas más frecuentes para el serogrupo B fueron: B:2a:P1.2, B:2b:P1.2, B:4:P1.15 y B:15:P1.7. Mientras que, entre las cepas del serogrupo C, se destacó el fenotipo C:2a:P1.2 (Riou y cols., 1990).

En Chile, antes de los años 80, los casos de EM por meningococo B eran infrecuentes pero a partir de 1982, su incidencia resultó crítica en Iquique, Antofagasta y la Región Metropolitana, lugares donde predominó un fenotipo diferente al de Cuba. Los fenotipos más frecuentes de Chile fueron: B:15:P1.3 (63,2%); B:NT:P1.3 (11,7%) y B:4:NT (7,3%) (Castillo y cols., 1994).

En Brasil, Colombia, Argentina y Uruguay se observó un ascenso de casos de MM por serogrupo B, principalmente en los menores de 5 años. Caro (1999), identificó al fenotipo B:2b:P1.10 como el más frecuente en 65 cepas de *N. meningitidis* B aisladas de casos clínicos en Argentina. Además, detectó una gran diversidad de sero/subtipos. Prevalcieron los serotipos 2b (67,6%), 15 (15,3%), 4 (6,1%), 2a (3,0%) y cepas NT (3,0%). Entre los subtipos identificó como predominantes a: P1.10 (44,6%), P1.NT (27,7%), P1.7,16 (13,8%), P1.2 (6,2%), P1.15 (3,1%), P1.14 (3,1%) y P1.16 (1,5%). En cepas de Uruguay y Colombia estudiadas en el Instituto Finlay, encontraron que la mayoría de los aislamientos resultaron NT y NST. Sin embargo, un número considerable resultó B:2b:P1.10 y B:14:P1.1,7. La presencia en Uruguay del fenotipo B:2b:P1.10, estuvo quizás vinculada con la cercanía geográfica existente entre ambos países pero a pesar de esta proximidad, Colombia mostró el predominio del fenotipo B:4:P1.15 (96,2%) (Caro, 1999).

Desde 1988, Brasil enfrentó una epidemia de EM en varios estados, situación que motivó la aplicación de VA-MENGOC-BC® en 1989 y 1990 a 2,4 millones de niños entre 3 meses-6 años de edad. En ese período, al igual que en Cuba, Brasil mostró un franco predominio de la asociación fenotípica B:4:P1.15 (Sacchi y cols., 1998).

En Oregón, Estados Unidos, la incidencia de EM aumentó sustancialmente entre 1992-94, momento en el que la cifra ascendió a 4,6/100 000 habitantes. El 86% de las cepas pertenecieron al complejo clonal ET-5 y los sero/subtipos e inmunotipos más frecuentes fueron los serotipos 4 y 15, el subtipo P1.7,16 y el inmunotipo L3,7,9,8,10 (Caugant y cols., 1987; Diermayer y cols., 1999).

### **5.2.3 Distribución de *N. meningitidis* en enfermos y portadores de la etapa post-epidémica, según serogrupos**

En nuestro trabajo, a diferencia de las cepas correspondientes a la etapa epidémica donde existió un franco predominio del serogrupo B en enfermos y portadores, en la post-epidémica, prevaleció el serogrupo B entre las cepas invasivas. Sin embargo, en PEPE se distinguieron las NA, no hubo cepas de *N. meningitidis* C y se constató un número reducido de otros serogrupos.

La efectividad de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, junto a la alta cobertura nacional alcanzada y su aplicación sistemática a lactantes desde 1991, como parte del Programa Nacional de Inmunización, logró el control exitoso y homogéneo de la EM en Cuba. Desde hace varios años, las cifras de incidencia de EM son muy bajas y sólo se notifican casos aislados (Pérez y cols., 2003). Además, el predominio de cepas NA en PEPE, permite evaluar la influencia de la vacuna cubana. Las cepas aisladas de portadores de la etapa post-epidémica, han perdido los atributos de virulencia como efecto favorable para el control de la EM. Sin embargo, en otras regiones del mundo donde no existe un programa de inmunización similar, la situación epidemiológica se muestra diferente. Entre esas regiones podemos mencionar la de Norteamérica, territorio que señala desde el inicio de la década del 90, un ascenso de casos vinculados a un nuevo clon del serogrupo C. Québec, fue una de las zonas más afectadas y en ella, la situación epidemiológica se tornó lo suficientemente grave como para justificar la inmunización con A-C en 1,6 millones de niños durante el año 1993 (Ringuette y cols., 1995). Posteriormente (1999-01), Edmonton padeció también brotes por *N. meningitidis* C, éstos se caracterizaron por una rápida dispersión y elevado número de fallecidos (Tyrrell y cols., 2002). Sin embargo, un estudio de portadores en 2 004 individuos de la Columbia Británica (provincia de mayor densidad geográfica de Canadá), mostró un porcentaje bajo (7,6%) y sólo el 4% de las cepas correspondió al C (Patrick y cols., 2003). En nuestro trabajo, no detectamos al serogrupo C entre los aislamientos de PEPE, ni tampoco se identificó en los estudios de portadores realizados entre 1998-02 por otros investigadores cubanos (Matute, 1998; Zamora, 2000; Álvarez, 2001; López, 2002). La ausencia del serogrupo C en cepas aisladas durante la etapa post-epidémica, es el resultado de la inmunización sistemática que realizan en Cuba con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>. Su administración ha permitido eliminar al serogrupo C de nuestra población, tanto en las cepas de enfermos como en las de portadores.

Aunque, Estados Unidos no muestra altas tasas de EM, los serogrupos más comunes son el Y, C y B (Pratima y col., 2004). Además, han existido variaciones en el comportamiento de esta entidad clínica. Entre los principales cambios se señalan: a) Incremento de casos en personas de 15-24 años de edad, la mayoría esporádicos. Sin embargo, en los últimos años, los brotes por el serogrupo C se han convertido en una amenaza para el país (Jackson y cols., 1995); b) Aumento sustancial de casos por el serogrupo Y (McEllistrem y cols., 2004). Este serogrupo, se ha convertido en uno de los agentes etiológicos más frecuente de EM en Estados Unidos (Racoosin y cols., 1998), y el principal agente de neumonía por meningococo (Winstead y cols., 2000; McEllistrem y cols., 2004); c) Incremento del número de casos en neonatos, que aunque su notificación resultó aún infrecuente, superó al número de enfermos reportados en años anteriores, y a partir de la década del 90, las cifras son similares a las notificadas en niños de 6-23 meses de edad (Shepard y cols., 2003).

En América del Sur, pudiéramos referirnos también a cambios en la conducta de la EM. Entre los países que presentan situaciones epidemiológicas alarmantes podemos citar a: 1) Ecuador, país donde esta entidad clínica mantuvo un comportamiento endémico en los últimos 20 años, pero en el 2000, 2001 y 2002, se produjeron brotes en Guayaquil. Dos de ellos ocurrieron en reclusos de la provincia del Guayas y el resto, se presentó en diferentes sectores de la ciudad. Los casos estuvieron aparentemente vinculados entre si y aunque existió predominio del serogrupo C, señalaron también casos por W<sub>135</sub> (Pesantes, 2002); 2) Uruguay, mostró una disminución de casos por el C y aumentó el número de enfermos por el serogrupo B. En el 2001, existieron eventos que alertaron sobre la posibilidad de una epidemia por el B, sobre todo en Canelones y Montevideo. Por esa situación epidemiológica, inmunizaron con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> (Pirez y cols., 2002). Además, en un estudio realizado a 510 personas de Montevideo, se identificó un 8% de portadores y entre éstos, el 24% fue B, el 36,6% NA y el resto, se distribuyó entre los serogrupos A, C, Y y W<sub>135</sub> (Parodi y cols., 1998); 3) Argentina, notificó un ligero predominio del serogrupo B (60%), con marcadas variaciones entre sus provincias. En 1996, Corrientes, comunicó el primer brote de Latinoamérica vinculado con la asistencia a las discotecas. Estos brotes se describen en la literatura con el nombre de “disco fever”. Las edades de las personas involucradas en él, oscilaron entre 18-45 años y en 7 casos, se aisló al serogrupo C (Cookson y cols., 1998); 4) Brasil, que padeció al inicio de los años 70, una de las epidemias más severas del mundo por los serogrupos A y C, cambió su situación epidemiológica y en los últimos años, el 68% de las cepas pertenecieron al serogrupo B (Sacchi y cols., 1998).

Recientemente, se describieron cambios en las cepas aisladas en España, país donde en la década del 80, la EM estuvo íntimamente vinculada al serogrupo B. Sin embargo, una interesante y cambiante situación epidemiológica se presentó entre 1996 y 1997. *N. meningitidis* serogrupo C, que antes de 1994 integraba menos del 2% de las cepas aisladas, ascendió al 70% en 1996 y 1997.

La decisión de inmunizar a la población de 2-19 años con la vacuna A-C en la mayoría de sus Comunidades Autónomas, originó un nuevo cambio, y la cepa causante de la onda epidémica (C:2b:P1.5,2), descendió al 21,8% en el 2002, pero al mismo tiempo, en el 2001 apareció el fenotipo B:2a:P1.5. La situación existente hizo pensar en un posible evento de “switching” (cambio) capsular (Alcalá y cols., 2003), suceso que se presenta después de realizar programas masivos de vacunación, capaces de provocar protección serogrupo específica. Las nuevas cepas circulantes parecen mantener el potencial epidémico de las precursoras y se convierten en un importante factor de virulencia (Alcalá y cols., 2002). En Cantabria, tras las distintas campañas de vacunación contra *N. meningitidis* C se consiguió la eliminación de este serogrupo en el 2000. Paralelamente, constataron un incremento del B, que alcanzó un pico entre 1999-2001, junto a un aumento de la letalidad. A ello puede 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 cepas del serogrupo B y C. Una vez que aparece esta cepa recombinante, si previamente ha existido una fuerte presión (por vacunación) contra un serogrupo, la cepa recombinante encuentra condiciones favorables para su propagación, al ser capaz de eludir la respuesta inmune inducida por la vacuna contra el otro serogrupo. La facilidad de diseminación y ausencia de respuesta inmune favorecen su incidencia y letalidad (González de Aledo y Vilorio 2004).

España, realizó estudios de portadores en algunas de sus regiones. Uno de ellos correspondió a Gran Canaria, lugar donde existió una prevalencia puntual del 6,45%, con predominio del serogrupo B (García y cols., 2000). Otro estudio se ejecutó en Galicia, territorio con un elevado número de casos por el serogrupo C. El trabajo incluyó a 9 796 personas que habitaban en áreas con baja y alta incidencia de EM. El exudado se tomó previo a la vacunación con A-C y los resultados señalaron el 0,4 y 0,6% de portadores de *N. meningitidis* C, respectivamente y una prevalencia total del 8%. En los niños de 24 años, no detectaron portadores y, a pesar de la alta incidencia de casos por el serogrupo C en la población estudiada, el número de individuos que portó la cepa epidémica fue bajo (Fernández y cols., 1999).

En Francia, caracterizaron 2 091 cepas invasivas entre 1999-02. En ellas, predominó el serogrupo B, frecuencia que disminuyó del 69 al 49% en 1999 y 2002, respectivamente. A partir del 2001, el C se incrementó. Además, después de los primeros aislamientos del W<sub>135</sub>, éste ascendió al 9,3% en el 2002, mientras que el Y se mantenía estable (3%), aislándose fundamentalmente en individuos inmunodeprimidos (Antignac y cols., 2003).

Al igual que en otros países de Europa, Inglaterra, Gales, Escocia e Irlanda del Norte, observaron el aumento de casos por *N. meningitidis* C. Desde 1995-01, notificaron 114 brotes en Inglaterra y Gales, 43 ocurrieron en escuelas primarias y 46 en secundarias (Davison y cols., 2004). En 1999, el

Reino Unido aplicó la vacuna conjugada contra el C, inmunizando aproximadamente a 14 millones de personas menores de 18 años. En ese momento, realizaron un estudio de portadores en 14 064 individuos con edades entre 15-17 años y 1 año después, repitieron el estudio en 16 583 personas de la misma edad. Al comparar ambos resultados, constataron que la vacuna conjugada redujo los portadores de *N. meningitidis* C en el 66% de las personas inmunizadas (Maiden y Stuart., 2002).

Actualmente, casos de EM por el serogrupo A no son frecuentes en la Unión Europea pero a finales del 2003, Moscú detectó el aumento de casos invasivos por este serogrupo, situación totalmente diferente al resto de Europa (Lawrence y Hanford., 2003). Moscú, presentaba desde 1920 ondas epidémicas, la mayoría producidas por el serogrupo A. Algunas, se vincularon con la presencia de emigrantes vietnamitas en esa ciudad. La incidencia se mantuvo alta hasta los años 80, y en 1996, reapareció un brote por *N. meningitidis* A, relacionado nuevamente con el arribo de emigrantes asiáticos. El estudio molecular de las cepas aisladas entre 1969-97, demostró que 4 grupos clonales diferentes ocasionaron las ondas epidémicas sucesivas de Moscú (Achtman y cols., 2001).

A pesar de que la EM no constituye un problema de salud en Italia, este país realiza una vigilancia sistemática de las cepas circulantes. Entre 1999-01, el LNRM corroboró el predominio del B (75%) y el C (24%), en 270 cepas remitidas desde diferentes zonas del país (Mastrantonio y cols., 2003). Sin embargo, en el 2002-03, se observó un ascenso del C (42,5%) (Stefanelli y cols., 2004). Además, Italia se suma a los países que señalan la transferencia horizontal de los genes *siaD*, cuyo resultado está implicado en el switching capsular *in vitro* e *in vivo* (Stefanelli y cols., 2003).

Aunque en nuestro trabajo se constató un número reducido del serogrupo W<sub>135</sub> entre PEPE, en los últimos años, después del peregrinaje de los musulmanes a La Meca, brotes de EM por W<sub>135</sub> ocurren en Europa y África. En el 2000, notificaron 90 casos en 9 países, la mayoría se señalaron en Francia y el Reino Unido (Aguilera y cols., 2002). Sin embargo, aunque el mayor número de enfermos se presentó entre peregrinos musulmanes, los brotes se dispersaron a sus contactos e individuos no vinculados con la visita a La Meca.

#### **5.2.4 Distribución de *N. meningitidis* en enfermos y portadores de la etapa post-epidémica, según sero/subtipos, inmunotipos y fenotipos**

Nuestro trabajo detectó similitud entre los sero/subtipos correspondientes a las cepas aisladas de EEE y EEPE. El fenotipo B:4:P1.15 ha sido el de mayor circulación en casos invasivos después de 1979 (Valcárcel y cols., 1991). Recientemente, Sosa y colaboradores (2001) señalaron su primacía (75,5%) en 111 cepas del serogrupo B. Además, trabajos realizados en Cuba durante períodos diferentes, también lo identificaron como el más habitual (Galguera y cols., 1994; Caro, 1999; Alea, 2001). El hecho comprobado de no detectar la aparición de nuevos serogrupos y sero/subtipos epidemiogénicos entre las cepas de EEPE y PEPE estudiadas, habla también a favor del impacto de

VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> sobre la epidemia de Cuba y particularmente de su amplio espectro contra diferentes sero/subtipos de los serogrupos B y C (Sierra y cols., 1991; Requeira y cols., 1994). Ensayos realizados en modelos animales y estudios de Ac bactericidas con sueros de pacientes vacunados, demostraron que la protección de VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> es de amplio espectro contra otros sero/subtipos del serogrupo B y no sólo contra la cepa vacunal u homóloga (Sierra y cols., 1991; Requeira y cols., 1994; Sifontes y cols., 1997).

Sacchi y colaboradores (2001), señalaron resultados similares al nuestro cuando estudiaron 1 297 cepas B de Brasil. En ellas identificaron al subtipo P1.19,15 en el 66%. Sin embargo, difieren de nuestros resultados, el resto de los subtipos por ellos encontrados: P1.7,1 (11%) y P1.7,16 (4%). Otro trabajo de Brasil en 630 cepas, mostró al serotipo 4 en el 81% y a los subtipos P1.15 y P1.7,1 como los más frecuentes, juntos constituyeron el 75% de las cepas pertenecientes al serogrupo B (Lemos y cols., 2001).

En Estados Unidos (Tondella y cols., 2000), estudiaron 444 cepas serogrupo B aisladas desde 1992-98 (244 casos esporádicos, 200 del brote de Oregón). Al igual que en nuestro trabajo, predominaron los serotipos 4 (27,5%) y 15 (16,0%). El resto, correspondieron a serotipos no identificados en nuestras cepas de EEPE: 14 (8,6%), 10 (6,1%), 1 (4,9%), y 2a (3,7%). Los subtipos detectados por Tondella fueron: P1.7,16 (14,3%), P1.19,15 (9,8%), P1.7,1 (8,6%), P1.5,2 (7,8%), P1.22a,14 (7,8%) y P1.14 (5,3%). Mientras que, en las cepas del brote del estado de Oregón, predominaron el serotipo 15 (69,0%), el subtipo P1.7,16 (78,5%) y el fenotipo B:15:P1.7,16.

Debido a la pobre inmunogenicidad del PC del serogrupo B, las estrategias de vacunación contra *N. meningitidis* se dirigen principalmente a la obtención de vacunas compuestas por Ag no capsulares, de ahí la importancia de la caracterización de las PME. Las PorA y PorB, constituyen Ag proteicos que inducen la formación de Ac bactericidas protectores y han demostrado su efectividad en ensayos clínicos (Frasch, 1995). VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, constituye un ejemplo de vacuna compuesta por PME y gracias a su obtención y aplicación sistemática, desde hace algunos años, la EM no representa un problema de salud para Cuba (Pérez y cols., 2003). Además, los resultados de nuestro trabajo, demuestran su impacto en las cepas de *N. meningitidis* circulantes en los últimos años.

Al igual que en nuestro país, las cepas del brote de Uruguay se identificaron como B:4:P1.19,15 seguidas en orden de frecuencia por los fenotipos B:4:P1.16 y B:4:P1.7 (Pirez y cols., 2002).

En las cepas de EEPE y PEPE no detectamos al serogrupo C. Sin embargo, este serogrupo unido a diferentes sero/subtipos provoca casos esporádicos y brotes en diversas regiones del mundo. Canadá (Tyrrell y cols., 2002; Tsang y col; 2004) y Argentina (Requeira y cols., 1994), notificaron el aumento de casos invasivos por el fenotipo C:2a:P1.5,2. En el brote de Edmonton (1999-01), que

ocasionó 61 casos, todos los aislamientos fueron C:2a, prevalecieron los subtipos P1:5,2; P1.2 y P1.15 y las cepas de los fallecidos se clasificaron como C:2a:P1.5,2.

Las cepas C:2a se han asociado con casos invasivos entre jóvenes asiduos a las discotecas. Suecia, Australia, Argentina y Estados Unidos, notificaron brotes de “disco fever”. La mayoría de sus cepas correspondieron a los fenotipos C:2a:P1.5,2; C:2a:P1.5 y C:2a:P1.NST (Cookson y cols., 1998; Riesbeck y cols., 2000). Se señala que las condiciones ambientales y sociales que imperan en estos locales, favorecen la dispersión de cepas virulentas. El predominio de casos en el sexo masculino, género donde es más frecuente el hábito de fumar y el consumo de bebidas alcohólicas, junto al hacinamiento que existe en esas instalaciones, constituyen factores de riesgo para la colonización y dispersión de cepas virulentas, con consiguiente aparición de casos clínicos.

Nuestro trabajo detectó la asociación P1.19,15 como la más frecuente entre las cepas de EEPE, esta expresión antigénica se observó también en un número significativo de aislamientos pertenecientes a casos clínicos estudiados por otros autores (Wedegge y cols., 1999).

El cambio epidemiológico ocurrido en España entre 1996-97 (Fernández y cols., 2003), se dispersó a varias zonas del país y motivó campañas de vacunación con A-C, junto a estudios de portadores. Sin embargo, un descenso del fenotipo C:2b:P1.5,2 se presentó en el 2000 y 2002. Posteriormente, éste disminuyó al 21,8% y aumentó el C:2a:P1.5 (47,4%) y el B:2a:P1.5, expresión antigénica no detectada con antelación (Alcalá y cols., 2003). En el estudio de portadores de Gran Canarias, la mayoría de las cepas resultaron B y mostraron 25 sero/subtipos diferentes, sólo un aislamiento se clasificó como C:4:P1.5,2 (García y cols., 2000).

Al comparar los serotipos detectados en nuestro trabajo, con los identificados en Francia por Antignac y colaboradores (2003) a partir de cepas invasivas del período 1999-02, vemos algunas diferencias. En Francia, hubo predominio del serogrupo B (58%), pero existió también un aumento del C y el W<sub>135</sub>, con un número reducido de casos del serogrupo A. Dentro del B, prevalecieron las cepas NT (40,4%) y el serotipo 4 (29,2%). Entre los aislamientos del C, los mayores porcentajes correspondieron al 2a (53%) y 2b (27%). En el serogrupo W<sub>135</sub>, predominaron las NT (48,9%) y el serotipo 2a (46,7%): Entre las cepas del serogrupo A, se destacó el fenotipo A:4,7:P1.9,1.

También en Italia, Mastrantonio y colaboradores (2003), mostraron resultados diferentes en 343 cepas procedentes de 15 regiones del país y aunque predominó el serogrupo B (75%), el C, le siguió en orden de frecuencia (24%). Entre los aislamientos del B, existieron cambios en las cepas circulantes y se produjo el ascenso del B:15:P1.4. Los fenotipos más frecuentes fueron: B:14:P1.13; B:15:P1.7,16; B:15:P1.4; B:4:P1.4; B:4:P1.13; C:2a:P1.5 y C:2b:P1.5. Cepas C:2a:P1.5 aparecieron por primera vez en 1997, aumentando del 3,2-12,2% en el 2000. Sin embargo, en el 2001 descendió al 6%, año en que prevalecieron las cepas C:2b:P1.5. Además, el fenotipo B:14:P1.13 que surgió de

manera esporádica, se confinó principalmente en Bolzano, región donde alcanzó más del 70%. En el resto de las cepas, este fenotipo se identificó en el 13%. En el serogrupo  $W_{135}$ , las asociaciones más frecuentes fueron:  $W_{135}:4:P1.NST$ ;  $W_{135}:NT:P1.NST$  y  $W_{135}:NT:P1.13$ .

En Escocia, se mostraron los resultados de 774 cepas de *N. meningitidis* aisladas de casos invasivos correspondientes al período 1994-99. La mayoría resultaron B (51,7%) y C (39,2%). Entre las cepas B, prevalecieron los siguientes serotipos: 4, 1, 15, 2b, 12, 21 y subtipos: P1.4, P1.15, P1.9, P1.14, P1.7 y P1.16 (Kyaw y cols., 2002<sup>b</sup>).

En Australia (Pugh y cols., 2003) y Nueva Zelanda (Martin y cols., 1998), *N. meningitidis* B ocupó el primer lugar como agente etiológico de EM. En el 2002, Australia lo identificó en el 53% de sus aislamientos, seguido muy de cerca por el C (41%). El serogrupo B, que prevaleció en todo el territorio, excepto en Victoria, Tasmania y la capital, se aisló principalmente de casos esporádicos. Cepas C:2a unidas a sero/subtipos diferentes, se caracterizaron en otras jurisdicciones del país. Mientras que, el fenotipo C:2a:P1.4 predominó en Victoria y Tasmania. (Pugh y cols., 2003). Desde 1991, Nueva Zelanda experimentó un aumento de la incidencia de EM por cepas B:4:P1.7b,4. El serotipo 4 se identificó en el 73% de los aislamientos correspondientes a la etapa 1989-99 (Martin y cols., 1998; Baker y cols., 2001).

Situación desigual presenta África, territorio con las más altas tasas de incidencia de EM, sobre todo en el “cinturón de la meningitis”, región que incluye 15 países situados entre Senegal y Etiopía y abarca aproximadamente 300 millones de habitantes. En los últimos 10 años, ocurrieron 700 000 casos y de éstos, el 10% falleció (du Chatelet y cols., 2002; Fonkoua y cols., 2002). Aunque las epidemias se han vinculado tradicionalmente al serogrupo A, los brotes del 2000-02, se asociaron principalmente con el serogrupo  $W_{135}$  (Fonkoua y cols., 2002). En dependencia de la localización y el clima del país afectado, los brotes suelen presentarse de forma cíclica, se inician en noviembre y finalizan en junio, declinando con el arribo de la lluvia (Ouedraogo-Traore y cols., 2002). En el primer trimestre del 2004, Burkina Faso notificó 2 783 casos con 527 fallecidos y confirmó la presencia de los serogrupos A y  $W_{135}$  (Ahmad, 2004).

Después del brote por  $W_{135}$ , ocurrido en el 2001 y vinculado con la visita del mundo islámico a La Meca, se realizaron estudios de portadores para conocer su dispersión entre peregrinos musulmanes que regresaban a su país de origen. Se describen dos tipos de peregrinación: la principal (Hajj) y la secundaria (Umra). Uno de esos trabajos, comparó los resultados encontrados entre ambos grupos. En 160 individuos que retornaron del Umra en el 2001, la tasa de portadores (1,3%), fue significativamente más baja que entre los del Hajj (17%). Ninguno de los peregrinos del Umra resultó portador de *N. meningitidis*  $W_{135}$  y entre los del Hajj, este microorganismo se detectó en el 90% de los portadores (Wilder-Smith y cols., 2003). Posteriormente, otro trabajo realizado después

del Hajj del 2002, reportó la ausencia de portadores del W<sub>135</sub>. Este hallazgo, que contrastó con los resultados anteriores, pudo estar influenciado por la vacunación que exigen actualmente para visitar La Meca, o por la administración profiláctica de antibióticos a los individuos que regresan a los países con alta incidencia de EM (Wilder-Smith y cols., 2003).

### **5.2.5 Sero/subtipos y ET de *N. meningitidis* serogrupo B estudiadas por EEM**

Dado el reconocido origen clonal de las poblaciones de *N. meningitidis* y el hecho probado de la dispersión de un determinado clon o complejo clonal, es necesario estudiar de conjunto los marcadores fenotípicos y genotípicos (Caugant, 1998).

Autores como Sacchi (1992<sup>a</sup>), Fischer y Perkins (1997<sup>b</sup>) señalaron resultados similares al nuestro. En todos los casos, el número de variantes obtenidas por EEM, superó a la diversidad encontrada respecto a los serogrupos y sero/subtipos circulantes.

El complejo ET-5 predominante en nuestra investigación, se identificó en Europa y América Latina. Entre los países o ciudades pertenecientes a estas regiones podemos citar a: Noruega, España, La Florida, Oregón, Brasil, Argentina y Chile (Caugant y cols., 1987; Caugant, 1998). Otros, señalan al complejo ET-5 en cepas del serogrupo B aisladas en: Croacia, África del Sur, Marruecos, Israel, Australia, China, Japón y Tailandia, aunque en estos países, el número de aislamientos fue pequeño (Orren y cols., 1994; Caugant, 1998; Boras y cols., 2004). Sin embargo, en algunos países como Rusia, la República Checa y Grecia, no lo han identificado entre las cepas investigadas (Caugant, 1998). Frecuentemente, cepas del complejo ET-5 se vinculan con diferentes sero/subtipos y entre ellos se señalan las siguientes asociaciones: 15:P1.7,16 en Noruega (Caugant, 1998); 4:P1.15 en España y Brasil (Sacchi y cols., 1992<sup>a</sup>; Verdu y cols., 1996) y 15:P1.3 en Chile (Cruz y cols., 1990). Caro (1999) señaló en cepas de Argentina, 14 ET en aislamientos de *N. meningitidis* B y C, y al igual que en las cepas de Cuba, notó patrones electroforéticos diferentes al de los clones agrupados en los ET predominantes. Otros, describen la existencia de clones genéticamente muy distantes del resto, aún cuando las diferencias no son demostrables desde el punto de vista fenotípico (Caugant, 1998).

En Brasil, observaron un número elevado de casos provocados por el serogrupo C, asociado a los serotipos 2a y 2b (Sacchi y cols., 1992<sup>b</sup>; Noronha y cols., 1997). El serogrupo B, vinculado con el serotipo 2b, se señaló también en cepas de Argentina estudiadas en el Instituto Finlay (Gutiérrez y cols., 1994). El serotipo 2b, asociado al cluster A-4 y perteneciente al serogrupo B (Caugant y cols., 1987), se aisló en Suiza entre 1960 y 1970 (Caugant, 1998).

En Argentina, circuló también el complejo ET-37, vinculado fundamentalmente al serotipo 2a. Esta asociación se propagó en Europa, África, Canadá y Estados Unidos (Whalen y cols., 1995; Alcalá y cols., 2002; Karelova y cols., 2002; Kellerman y cols., 2002; Tsang y cols., 2004).

Las epidemias por cepas pertenecientes al complejo ET-5 muestran características particulares y entre éstas se señalan: a) Cuando la epidemia se instala, las cepas responsables de esa situación epidemiológica pudieron demostrarse antes de la aparición del brote y/o epidemia (Fischer y Perkins, 1997<sup>b</sup>); b) La persistencia es otra de sus características, cepas del complejo ET-5 provocaron el 70% de los casos ocurridos en Cataluña desde 1987-93 (Verdu y cols., 1996); c) Los brotes y epidemias ocasionados por cepas del complejo clonal ET-5, producen una mortalidad elevada y un número considerable de casos clínicos desarrollan MC; d) Los casos invasivos afectan frecuentemente a los adolescentes (Iversen y Aavitsland, 1996).

Nuestro trabajo detectó un porcentaje bajo de cepas pertenecientes al cluster A-4, complejo clonal responsable de numerosos brotes y epidemias en diferentes regiones del mundo (Caugant y cols., 1987). Este cluster, incluye cepas pertenecientes a los serogrupos B y C, que expresan PME clase 2 y se caracterizan habitualmente como 2b:P1.2 y 2b:P1.10. El cluster A-4, ha sido causa común de EM en Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Islandia y ocasionó una epidemia severa en Ciudad del Cabo, Suráfrica, por *N. meningitidis* serogrupo B (Caugant, 1998). Además, se vinculó a casos del B en Grecia, a un aumento de la incidencia del serogrupo C en Brasil, a casos notificados en Australia en la década del 90, resultó un agente etiológico importante de EM en Argentina y ha desplazado al complejo ET-37 entre las cepas de *N. meningitidis* C aisladas en España (Caugant, 1998; Alcalá y cols., 2002) e Italia (Stefanelli y cols., 2004).

En nuestro trabajo, no detectamos cepas del complejo ET-37, grupo al que pertenece un número significativo de clones asociados a brotes y/o epidemias severas. Recientemente, se vinculó con el brote de Burkina Faso producido por la asociación fenotípica W<sub>135</sub>:2a:P1.5,2 (Ouedraogo-Traore y cols., 2002). Sin embargo, otras cepas de esa misma región, correspondieron al fenotipo A:21:P1.9 y al complejo clonal “subgrupo III” (Decosas y Koama, 2002).

En los últimos años, un nuevo clon designado como “linaje III”, presenta una rápida evolución en Nueva Zelanda, Holanda, Bélgica, Austria e Islandia (Caugant, 1998). La emergencia de cepas B:4:P1.4 responsables de la epidemia de Nueva Zelanda, están estrechamente vinculadas con este clon (Martin y cols., 1998; Baker y cols., 2001).

El análisis del polimorfismo genético entre cepas de 8 serogrupos principales, demostró que la identidad genética del PC, no es un criterio suficiente para indicar relaciones genéticas estrechas entre los aislamientos de *N. meningitidis* (Caugant y cols., 1987). El hallazgo de diferentes ET representados por cepas del mismo serogrupo, se suman a las evidencias previamente aportadas por la serotipificación, de que el seroagrupamiento resulta de un valor limitado como herramienta epidemiológica (Caugant, 1998). Las proteínas de serotipo, tampoco son capaces de identificar

clones individuales dentro de *N. meningitidis*, si bien en el curso de un brote local o una epidemia, generalmente predomina un serotipo específico (Fischer y Perkins, 1997<sup>b</sup>).

Este análisis de poblaciones de *N. meningitidis* se ha planteado por otros autores, demostrando la heterogeneidad en cuanto a su genotipo y la elevada diversidad genética de la especie como un todo, aunque su estructura es esencialmente clonal y sólo unos pocos clones son marginalmente distantes de los otros (Caugant y cols., 1987; Caugant, 1998). Esto explica el elevado porcentaje de ET que difieren entre sí a valores de distancia genética por debajo de 0,45, condicionando una estrecha relación de origen, aún cuando lleguen a diferir en un alelo para una enzima determinada.

Las relaciones genéticas obtenidas por EEM para algunas especies bacterianas, han revelado correlación con los resultados de experimentos de hibridación ADN/ADN, lo que confirma la relevancia de su aplicación con propósitos taxonómicos y epidemiológicos (Musser, 1996).

Las cepas que comparten patrones electroforéticos de isoenzimas semejantes, se asumen como descendientes de una misma línea celular ancestral y son miembros del mismo clon, de ahí que hablemos de “análisis clonal”, al referirnos a los resultados obtenidos por esta técnica de incuestionable valor en el estudio y control de las epidemias, puesto que brinda la posibilidad de conocer de una manera más profunda, los cambios que se operan en la dinámica epidemiológica de la EM (Caugant, 1998).

No se conocía con exactitud las características de las cepas de *N. meningitidis* aisladas durante la epidemia de Cuba, sobre la base de un análisis integral que relacionara los tradicionales marcadores fenotípicos con métodos modernos para el estudio epidemiológico de enfermedades infecciosas, si bien en el caso de nuestro país, se sabía de la circulación del complejo ET-5 en unas pocas cepas estudiadas por Caugant (1987). Se había estudiado el patrón electroforético de las PME por SDS-PAGE y la caracterización por ELISA de células enteras con AcM (Galguera y cols., 1994; Sosa y cols., 2001). La información obtenida por la técnica de EEM, permite establecer nexos genéticos, conocer la estructura de la población bacteriana investigada y posibilita estudiar diferencias entre aislamientos cercanos, sobre la base de un análisis que supera las limitaciones de los marcadores fenotípicos, sin desestimar la información que brindan estos últimos en la caracterización primaria de los aislamientos de *N. meningitidis* (Caugant, 1998).

### **5.3 Sensibilidad a la penicilina de cepas de *N. meningitidis***

La emergencia de la resistencia a los antimicrobianos plantea una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial. Actualmente, el tratamiento adecuado de pacientes con infecciones severas, exige la correcta identificación del patógeno y el estudio de su patrón de resistencia. Es por eso que, la vigilancia de la resistencia antimicrobiana y el uso de la información generada, permitirá tomar decisiones reguladoras, políticas y terapéuticas (Marín y Gudiol, 2003).

Los  $\beta$ -lactámicos, que actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, constituyen la familia de antimicrobianos más numerosa y utilizada en la práctica clínica diaria. Su espectro aumentó en los últimos años, pero la progresiva aparición de resistencia adquirida ha limitado en determinadas ocasiones su uso empírico y eficacia. Aún así, la penicilina que forma parte de estos  $\beta$ -lactámicos, todavía constituye el antimicrobiano de elección para un buen número de infecciones clásicas (Marín y Gudiol., 2003). Aunque, se descubrió por Fleming en 1929 y se generalizó 20 años después, luego de 70 años de uso clínico, constituye uno de los antimicrobianos más utilizados en la atención médica primaria y en centros hospitalarios (Marín y Gudiol., 2003). Por su escasa toxicidad, sustituyó a la sulfadiacina sódica como antimicrobiano de elección para el tratamiento de la EM y suministrada a altas dosis, resulta para muchos países, la alternativa más válida en el tratamiento de esta entidad clínica. Cabe destacar que en los últimos años, la aparición de cepas de *N. meningitidis* con SD a la penicilina (CMI = 0.12-1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), representa un problema creciente y universal para muchas regiones del mundo. Cepas con estas características se notifican en: España, Portugal, Francia, Italia, Inglaterra, Grecia, Australia, Bélgica, Canadá, Suecia, Argentina y Estados Unidos, entre otras (Richter y cols., 2001; Tapsall y cols., 2001; Kyaw y cols., 2002<sup>a</sup>; Antignac y cols., 2003; Kremastinou y cols., 2003; Arreaza y cols., 2004; Caniça y cols., 2004; Stefanelli y cols., 2004).

Del total de cepas investigadas en nuestro trabajo, el porcentaje con SD a la penicilina resultó inferior al que notifican en España, país donde antes de la década del 80, cepas con características similares apenas existían, pero tras la comunicación del primer aislamiento, su número se elevó del 0,4% en 1985, al 42,6% en 1990 (Sáez-Nieto y Vázquez, 1997). Unos años después, esta situación emergió en Inglaterra y Gales, países donde en 1993, sólo el 6% de las cepas mostraban SD. Posteriormente, en el 2000, esta cifra ascendió al 18% (Trotter y cols., 2002).

En España, se han realizado investigaciones para conocer la sensibilidad de *N. meningitidis* a la penicilina. Uno de esos trabajos se ejecutó en Barcelona e incluyó 498 cepas del período 1986-97. La mayoría de los aislamientos pertenecieron a los serogrupos B y C, aunque en 1997, el porcentaje del C se elevó al 57,1%. Entre 1990-96 prevaleció el fenotipo B:4:P1.15. Sin embargo, en 1997, la asociación C:2b:P1.5,2 ocupó el primer lugar. Ese cambio estuvo también vinculado al ascenso de cepas con SD a la penicilina, del 9,1% detectado en 1986, su porcentaje se elevó al 71,4% en 1997 y resultó más evidente entre las cepas del serogrupo C (52%). Sin embargo, para el B, la cifra fue inferior (22,1%) (Latorre y cols., 2000). Aunque, en nuestro trabajo se observó un ascenso de cepas con SD a la penicilina, principalmente entre las de portadores (3,07-20,32%), éste no alcanzó las proporciones descritas por otros autores (Sáez-Nieto y Vázquez, 1997; Toro y cols., 1997; Arreaza y cols., 2000<sup>b</sup>; Sosa y cols., 2001).

Acaban de publicarse los resultados obtenidos en 1 año de vigilancia microbiológica de cepas de *N. meningitidis* circulantes en Portugal (Caníça y cols., 2004). Desde septiembre del 2000, hasta agosto del 2001, identificaron los fenotipos y sensibilidad a la penicilina de 116 aislamientos. Entre éstos, prevalecieron los fenotipos B:4:P1.15 (13,4%) y C:2b:P1.5,2 (75,9%), grupo donde existió el mayor porcentaje de cepas con SD a la penicilina (27,5%). Además, destacaron como una situación epidemiológica importante, el ascenso del fenotipo C:2b:P1.5,2; su cifra se elevó del 33,3% en 1995, al 75,9% en el 2001. Italia, reconoció también el ascenso del fenotipo C:2b:P1.5 en los últimos 2 años, asociado con SD a la penicilina y al cluster A-4 (Stefanelli y cols., 2004).

En Cuba, Sosa y colaboradores (2001), notificaron el hallazgo de cepas de *N. meningitidis* con SD a la penicilina. En 111 aislamientos correspondientes al período 1993-99, 35 (31,5%) mostraron SD, todas pertenecieron al serogrupo B y el fenotipo más frecuente fue el B:4:P1.15 (77,5%), también mayoritario entre las cepas sensibles a este antimicrobiano.

La SD a la penicilina en cepas de portadores se notificó en Grecia (Kremastinou y cols., 2003), después de estudiar 3 167 individuos residentes en áreas con un elevado número de inmigrantes. El trabajo que incluyó 334 cepas de *N. meningitidis*, detectó el 7,5% con SD y el 1,5% correspondió al fenotipo C:2b:P1.5,2, cepa asociada por otros autores con brotes de EM y SD a la penicilina (Toroy cols., 1997; Latorre y cols., 2000; Caníça y cols., 2004, Stefanelli y cols., 2004).

Porcentaje similar al nuestro, presentó el estudio de portadores realizado en 1 765 niños suecos. Ese trabajo, que determinó la prevalencia y sensibilidad antimicrobiana de bacterias potencialmente patógenas en la nasofaringe de niños sanos (Liassine y cols., 1999), detectó que, entre las cepas de *N. meningitidis* aisladas, el 12% mostró SD a la penicilina.

En España (Arreaza y cols., 2000<sup>f</sup>), investigando la sensibilidad de 901 aislamientos de enfermos y portadores (112 de enfermos y 789 de portadores), identificaron SD a la penicilina en el 55.3 y 39.0% respectivamente, ambas cifras superiores a las nuestras. También, existió discrepancias al comparar la CMI<sub>50</sub> (0,12 µg/mL) y CMI<sub>90</sub> (0.25µg/mL) por ellos señaladas.

Para estimar la prevalencia de cepas con SD a la penicilina, realizaron en Estambul un estudio entre aislamientos de enfermos y portadores (Punar y cols., 2002) y al igual que en nuestro trabajo, el porcentaje de cepas con SD entre los portadores (61%), superó al de los casos clínicos (17%).

Italia, se encuentra también entre los países que reportan cepas de portadores con SD a la penicilina. Al investigar la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* y *H. influenzae*, junto a los patrones de resistencia en ambas especies, identificaron un número reducido de cepas de meningococo con SD a la penicilina y señalaron que este antimicrobiano resulta aún efectivo para la región central de Italia (Cresti y cols.,2003).

Polonia, notificó SD a la penicilina en el 27% de las cepas aisladas de casos clínicos y una de ellas, presentó una CMI de 2 mg/L. El fenotipo predominante correspondió al B:22:P1.14 (Grzybowski y Tyski, 2001). Mientras que, en el Reino Unido, en 774 aislamientos pertenecientes a la etapa 1994-99, el porcentaje de cepas con SD fue bajo (8,3%) y en contradicción con el reporte de otros autores (Latorre y cols., 2000; Grzybowski y Tyski, 2001; Caniça y cols., 2004), correspondió al serogrupo W<sub>135</sub>, el mayor número de microorganismos (51,7%) con SD a la penicilina (Kyaw y cols., 2002<sup>a</sup>). El continente americano no escapó de la situación europea y cada día incrementó más el informe de cepas con características similares. Tal es el caso de Canadá, país donde en 232 aislamientos del período 1997-00, el ascenso de la SD a la penicilina presentó la siguiente evolución: 1997 (9,6%), 1998 (13,7%), 1999 (26,4%) y en el 2000 (34,6%) (Brown y Riley, 2001).

Entre los países de América del Norte y América del Sur que notifican cepas con características similares se encuentran: Argentina (Lopardo y cols., 1993; Bardi y cols., 1994), Canadá (Blondeau y cols., 1995), Chile (Castillo y cols., 1994; González, 2002), Venezuela (Toro y cols., 1997), Estados Unidos (Marshall y cols., 1997) y Uruguay (Palacio y cols., 1998).

Durante los años en que transcurrió la epidemia de EM en Cuba, se estudió también la sensibilidad antimicrobiana frente a la penicilina. Uno de esos trabajos, utilizó el método de difusión en agar e incluyó 181 cepas de portadores correspondientes a 39 focos de casos presuntivos y confirmados de EM en Ciudad de La Habana (Suárez, 1984). En ese trabajo, todas las cepas fueron sensibles y el 82,3% perteneció al serogrupo B. Sin embargo, investigaciones realizadas unos años después, pero empleando el método de dilución en agar, demostraron la existencia de cepas con SD a la penicilina. En ellos, la mayoría de las cepas con SD resultaron NA y correspondieron también a portadores (García, 1998; Zamora, 2000; Álvarez 2001).

Las cepas de *N. meningitidis* resistentes a la penicilina (CMI  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$ ), son extremadamente raras y se vinculan con la producción de  $\beta$ -lactamasa adquirida a través de plásmidos de resistencia de *Neisserias* comensales, incluso de *N. gonorrhoeae* (Dillon, y cols., 1983). Sin embargo, las cepas con SD se describen en varios países, aunque su significado clínico no está totalmente bien definido (Vázquez, 2001). Estas cepas, muestran formas alteradas de la proteína 2 fijadora de la penicilina (PBP<sub>2</sub>), debido a mutación del gen *penA* (gen que codifica la síntesis de la PBP<sub>2</sub>). Así, mientras que el gen *penA* de las cepas sensibles muestra una secuencia uniforme, aquellas con SD, exhiben una amplia diversidad y adoptan estructuras en forma de mosaico (Spratt y cols., 1992). Los estudios de genética poblacional atribuyen la aparición de cepas con SD a procesos de recombinación que sustituyen fragmentos del gen de la PBP<sub>2</sub>, por las regiones del gen de *Neisserias* comensales. Los mecanismos de transducción, conjugación y transformación se consideran importantes en el origen de esta resistencia, ya que las *Neisserias* comensales son de modo natural moderadamente

resistentes a la penicilina y los fragmentos del gen *penA* de estas especies, son idénticos a los correspondientes fragmentos del mismo gen en las cepas patógenas (Lujan y cols., 1990).

Otro de los mecanismos que pudiera mediar la sensibilidad a los  $\beta$ -lactámicos se refiere a las alteraciones en la permeabilidad de la membrana citoplasmática, al uso indiscriminado de estos antimicrobianos y al empleo de dosis bajas y tratamientos incompletos (Campos, 1997).

A pesar de que existen aislamientos de *N. meningitidis* con SD a la penicilina, algunos señalan que la administración de este antimicrobiano a altas dosis, constituye aún un tratamiento válido para los casos invasivos (Bastida y cols., 1998). Se debe tener en cuenta que la concentración de penicilina alcanzada en el LCR de pacientes con meningitis, es 10 veces superior al valor máximo de CMI en que una cepa de meningococo se considera sensible. Sin embargo, las circunstancias actuales hacen indispensables la determinación de la CMI frente a la penicilina en cepas aisladas de enfermos y portadores (Sáez-Nieto y cols., 1997).

A pesar de lo anteriormente expresado, el tratamiento con penicilina todavía resulta efectivo en las infecciones por cepas de *N. meningitidis* con SD, aunque existen evidencias de que los regímenes de tratamiento con dosis bajas, pudieran fracasar (Turner y cols., 1990). Por esta situación, algunos clínicos preconizan el tratamiento de la EM con las cefalosporinas de tercera generación y por la posible aparición de resistencia a la penicilina, un número creciente de centros hospitalarios ha modificado el tratamiento empírico de la EM y han sustituido la penicilina por las cefalosporinas,  $\beta$ -lactámicos que penetran con facilidad el sistema nervioso central. Además, a esta justificación añaden el hecho de que el tratamiento con penicilina no erradica a los portadores de *N. meningitidis*, algo que sí logran estas cefalosporinas. De esa forma, prescinden administrar otros antimicrobianos para erradicar el estado de portador (Arreaza y cols., 2000<sup>b</sup>; Boras y cols., 2001).

En nuestro trabajo, las cepas con SD de EEE y PEE mostraron una CMI de 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . En ambos grupos predominó el B y la asociación B:4:P1.19,15:L3,7,9, aunque en los EEE, el número de aislamientos con SD fue superior en el fenotipo B:15:P1.19,15:L3,7,9.

A pesar de existir poca información sobre la EM en Venezuela, nuestros resultados difieren del que notifican en cepas de *N. meningitidis* aisladas en 11 hospitales de Caracas. El 82,7%, perteneció al serogrupo C y el resto al B (Toro y cols., 1997). La mayoría (86,2%) mostró SD a la penicilina, pertenecieron al fenotipo C:2b:P1.5 y se inhibieron con una CMI de 0,25  $\mu\text{g/mL}$ . Entre las cepas del serogrupo B, sólo una presentó SD y la CMI correspondió a 0,125  $\mu\text{g/mL}$ .

Un predominio de cepas de *N. meningitidis* serogrupo B y con SD a la penicilina se notificó en el distrito de Zagreb, capital de Croacia. El trabajo incluyó 35 aislamientos clínicos pertenecientes al período 1996-99, el 94% fue B y el 16% mostró una CMI de 0,125  $\mu\text{g/mL}$  (Boras y cols., 2001).

En el trabajo de Latorre y colaboradores (2000), donde se estudiaron 498 cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos en Barcelona (1986-97), detectaron el aumento de cepas con SD (9,1-71,4%) y las CMI oscilaron entre 0,125-0,5 µg/mL. Anteriormente, señalaron que entre 1990-96, existió un predominio de B:4:P1.15 pero en 1997, prevaleció el fenotipo C:2b:P1.5,2.

En España (Arreaza y cols., 2000<sup>o</sup>), al investigar 901 cepas de *N. meningitidis*: 112 (enfermos) y 789 (portadores), demostraron diferencias significativas entre la SD a la penicilina y los serogrupos detectados. Las cepas de enfermos con SD pertenecientes al serogrupo C (66,7%), superaron a las no pertenecientes a este serogrupo (35,0%). Esta situación también se corroboró entre las cepas de portadores, donde el porcentaje con SD del C (64%), superó al de los aislamientos no pertenecientes a dicho serogrupo (35,9%).

Entre 1999-02, 2 167 aislamientos clínicos se procesaron por LNRM del Instituto Pasteur de Paris. Entre las cepas con SD a la penicilina, prevaleció el serogrupo B (48,2%) y le siguieron en orden decreciente los serogrupos C (38,5%), W<sub>135</sub> (10,1%) y el Y (2,7%). Sus autores señalaron como significativa, la diferencia entre las cepas con SD de los serogrupos C y W<sub>135</sub> (Antignac y cols., 2003). Respecto a los serotipos y la SD constataron una variada participación, describiéndose como significativas las correspondientes a: B:1 (40%), C:2b (64%) y W<sub>135</sub>:NT (50,4%). El informe de las cepas con SD aisladas durante 4 años consecutivos aportó los siguientes datos: 1999 (34%); 2000 (23%); 2001 (27%) y 2002 (39%). En todos los años, estas cifras superaron el porcentaje de cepas con SD identificado en nuestro estudio.

Como expresamos anteriormente, el número de cepas con SD a la penicilina en España fue mayor para el serogrupo C (Arreaza y cols., 2000<sup>a</sup>). Sin embargo, en Inglaterra y Gales, aislamientos con similares características y pertenecientes al período 1985-89, mostraron predominio del serogrupo B (Jones y Sutcliffe, 1990). Posteriormente, durante el período 1993-00, prevaleció el W<sub>135</sub> (Trotter y cols., 2002) y en Escocia, en la etapa 1994-99, correspondió también al W<sub>135</sub>, el mayor número de cepas con SD a la penicilina (Kyaw y cols., 2002<sup>a</sup>).

Sosa y colaboradores (2001), identificaron en aislamientos no pertenecientes al fenotipo B:4:P1.15, un porcentaje de SD a la penicilina (28,6%) superior al que detectaron en las sensibles (19,7%). El 77,5% resultaron B:4:P1.15, el 4,5% fue NT y el 9% resultó NST.

De las investigaciones realizadas en Cuba con cepas de portadores podemos citar a García (1998), quien en 90 aislamientos de Ciudad de La Habana, identificó el 17,8% con SD y las CMI oscilaron entre 0,125-0,5 µg/mL. Los fenotipos con SD correspondieron a: NA:NT:P1.7 (50%), NA:NT:P1.12 (33,3%) y W<sub>135</sub>:NT:NST (33,3%). Posteriormente, Zamora (2000), en 32 cepas de portadores pertenecientes a la provincia de Ciego de Ávila, detectó el 18,8% y todas se inhibieron con una CMI de 0,125 µg/mL.

Los numerosos estudios realizados en varias partes del mundo, revelan diferencias considerables en cuanto a los métodos y medios de cultivo utilizados para medir la sensibilidad antimicrobiana de *N. meningitidis* (Vázquez y cols., 2003). Para comparar los resultados entre diferentes laboratorios y monitorear la tendencia de la resistencia, resultan imprescindibles protocolos estandarizados que brinden una mayor precisión a la hora de identificar la sensibilidad de este microorganismo. La NCCLC recomienda metodologías específicas para definir las CMI de los antimicrobianos contra *N. meningitidis*. Sin embargo, para algunos antimicrobianos no están aún bien delimitados los puntos de corte (breakpoint) que establecen las categorías de sensible, SD y resistente (NCCLS, 2003). Para *N. meningitidis*, la NCCLS recomienda el método de microdilución en Caldo Mueller Hinton más sangre de caballo lisada o el método de dilución en Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de carnero al 5%, pero el E-test, lo emplean comúnmente en Europa y resulta un método alternativo y práctico para los laboratorios clínicos (Hughes y cols., 1993; Arreaza y cols., 2004). Otro método alternativo, el método de difusión en agar con discos de 2 U ó 1 µg de oxacillin, también ha sido empleado, pero en este caso, recomiendan estudios multi-céntricos que esclarezcan algunas preocupaciones sobre su fiabilidad (Block y cols., 1998). Con el objetivo de unificar criterios en cuanto a la metodología y medios de cultivo a utilizar, recientemente se presentaron los resultados de un proyecto realizado por el Grupo Europeo de Monitoreo de Meningococo. En este proyecto, intervinieron 26 laboratorios nacionales y de referencia de Europa, Australia, Israel y Estados Unidos (Vázquez y cols., 2003). La mayor parte del proyecto, se centralizó en la habilidad de cada laboratorio para identificar los niveles de resistencia frente a la penicilina. Actualmente, uno de los principales problemas de la sensibilidad de *N. meningitidis* se concentra en este aspecto. Podemos afirmar que el conocimiento de la caracterización fenotípica, y los estudios de sensibilidad frente a los antimicrobianos empleados en el tratamiento y profilaxis de la EM, son imprescindibles para una mejor interpretación epidemiológica de la EM y permiten poner en marcha medidas útiles para su control (quimioprofilaxis, vacunas, regímenes terapéuticos). Sin embargo, la incorporación de métodos moleculares, ofrecerán una explicación adecuada de la información genética y relación biológica existente entre las diferentes poblaciones de *N. meningitidis* que circulan en Cuba.

## **6. CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

- El Medio TC demostró su capacidad para el transporte-conservación de cepas de *N. meningitidis* a 20-25 °C durante 6 meses. Además, facilitó la vigilancia epidemiológica y el control de la EM, los estudios de post-licenciamiento de VA-MENGOC-BC® y constituyó una solución a la problemática de la conservación y remisión de cepas aisladas en Cuba y otros países.
- Se identificaron los marcadores epidemiológicos de cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba durante un período de 20 años. Estos estudios, apoyaron y permitieron la selección de la cepa vacunal y garantizaron una información microbiológica-epidemiológica oportuna. Además, contribuyeron a establecer la historia microbiológica de las cepas circulantes, aportaron datos de valor al estudio, prevención y control exitoso de la EM en Cuba y demostraron el impacto y vigencia de VA-MENGOC-BC®.
- Se demostró el carácter clonal de las poblaciones de *N. meningitidis*. Predominó el complejo ET-5 y se detectó también el cluster A-4, ambos se asocian a brotes y epidemias en diferentes partes del mundo y su presencia en Cuba, pudiera explicar la severidad de nuestra epidemia. La variabilidad encontrada por la técnica de EEM, fue superior a la que ofrecen los marcadores fenotípicos y mostró su superioridad, cuando se precisa conocer con profundidad las características epidemiológicas de una población bacteriana, estudiar sus nexos y diferencias genéticas.
- Predominaron las cepas sensibles a la penicilina y no hubo resistencia. Sin embargo, existieron aislamientos con SD y a pesar de detectar microorganismos con esta característica, la penicilina constituye aún para nuestro país el antimicrobiano de elección en el tratamiento de la EM.

## **7. RECOMENDACIONES**

**7. RECOMENDACIONES**

- Incorporar nuevos métodos moleculares como la electroforesis de campo pulsado y el “multilocus sequence typing” en el estudio de los marcadores genotípicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba de enfermos y portadores.
- Continuar los estudios de los marcadores epidemiológicos (serogrupo, serotipo, subtipo, inmunotipo) en cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba de enfermos y portadores.
- Continuar las investigaciones sobre sensibilidad antimicrobiana en las cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba de enfermos y portadores.

## **8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Aakre RE, Jenkins A, Kristiansen BE, Froholm LO. Clonal distribution of invasive *Neisseria meningitidis* isolates from the Norwegian county of Telemark, 1987 to 1995. *J Clin Microbiol* 1998;36: 2623-28.
- Abadi FJ, Carter PE, Cash P, Pennington PH. Rifampicin resistance in *Neisseria meningitidis* due to alterations in membrane permeability. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:646-51.
- Abalain ML, Casin I, Chambon J, Chanal C, Dutilh B, Felten A et al. Transport et conservation des souches de *Neisseria*. *Méd Mal Infect* 1985;15:495-98.
- Abdillahi H, Poolman JT. Whole cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Letters* 1987;48:367-71.
- Abraham SN, Sharon N, Ofek I. Adhesion of bacteria to mucosal surfaces In: Ogra P, Mestercky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, Mchee JR, editors. *Mucosal Immunology*. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press;1999. p.31-42.
- Aceiteiro R. Surveys on the rates of healthy carriers of *Neisseria meningitidis* and characterization of circulating strains. *Rev Esp Salud Pública* 2000;74:413-17.
- Achtman M, van der Ende A, Zhu P, Koroleva I, Kusecek B, Morelli G, et al. Molecular Epidemiology of Serogroup A Meningitis in Moscow, 1969 to 1997. *Emerg Infect Dis* 2001; 7:420-27.
- Aguilera JF, Perrocheau A, Meffre C, Hahne S. Outbreak of serogroup W<sub>135</sub> meningococcal disease after the Hajj pilgrimage, Europe, 2000. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:761-7.
- Ahmad K. Vaccination halts meningitis outbreak in Burkina Faso. *Lancet* 2004;363:1290.
- Ajello GW, Feeley JC, Hayes PS, Reingold AL, Bolan G, Broome CV et al. Trans-isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1984;20:55-58.
- Ala'Aldeen DA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A, Falla TJ et al. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* 2000;38:2311-6.
- Alcalá B, Arreaza L, Salcedo C, Uria M, Abad R, Enríquez R, et al. Spread in Spain of B:2a:P1.5 meningococcal strains probably originated by capsular switching mechanisms. In: *Abstracts Book Medical Applications of Biotechnology*, Havana, 2003.
- 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;51:1102-6.

- Alcalá B, Salcedo C, de La Fuente L, Arreaza L, Uria MJ, Abad R et al. *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to ciprofloxacin: first report in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:409.
- Andersen J, Berthelsen L, Jensen BB, Lind I. Surveillance of cases of meningococcal disease associated with military recruits studied for meningococcal carriage. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:527-31.
- Angelini S, Guibourdanche M, Vergez P, Riou JY. *Neisseria meningitidis*: Fifteen cases of bronchopulmonary infections associated with septicaemia. *Pathol Biol* 1997;45:274-80.
- 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.
- Arigita C, Kersten GF, Hazendock T, Hennink WE, Crommelin DJ, Jiskoot W. Restored functional immunogenicity of purified meningococcal PorA by incorporation into liposomes. *Vaccine* 2003;21:950-60.
- Arreaza L, de la fuente L, Fernández S, Vázquez JA. Susceptibility to antimicrobial drugs used in the prophylaxis of meningococcal disease: situation after an epidemic wave. *Rev Esp Quimioter* 2000<sup>b</sup>;13:182-6.
- Arreaza L, de la Fuente L, Vázquez JA. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers *Agents Chemother* 2000<sup>a</sup>;44: 1705-7.
- Arreaza L, Salcedo C, Alcalá B, Uria MJ, Abad R, Enríquez R, Vázquez JA. Sequencing of *Neisseria meningitidis* penA gene: the key to success in defining penicillin G breakpoints. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:358-9.
- Arreaza L, Salcedo C, Alcalá B, Vázquez J. What about antibiotic resistance in *Neisseria lactamica*. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:545-47.
- Artenstein MS. Prophylaxis for meningococcal disease. *JAMA* 1975;10:1035-37.
- Ashton FE, Mancino L, Ryan AJ, Poolman JT, Abdillahi H, Zollinger WD. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis* serogroup B strains associated with meningococcal disease in Canada, 1977-1989. *Can J Microbiol* 1991;37:613-7.
- Australian Meningococcal Surveillance Programme. Annual report of the Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2002. *Commun Dis Intell* 2003;27:196-208.
- Baker M, McNicholas A, Garrett N, Jones N, Stewart J, Koberstein V et al. Household crowding a major risk factors for epidemic meningococcal disease in Auckland children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:983-90.

- Baker MG, Martin DR, Kieft CE, Lennon D. A 10-year serogroup B meningococcal disease epidemic in New Zealand: descriptive epidemiology, 1991-2000. *J Paediatr Child Health* 2001; 37:S13-9.
- Baquero F, Martínez-Beltrán J, Cantón R, Grupo Mensura. Criterios del Grupo Mensura para la definición de los puntos críticos de sensibilidad a los antibióticos. *Rev Esp Quimiot* 1997;10: 303-13.
- Bardi L, Badolati A, Corso A, Rossi A. Fracaso del tratamiento con penicilina en un caso de meningitis por *Neisseria meningitidis*. *Medicina (Buenos Aires)*1994;54:427-30.
- Bastida M, Arto MJ, Iturbe R. Tratamiento de elección de las meningitis por *Neisseria meningitidis*. *An Esp Pediatr* 1998;49:210.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-96.
- Bencic Z, Kuzmanovic N, Amsel V, John V. Duration of the *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 2 carrier state. *Lijec Vjesn* 1991;113:384-6.
- Bennett DE, Cafferkey MT. PCR and restriction endonuclease assay for detection of a novel mutation associated with sulphonamide resistance in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3336-8.
- Berrington AW, Tan YC, Srikhanta Y, Kuipers B, van der Ley P, Peak IR et al. Phase variation in meningococcal lipooligosaccharide biosynthesis genes. *FEMS Immunol Microbiol* 2002;13: 267-75.
- Bethell D, Pollard AJ. Meningococcal vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2002;1:75-84.
- Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis F, Ray P, Hansen JR et al. Efficacy, safety and immunogenicity of a heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:187-95.
- Blakebrough IS, Gilles HM. The effect of rifampicin on meningococcal carriage in family contacts in northern Nigeria. *J Infect* 1980;2:137-43.
- Blakebrough IS, Greenwood BM, Whittle HC, Bradley AK, Gilles HM. The epidemiology of infections due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in a northern Nigerian community *J Infect Dis* 1982;146:626-37.
- Block C, Davidson Y, Keller N. Unreliability of disc diffusion test for screening for reduced penicillin susceptibility in *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1998;36:3103-04.
- 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.

- Blondeau JM, Ashton FE, Isaacson M, Yaschuck Y, Anderson C, Ducasse G. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin in Saskatchewan, Canada. J Clin Microbiol 1995;33:1784-86.
- Boras A, Jeren T, Sacchi CT, Schmink S, Bozinovic D, Barsic B et al. Establishment of an active laboratory-based surveillance for bacterial meningitis in Croatia and molecular characterization of *Neisseria meningitidis* isolates causing meningococcal disease that were collected in the year 2000, the first year of activity. J Clin Microbiol 2004;42:1803-6.
- Boras A, Popovic T, Bozinovec D. *Neisseria meningitidis* with a decreased sensitivity to penicillin in the Zagreb District. Lijec Vjesn 2001;123:231-3.
- Borrow R, Richmond P, Kaczmarski EB, Iverson A, Martin SL, Findlow J et al. Meningococcal serogroup C-specific IgG antibody responses and serum bactericidal titres in children following vaccination with meningococcal A-C polysaccharide vaccine. FEMS Immunology and Medical Microbiology 2002;28:79-85.
- Botha P. Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* in southern Africa. Lancet 1988;8575-6:54-55.
- Brook I, Gober AE. Dynamics of nasopharyngitis in children. Otolaryngol Head Neck Surg 2000;122:696-00.
- Brown S, Riley G, Jamieson F. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin in Ontario, Canada 1997-2000. Can Commun Dis Rep 2001;27:73-5.
- Bruce MG, Rosenstein EN, Capparella JM, Shutt KA, Perkins BA, Collins M. Risk factors for meningococcal disease in college students. JAMA 2001;286:688-93.
- Brundage JF, Ryan MA, Feighner BH, Erdtmann FJ. Meningococcal disease among United States military service members in relation to routine uses of vaccines with different serogroup-specific components, 1964-1998. Clin Infect Dis 2002;35:1376-81.
- Bygraves JA, Urwin R, Fox AJ, Gray SJ, Russell JE, Feavers IM et al. Populations genetics and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex. J Bacteriol 1999;181:5551-56.
- Campos J. Comentario al artículo "Utilidad del método de difusión con disco para evaluar la sensibilidad de *Neisseria meningitidis* a penicilina y cefotaxima. Enferm Infecc Microbiol Clin 1998;16:347-8.
- Campos J. Meningococo resistente a la penicilina: una historia de 12 años?. Enferm Infecc Microbiol Clin 1997;15:397-99.

- Caniça M, Dias R, Ferreira E and Meningococci Study Group. *Neisseria meningitidis* C:2b:P1.2,5 with intermediate resistance to penicillin, Portugal. Emerg Infect Dis [serial online] 2004[date cited]. Available from:<http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no3/03-0357.htm>.
- Carlin EM, Hannon M, Walsh J, Talboys C, Shah D, Flynn R et al. Nasopharyngeal flora in HIV seropositive men who have sex with men. Genitourin Med 1997;73:477-80.
- Cartolano GL, Barbier C, Arnoult L, Simon D, Ricome JL, Hayon J. Fatal acute cellulites due to *Neisseria meningitidis*. J Clin Microbiol 2003;41:3996-7.
- Cartwright K. Introduction and historical aspects. In: Meningococcal Disease. England, ed John Wiley & Sons Ltd. 1995<sup>a</sup>:1-18.
- Cartwright K, Stuart JM, Robinson PM. Meningococcal carriage in close contacts of cases. Epidemiol Infect 1991;106:133-41.
- Cartwright K. Meningococcal carrier and disease. In: Cartwright K, ed. Meningococcal Disease Chichester: John Wiley, 1995<sup>b</sup>:115-46.
- 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.
- Caugant D. Populations genetics and molecular epidemiology of *Neisseria meningitidis*. APMIS 1998;106:505-25.
- Caugant DA, Frohølm LO, Bøvre K, Holten E, Frasch CE, Mocca LS et al. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET-5 complex. Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol 1987;53:389-94.
- Clarke SC, Reid J, Thom L, Denham BC, Edwards GF. Meningococcal disease due to serogroup Y in Scotland, 1992-1999. Br J Biomed Sci 2001;58:17-9.
- Cochi SL, Markowitz LE, Joshi DD, Owens RC Jr, Stenhouse DH, Regmi DN et al. Control of epidemic group A meningococcal meningitis in Nepal. Int J Epidemiol 1987;6:91-7.
- Colino J, Outschoom I. Dynamics of the murine humoral immune response to *Neisseria meningitidis* serogroup B capsular polysaccharide. Infect Immun 1998;66:505-13.
- Connolly M, Noah N. Is group C meningococcal disease increasing in Europe? A report of surveillance of meningococcal infection in Europe 1993-6. Epidemiol Infect 1999;122:41-49.
- Cooke RPD, Riordan T, Jones DM, Painter MJ. Secondary cases of meningococcal infection among close family and household contacts in England and Wales, 1984-7. BMJ 1989;298:555-8

- Cookson ST, Corrales JL, 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.
- Cooper ER, Ellison RT, Smith GS, Blaser MJ, Reller LB, Paisley JW. Rifampicin-resistant meningococcal disease in a contact patient given prophylactic rifampicin. *J Pediatric* 1986;108:93-96.
- Couldwell DL. Invasive meningococcal disease and HIV coinfection. *Commun Dis Intell*. 2001;25:279-80
- Cresti S, Giordano I, Donati E, Giaccherini R, Barberi A, Cellesi C. Prevalence and chemosusceptibility of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* in a population of central Italy. *New Microbiol* 2003;26:281-8.
- Cruz C, Pavez G, Aguilar E, Grawe L, Cam J, Mendez F et al. Serotype-specific outbreak of group B meningococcal disease in Iquique, Chile. *Epidemiol Infect* 1990;105:119-26.
- Daley AJ. Meningococcal disease. *Aust Fam Physician* 2003;32:597-601.
- 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.
- Davinson KL, Andrews N, White JM, Ramsay ME, Crwcroft NS, Rusdy AA et al. Cluster of meningococcal disease in school and pre-school settings in England and Gales: What is the risk?. *Arch Dis Child* 2004;89:256-60.
- de Vries FP, Cole R, Dankert J, Frosch M, van Putten JP. *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* 1998;27:1203-12.
- De Wals P, Gilquin C, de Maeyer S, Bouckaent A, Noel A, Lechal MF et al. Longitudinal study of asymptomatic meningococcal carriage in two Belgian populations of schoolchildren. *J Infect* 1983;6:147-56.
- Decosas J, Koama JB. Chronicle of an outbreak foretold: meningococcal meningitis in Burkina Faso. *Lancet Infect Dis* 2002;7:63-5.
- Devine LF, Hagerman CR. Spectra of susceptibility of *Neisseria meningitidis* to antimicrobial agents *in vitro*. *App Microbiol* 1970;19:329-34.
- Devine LF, Johnson DP, Hagerman CR, Pierce WE, Rhode SL, Peckinpaugh RO. The effect of minocycline on meningococcal nasopharyngeal carrier state in naval personnel. *Am J Epidemiol* 1973;93:337-44.

- 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.
- Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory procedures. 9ª ed. Difco Laboratories. Detroit, Michigan 1954:124-5.
- Dillon JR, Pauze M, Yeung KH. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1983;1:779-81.
- Domínguez A, Fernández-Creuet J, Prats G. Vacuna antimeningocócica En: Salleras, ed. Vacunas preventivas. Principios y aplicaciones. Barcelona: Masson, 1998. p. 337-68.
- Domínguez P, Minguella I. Existencia de cepas de meningococo resistente a la penicilina. *Med Clin (Barcelona)* 1985;85:517-18.
- du Chatelet IP, Alonso JM, Taha MK. Clonal expansion of *Neisseria meningitidis* W<sub>135</sub>. Epidemiological implications for the African meningitis belt. *Bull Soc Pathol Exot* 2002;95:323-4.
- Duke T, Curtis N, Fuller DG. The management of bacterial meningitis in children. *Expert Opin Pharmacother* 2003;4:227-40.
- 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
- Ehrhard I, Glitza I, Muller B, Reintjes R, Ammon A, Sonntah HG. Dynamics of meningococcal carriage in teen-agers. In: Proceeding of the 13<sup>th</sup> International Pathogenic *Neisseria* Conference. Oslo, Norway, 2002:345.
- Engelen F, Vandepitte J, Verbist L, De Maeyer-Cleempoel S. Effect spiramycin on the nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. *Chemotherapy* 1981;27:25-333.
- Estabrook MM, Baker CJ, Griffiss JM. The immune response of children to meningococcal lipooligosaccharides during disseminated disease is directed primarily against two monoclonal antibody-defined epitopes. *J Infect Dis* 1993;167:966-70.
- Farron F, Cheseaux JJ, Pelet B. Meningococcémie chronique et déficit en IgA chez un adolescent. *Arch Pédiatr* 1996;3:149-51.
- Feavers IM, Fox AJ, Gray S, Jones DM, Maiden MCJ. Diversity of meningococcal outer membrane protein PorA has complications for epidemiological analysis and vaccine design. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3:444-50.

- 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.
- 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. *Med Microbiol* 2003;52:75-7.
- Fischer M, Hedberg K, Cardosi P, Plikaitis BD, Hoesly FC, Steingart KR et al. Tobacco smoke as a risk factor for meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis* 1997<sup>a</sup>;16:979-83.
- Fischer M, Perkins BA. *Neisseria meningitidis* serogroup B: Emergence of the ET-5 complex. *Seminars in Paediatric Infect Dis* 1997<sup>b</sup>;8:50-6.
- Fitzpatrick PE, Salmon RL, Hunter PR, Robert RJ, Palmer SR. Risk factors for carriage of *Neisseria meningitidis* during an outbreak in Wales. *Emerg Infect Dis* 2000;5:64-9.
- Fonkoua M, Taha M, Nicolas P, Cunin P, Alonso J, Bercion R et al. Recent increase in meningitis caused by *Neisseria meningitidis* serogroups A and W<sub>135</sub>, Yaoundé, Cameroun. *Emerg Infect Dis* 2002;8:327-29.
- Fontanals D, Pineda V, Pons I, Rojo JC. Sepsis caused by *Neisseria meningitidis* resistant to penicillin and beta lactamase producer. *Med Clin (Barcelona)* 1989;92:47.
- Fontanals D, Van Esso D, Pons I, Pineda V, Sanfeliu J, Mariscal D et al. Prevalencia de portadores de *Neisseria meningitidis* en la población de Cerdanyola (Barcelona). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995;13:398- 405.
- 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.
- Frasch CE. Meningococcal vaccines: past, present and future. *Meningococcal disease*. ed. Keit Cartwright 1995, John Wiley & Sons Ltd. p. 245-83.
- Fusté MC, Pineda MA, Palomar JM, Viñas M, Lorén JG. Clonality of multidrug resistant nontypable strains of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1996;2760-65.
- Gaetano-Anolles G. Amplifying DNA with oligonucleotide primers PCR. *Methods Appl* 1993; 3:85-94.
- Galeano LA, Echeverry ML. Efectividad de una vacuna antimeningocócica en una cohorte de Itagui, Colombia, 1995. *Boletín Epidemiológico de Antioquia* 1995;20:28.
- Galguera 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.
- 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.
  - 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.
  - Garraty G. Asociación entre grupos sanguíneos y enfermedad. ¿Desempeñan un papel biológico los antígenos-anticuerpos de los grupos sanguíneos?. Rev Arg Transf 1997;23: 217-29.
  - Gaunt PN, Lambert BE. Single dose ciprofloxacin for the eradication of pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. J Antimicrob Chemother 1988;21:489-96.
  - Gibson LF, Khoury JT. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. Letters Applied Microbiol 1986;3:127-29.
  - Gilja OH, Halstensen A, Digranes A, Mylvaganam H, Aksnes A, Hoiby EA. Use of single -dose ofloxacin to eradicate tonsillopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis*. Antimicrob Agents Chemotherapy 1993;37:2024-26.
  - Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. J Exp Med 1969<sup>a</sup>;129:1327-48.
  - Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. J Exp Med 1969<sup>b</sup>;129:1307-26.
  - González AP. Vigilancia de la resistencia a antimicrobianos. Rev Chil Infectol 2002;19:135-39.
  - González de Aledo, Vitoria 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.
  - Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus III. Preparation and immunological properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. J Exp Med 1969;129:1349-65.
  - Grzybowski W, Tyskiewicz. Characteristics of *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with symptoms of meningococcal meningitis in Poland in 1995-2000. Med Dosw Mikrobiol 2001;53:117-32.
  - Guibourdenche M, Riou JY. Identification bactériologique des espèces des genres *Neisseria* et *Branhamella*, serogroupage de méningocoque. Evolution de la nomenclature. Med Mal Infect 1997;27:763-73.
  - Gutiérrez M, Caro E, Rodríguez L, García AM, Malberty JA, Galguera M et al. Classification of *Neisseria meningitidis* strains: Prevailing serogroup and serotype in patients from Argentina,

- Uruguay and Colombia suffering meningococcal disease. In: Pathobiology and Immunology of *Neisseriaceae*. International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México, 1994:234-40.
- Hansen L, Christensen JJ, Breum L. Chronic meningococcemia. *Scand J Infect Dis* 2003;35:418-9.
  - Hansman D, Wati S, Lawrencen A, Turnidge L. Have South Australian isolates of *Neisseria meningitidis* become less susceptible to penicillin, rifampicin and other drugs?. A study of strains isolated over three decades, 1971-1999. *Pathology* 2004;36:160-65.
  - Hardy SJ, Christodoulides M, Weller RO, Heckels JE. Interactions of *Neisseria meningitidis* with cells of the human meninges. *Mol Microbiol* 2000;36:817-29.
  - Hughes JH, Biedenbach DJ, Ewinn ME, Jones RN. E-test as susceptibility test and epidemiological tool for evaluation of *Neisseria meningitidis* isolates. *J Clin Microbiol* 1993;31:3255-59.
  - Ihle O, Beckstrom KJ, Michaelsen TE. Cloning, sequencing and expression of immunoglobulin variable regions of murine monoclonal antibodies specific for the P1.7 and P1.16 PorA protein loops of *Neisseria meningitidis*. *Scand J Immunol* 2003;57:453-62.
  - Infante JF, Pérez P, Caro E, Sierra G, Campa C. The hyperferremic mouse model for the evaluation of the effectiveness of VA-MENGO-C-BC against *Neisseria meningitidis* B clinical isolates. *Arch Med Res* 1997;28:41-5.
  - Issa M, Molling P, Unemo M, Backman A, Mosaad M, Sulaiman N et al. *Neisseria meningitidis* serogroup W<sub>135</sub> isolated from healthy carriers and patients in Sudan after the Hajj in 2000. *Scand J Infect Dis* 2003;35:230-3.
  - Iversen BG, Aavitsland P. Meningococcal disease in Norway 1992-1995. Epidemiology and fatality. *Scand J Infect Dis* 1996;28:253-9.
  - Jackson LA, Schuchat A, Reeves MW, Wenger JD. Serogroups C meningococcal outbreaks in the United States. An emerging threat. *JAMA* 1995;273:383-89.
  - Jennins MP, Srikhanta YN, Moxon ER, Kramer M, Poolman JT, Kuipers B et al. The genetic basis of the phase variation repertoire of lipopolysaccharide immunotypes in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 1999;145:3013-21.
  - Jensen ES, Lundbye-Christensen S, Pedersen L, Sorensen HT, Schonheyder HC. Seasonal variation in meningococcal disease in Denmark: relation to age and meningococcal phenotype. *Scand J Infect Dis* 2003<sup>a</sup>;35:226-9.
  - Jensen ES, Schonheyder HC, Lind I, Berthelsen L, Norgand B, Sorensen HT. *Neisseria meningitidis* phenotype markers and septicaemia, disease progress and case-fatality rate

- meningococcal disease: a 20-year population based historical follow-up study in a Danish county. *J Med Microbiol* 2003<sup>b</sup>;52:173-9.
- Jessouroun E, da Silveira IF, Larangeira AP, Pereira S, Fernandes SA, Rabinovitch L et al. Outer membrane vesicles (OMVs) and detoxified lipooligosaccharide (dLOS) obtained from Brazilian prevalent *N. meningitidis* serogroup B strains protect mice against homologous and heterologous meningococcal infection and septic shock. *Vaccine* 2004;22:2617-25.
  - Jha D, Ghosh MK. Epidemiology of meningococcal carrier state amongst recruits of a military training center. *J Commun Dis* 1995;27:250-5.
  - Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfer CM, *Neisseria*. En: Zinzzler, *Microbiología* 2<sup>a</sup> ed. Editorial Médica Panamericana;1998, p. 611-35.
  - Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Musilek K, Kriz P, Maiden MC. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* 2000;38:4429-9.
  - 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.
  - Jones DM, Sutcliffe EM. Meningococci with reduced susceptibility to penicillin. *Lancet*. 1990; 335:863-4.
  - Kaijalainen T, Ruokokoski E, Ukkonen P, Herva E. Survival of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* frozen in skim milk-tryptone-glucose-glycerol medium. *J Clin Microbiol* 2004;42:412-14.
  - Karelova E, Krisová P, Musilek M. MLEE and PFGE Characterization of *Neisseria meningitidis* serogroup C and B isolated in the Slovak Republic in 1998. *Cent Eur J Public Health* 2002;10:60-5.
  - Kellerman SE, McCombs K, Ray M, Baughman W, Reeves MW, Popovic et al. Genotype-specific carriage of *Neisseria meningitidis* in Georgia countries with hyper and hyposporadic rates of meningococcal disease. *J Infect Dis* 2002;186:40-8.
  - Koroleva IS. Preservation of microorganism by deep freezing. *Lab Delo* 1990;11:70-2.
  - Kremastinou J, Blackwell C, Tzanakaki G, Kallegi C, Elton R, Weir D. Parenteral smoking and carriage of *Neisseria meningitidis* among Greek schoolchildren. *Scand J Infect Dis* 1994;26:719-23.
  - 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.

- Kremastinou J, Tzanakaki G, Velonakis E, Voyiatsi A, Nickolaou A, Elton R et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* among ethnic Greek school children from Russian immigrants families in Athens. FEMS Immunol Med Microbiol 1999;23:13-20.
- Krisová P, Kalmusova J, Musilek M, Felsberg J, Haugrucova R, Vichkova J. Study of long-term and multiple carriage of *Neisseria meningitidis* in a healthy population using molecular biology methods. Epidemiol Mikrobiol Immunol 2004;53:25-36.
- Kristiansen BE, Elverland H, Hannested K. Increased meningococcal carrier rate after tonsillectomy. Br Med J 1984;288:274.
- Kristiansen BE, Jenkins A. Preventing the spread of meningococcal infection. Strategies for chemoprophylaxis. Dis Manage Health Outcomes 1997;1:233-40.
- Kristiansen BE, Tventen Y, Jenkins A. Which contacts of patients with meningococcal disease carry the pathogenic strain of *Neisseria meningitidis*?. A population based study. BJM 1998; 317:621-25.
- Krizová P, Musilek M, Danielová V, Holuvová J. New serotype candidate of *Neisseria meningitidis*. Centr Eur Publ Hlth 1996;3:169-72.
- Kyaw MH, Bramley JC, Clark S, Christie P, Jones IG, Campbell H. Prevalence of moderate penicillin resistant invasive *Neisseria meningitidis* infection in Scotland, 1994-9. Epidemiol Infect 2002<sup>a</sup>;128:149-56.
- Kyaw MH, Clark S, Christie P, Jones IG, Campbell H. Invasive meningococcal disease in Scotland, 1994 to 1999, with emphasis on group B meningococcal disease. J Clin Microbiol 2002<sup>b</sup>;40:128:149-56.
- Latorre C, Gene A, Juncosa T, Muñoz C, González-Cuevas A. *Neisseria meningitidis*, evolution of penicillin resistance and phenotype in a children hospital in Barcelona, Spain. Acta Paediatr. 2000;89:661-5.
- Lawrence J, Hanford S. Meningococcal meningitis increase in Moscow associated with serogroup A: advice to travellers. Eurosurveillance Weekly 2003;7:46.
- Lederman W. Vacunas antimeningococo grupo C. Rev Chil Infect 2003;20:126-128.
- Leggiadro RJ. Systemic meningococcal infection and complement deficiency. Pediatr Infect Dis J 2003;22:760-1.
- Legrain M, Mazarin V, Irwing SW, Bouchon B, Quentin-Millet MJ, Jacobs E et al. Cloning and characterization of *Neisseria meningitidis* genes encoding the transferring-binding proteins Tbp1 and Tbp2. Gene 1993;130:73-80.

- Lemos APS, Sacchi CT, Paiva MV, Yara TI, Melles CEA, Mayer LW. Genetic relationships among serogroup B:serotype 4 *Neisseria meningitidis* strains. Rev Ins Med Trop S Paulo 2001; 43:119-24.
- Lewis LA, Gray E, Wang YP, Roe BA, Dyer DW. Molecular characterization of hpuAB, the haemoglobin-haptoglobin-utilization operon of *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol 1997;23: 737.
- Liassine N, Gervair A, Hegi R, Strautman G, Suter S, Auckenthaler R. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healthy children. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999;18:217-220.
- Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks M, Fukuda M, Carlsson S et al. The *Neisseria meningitidis* type2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. Mol Microbiol 1997;24:1083-94.
- Lopardo HA, Santander C, Ceinos MC, Ruboglio EA. Isolation of moderately penicillin-susceptible strains of *Neisseria meningitidis* in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:1728-9.
- Lujan R, Martínez-Suárez JV, Vázquez JA, Sáez-Nieto JA. Resistencia a penicilina en *Neisseria meningitidis*: Epidemiología, bases moleculares e implicaciones terapéuticas. Rev Esp Quimioterap 1990;3:323-29.
- 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.
- Maiden MC, Stuart JM. Carriage of serogroup C meningococci 1 year after meningococci C conjugate polysaccharide vaccination. Lancet 2002;359:289-91.
- Marín M, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infec Microbiol Clin 2003;21:42-55.
- Marshall SA, Rhomberg PR, Jones RN. Comparative evaluation of Etest for susceptibility testing *Neisseria meningitidis* with eight antimicrobial agents. An investigation using U.S. Food and Drug Administration regulatory criteria. Diagn Microbiol Infect Dis 1997;27:93-7.
- Martin 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.
- Martínez E. Enfermedad meningocócica. Fisiopatología cuadro clínico y pronóstico. Rev Hosp. Niño Buenos Aires 1994;158/159:204-14.
- Massari P, Ram S, Macleod H, Wetzler LM. The role of porins in neisserial pathogenesis and immunity. Trends Microbiol 2003;11:87-93.

- Mastrantonio P, Stefanelli P, Fazio C, Sofia T, Neri A, La Rosa G. Serotype distribution, antibiotic susceptibility and genetic relatedness of *Neisseria meningitidis* strains recently isolated in Italy. Clin Infect Dis 2003;36:422-8.
- Mayer MW, Reeves MW, AlHamdan N, Sacchi CT, Taha MK, Ajello GW et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W<sub>135</sub> strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. J Infect Dis 2002;185:1696-605.
- McEllistrem MC, Kolano JA, Pass MA, Caugant DA, Mendelsohn A, Pacheco AGF, et al. Epidemiologic trends and genotypes causing meningococcal disease, Maryland. Emerg Infect Dis [serial online] 2004 Mar. [date cited] Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol10no3/02-0611.htm>
- Memish ZA, Alrajhi AA. Meningococcal disease. Saudi Med J 2002;23:259-64.
- Meyer TF, van Putten JPM. Genetic mechanisms and biological implications of phase variation in pathogenic *neisseriae*. Clin Microbiol Rev 1989;2 Suppl:S139-45.
- Meyers LA, Levin BR, Richardson AR, Stojiljkovic I. Epidemiology, hypermutation, within-host evolution and the virulence of *Neisseria meningitidis*. Proc R Soc Lond B Biol Sci 2003; 270:1667-77.
- Millar JV, Siess EE, Feldman HA, Silverman C, Frank P. In vivo and *in vitro* resistance to sulphadiazine in strains of *Neisseria meningitidis*. JAMA 1963;186:139-41.
- Moore PS. Meningococcal meningitis in sub-Saharan Africa: a model for the epidemic process. Clin Infec Dis 1992;14:515-25.
- Moreno CA, Díaz JJ, Domínguez BM. Vigilancia compartida: enfermedad meningocócica vs. gripe. Gaceta Sanitaria 2000;14:422-28.
- Munkley A, Tinsley CR, Virji M, Heckels JE. Blocking of bactericidal killing of *Neisseria meningitidis* by antibodies directed against class 4 outer membrane proteins. Microb Pathog 1991;11:447-52.
- Musser JM. Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: Selected insights. Emerg Infect Dis 1996;2:1-17.
- Nassif X, Pujol C, Tinsley C, Morand P, Eugene E, Marceau M et al . What do we know about the entry of *Neisseria meningitidis* into the meninges?. Bull Inst Pateur 1997;95:219-35.
- National Committee for Clinical Laboratory Standard. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eleven informational supplements. NCCLS document M100-S13. National Committee for Clinical Laboratory Standard, Wayne PA. 2003.

- Nicolas P, Cavallo JD, Fabre R, Martet G. Standardization of *Neisseria meningitidis* antibiogram. Detection of strains relatively resistant to penicillin. Bull World Health Organ. 1998;76:393-400.
- Noah N, Henderson B. Surveillance of bacterial meningitis in Europe 1997/1998. Communicable Disease Surveillance Center, Public Health Laboratory Service. London, U.K., October 1999.
- Nolte O, Muller M, Reitz S, Ledig S, Ehrhard I, Sonntag HG. Description of new mutations in the *rpoB* gene in rifampicin-resistant *Neisseria meningitidis* selected *in vitro* in a stepwise manner. J Med Microbiol 2003;52:1077-81.
- Noronha C, Araujo C, Baptista M, Ocampo AT, Torres G, Sobral G et al. Epidemiology of meningococcal disease in the city of Rio de Janeiro: changes after vaccination against B and C serogroups. Cad. Saúde Públ. Rio de Janeiro 1997;13:294-03.
- Nuorti JP, Batler JC, Gelling L, Kod JL, Reingolg AL, Vugia DJ. Epidemiological relation between HIV and invasive pneumococcal disease in San Francisco country, California. Ann Intern Med 2000;132:182-90.
- Ochoa R, Leiva T. Mecanismos de defensa frente a las infecciones bacterianas. Capítulo 17. En: Llop A, Valdés-Dapena MM, Zuazo JL, editores. Microbiología y Parasitología Médicas. Tomo I. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas, 2001 p.147-52.
- Olcen P, Kjellander J, Danielsson D, Lindquist BL. Epidemiology of *Neisseria meningitidis*; prevalence and symptoms from de upper respiratory tract in family members to patients with meningococcal disease. Scand J Infect Dis 1981;13:105-9.
- Olsen SF, Djurhuus B, Rasmussen K, Joensen HD, Larsen SO, Zoffman H et al. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants with areas with high and low incidences of meningococcal disease. Epidemiol Infect 1991;106:443-57.
- Oppenheim BA. Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. Clin Infect Dis 1997;24:S98-101.
- Orden B, Martínez R, Millan R, Belloso M, Pérez N. Primary meningococcal conjunctivitis Clin Microbiol Infect 2003;9:1245-7.
- Orren A, Caugant DA, Fijen CA, Dankert J, Van Schalkwy KEJ, Poolman JT et al. Characterization of strains of *Neisseria meningitidis* recovered from complement-sufficient and complement-deficient patients in the Western Cape Province, South Africa. J Clin Microbiol 1994;32:185-91.
- Orus P, Viñas M. Transfer of penicillin resistance between *Neisseriae* in microcosm. Microb Drug Resist 2000;6:99-104.

- Otero L, Blanco MI, de la Iglesia P, Viejo G, Miguel D, del Valle A et al. Aislamiento de *Neisseria meningitidis* maltosa negativa en exudado vaginal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:238-39.
- Ouedraogo-Traore R, Hoiby EA, Sanou I, Sangare L, Kyelem N, Ye-Ouattara D et al. Molecular characteristics of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Burkina Faso in 2001. *Scand J Infect Dis* 2002;34:804-7.
- Palacio R, Camou T, Pérez-Giffoni G, Dell'Acqua, Varela G, Hortal M. Resistencia a los antibióticos de patógenos aislados de infecciones sistémicas: estudio comparativo. *Rev Med Uruguay* 1998;14:120-133.
- Parodi V, Allende F, Torres E, Macedo M, Maglione R, Algorta G. Portadores de *Neisseria meningitidis* en una población de Montevideo. *Rev Med Uruguay* 1998;14:221-225.
- Pascual A, Joyanes P, Martínez-Martínez L, Suárez AI, Perea JE. Comparison of broth microdilution and E-test for susceptibility testing of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1996;34:588-91.
- Patrick DM, Champagne S, Goh SH, Arsenault G, Thomas E, Shaw C et al. *Neisseria meningitidis* carriage during an outbreak of serogroup C. *Clin Infect Dis* 2003;37:1183-8.
- Pavlopoulou ID, Daikos GL, Alexandrou H, Petridou E, Pangalis A, Theororidou M et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* by Greek children: risk factors and strains characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:137-42.
- Peeters CC, Claassen IJ, Schuller M, Kersten GF, van der Voort EM, Poolman JT. Immunogenicity of various presentation forms of PorA outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* in mice. *Vaccine* 1999;17:2702-12.
- Peltola VT, McCuller JA. Respiratory viruses predisposing to bacterial infections: role of neuraminidase. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23:S87-97.
- Pereiro I, Diez-Domingo J, Segarra L, Ballester A, Albert A, Morant A. Risk factors for invasive disease among children in Spain. *J Infect* 2004;48:320-9.
- 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.
- Pérez Rodríguez A; Dickinson F, Tamango I, Sosa J, Quintana I, Ortiz P et al. Resultados y experiencias de la vigilancia nacional de meningitis bacteriana en Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2003;20:118-22.
- Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:154-71.

- 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.
- Pether JVS, Lightfoot NF, Scott RJD, Moran J, Steele-Perkins AP, Sheard SJ. Carriage of *Neisseria meningitidis* investigations in a military establishment. *Epidemiol Infect* 1988;101: 21-42.
- Pirez 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.
- Plotkin S. A short history of vaccination. In: *Vaccines*. eds. Stanley A. Plotkin, Walter A. Orenstein, W. B. Saunders Company, 3<sup>rd</sup> ed, USA 1999. p. 711-27.
- Pollard AJ, Dobson SR. Emerging infectious diseases in the 21<sup>st</sup> century. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:265-75.
- Pollard AJ, Frasch C. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2001;19:1327-46.
- Poolman JT, van der Ley PA, Tommamssen J. Surface structures and secreted products of meningococci. In: *Meningococcal Disease*. England (ed) John Wiley & Sons Ltd 1995;21-34.
- Poolman JT. Serotypes and subtypes of *Neisseria meningitidis*. Results of an international study comparing sensitivities and specificities of monoclonal antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2:69-72.
- Popovic T, Ajello G, Facklam R. Laboratory manual of the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. World Health Organization 1999:19-22.
- Popovic T, Kin CH, Schmink S, Ajello G. Evaluation of silica gel for transport of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1998;3:1765-66.
- Popovic T, Sacchi CT, Reeves MW, Whitney AM, Mayer LW, Perkins BA et al. Distribution of *Neisseria meningitidis* serogroup B serosubtypes and serotypes circulating in the United States. *J Clin Microbiol* 2000;38:3323-28.
- Popovic T, Schmink S, Rosenstein NA, Ajello GW, Reeves MW, Plikaytis B, et al. Evaluation of pulsed-field electrophoresis in epidemiological investigations of meningococcal disease outbreaks caused by *Neisseria meningitidis* serogroup C. *J Clin Microbiol* 2001;39:75-85.
- Pratima L, Raghunathan PL, Bernhardt SA, Rosenstein NE. Opportunities for control of meningococcal disease in the United States. *Annu Rev Med* 2004;55:333-53.

- Puddicombe JB, Wali SS, Wrenwood BM. A field trial of a single intramuscular injection of long acting choramphenicol in the treatment of meningococcal meningitis. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1984;78:399-403.
- Pugh RE, Smith H, Young M. Surveillance of invasive meningococcal disease in Queensland, 2002. *Commun Dis Intell* 2003;27:342-51.
- Pujol C, Eugene E, Morand P, Nassif X. Do pathogenic neisseriae need several ways to modify the host cell cytoskeleton? *Microbes Infect* 2000;2:821-7.
- Punar M, Eraksoy H, Cagatay AA, Ozsut H, Kaygusuz A, Calangu S et al. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin in Istanbul, Turkey. *Scand J Infect Dis* 2002;34:11-3.
- Racoosin JA, Whitney CG, Conover CS, Díaz PS. Serogroup Y meningococci disease in Chicago, 1991-1997. *JAMA* 1998;280:2094-98.
- Raghunathan PL, Bernhardt SA, Rosenstein NE. Opportunities for control of meningococcal disease in the United States. *Annu Rev Med* 2004;55:333-53.
- 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.
- Richter SS, Gordon KA, Rhomberg PR, Pfaller MA, Jones RN. *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to penicillin: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, North America, 1998-99. *Diag Microbiol Infect Dis* 2001:83-8.
- Riedo FX, Plikaitis BD, Broome CV. Epidemiology and prevention of meningococcal disease. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14:643-57.
- Riesbeck K, Orvelid-Molling P, Fredlund H, Olcen P. Long-term persistence of a discotheque-associated invasive *Neisseria meningitidis* group C strain as proven by pulsed-field gel electrophoresis and porA gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2000;38:1638-40.
- Ringuette L, Manon L, Ryan A, Ashton F. Meningococcal infection in the province of Quebec, Canada during the period 1991 to 1992. *J Clin Microbiol* 1995;33:53-7.
- Riordan T, Cartwright K, Andrews N, Stuart J, Burris A, Fox A et al. Acquisition and carriage of meningococci in marine commando recruits *Epidemiol Infect* 1998;121:495-505.
- Riou JY, Poolman JT, Auriol J, Lomprez F, Guibourdenche M. Sero-subtyping of group B, C Y and A meningococci isolated in France 1988. *Ann Biol Clin* 1990;48:227-32.

- Rohde KH, Dyer DE. Mechanism of iron acquisition by the human pathogens *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Front Biosci* 2003;8:186-218.
- Ronne T, Berthelsen L, Buhl LH, Lind I. Comparative studies on pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* during a localised outbreak of serogroup C meningococcal disease. *Scand J Infect Dis* 1993;25:331-9.
- Rosenstein EN, Perkins BA, Stephens DS, Popovic T, Hughes JM Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2001;344:1378-86.
- 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.
- Sacchi CT, Lemos AP, Camargo MC, Whitney AM, Melles CEA, Solari CA, et al. Meningococcal disease caused by *Neisseria meningitidis* serogroup B serotype 4 in São Paulo, Brazil, 1990 to 1996. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1998;40:65-70.
- 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;39:2897-2903.
- Sacchi CT, Outerio MC, Silva de Lemos AP, Bradileone MC. Considerations on the use of *Neisseria meningitidis* class 5 proteins as meningococcal vaccine components. *Vaccine* 1995; 13:112-18.
- Sacchi CT, Pessoa LL, Ramos SR, Milagres LG, Carmago MC, Hidalgo NT et al. Ongoing group B *Neisseria meningitidis* epidemic in Sao Paulo, Brazil, due to increased prevalence of a single clone of the ET-complex. *J Clin Microbiol* 1992<sup>a</sup>;30:1734-38.
- Sacchi CT, Zanella RC, Caugant DA, Frasch CE, Hidalgo NT, Milagres NG. Emergence of a new clone of serogroup C *Neisseria meningitidis* in Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol* 1992<sup>b</sup>; 30:1282-6.
- Sáez-Nieto JA, Bisquert J, Domínguez J, López-Alonso JA. Meningitis due to a glucose-negative, maltose-negative strain of *Neisseria meningitidis*. *J Infect* 1986;12:85-6.
- Sáez-Nieto JA, Marne C, Marín M, Casanovas A, Marcos C. Persistencia y transmisión de *Neisseria meningitidis* en una familia con un caso de infección mortal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1990;8:222-24.
- Sáez-Nieto JA, Vázquez JA. Moderate resistance to penicillin in *Neisseria meningitidis*. *Microbiología SEM* 1997;13:337-42
- Sánchez JA, Cano L, Ríos M. La estacionalidad y los recientes cambios de la enfermedad meningocócica en España. *Gac Sanit* 2001;15:336-40.

- Saukkonen K, Leinonen M, Abdillahi H, Poolman JT. Comparative evaluation of potential components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and *in vitro* bactericidal assay. *Vaccine* 1989;7:325-8.
- Savelkoul PH, Aarts HJ, de Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol* 1999;37:3083-91.
- Schoeller T, Schmutzhard E. Images in clinical medicine. Waterhouse-Friderichsen syndrome. *N Engl J Med*. 2001;344:1372.
- Scholten RJ, Bijlmer HA, Poolman JT, Kuipers B, Caugant DA, van Alphen AJW et al. Meningococcal disease in the Netherlands, 1958-1990. *Clin Infect Dis* 1993;16:237-46.
- Scholten RJ, Kuipers B, Valkenburg HA, Dankert J, Zollinger WD, Poolman JT. Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *Med Microbiol* 1994;41:236-43.
- Scholz H, Hofmann T, Noack R, Edwards DJ, Stoeckel K. Prospective comparison of ceftriaxone and cefotaxime for the short-term treatment of bacterial meningitis in children. *Chemotherapy* 1998;44:142-7.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial populations genetics and systematic. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:873-84.
- Sharma M, Naqvi A, Maollod L, Khatib R. Meningococemia following tonsillectomy. *Scand J Infect Dis* 2001;33:929-30.
- Shepard CW, Rosenstein NE, Fischer M. Neonatal meningococcal disease in the United States, 1990-1999. *Pediatr Infect Dis* 2003;22:418-22.
- Shultz TR, Tapsall JW, White PA, Ryan CS, Lyras D, Rood JI et al. Chloramphenicol-resistant *Neisseria meningitidis* containing catP isolated in Australia. *J Antimicrob Chemother* 2003;52: 856-59.
- Siberry G, Brahmadathan KN, Pandian R, Lalitha MK, Steinhoff MC, John TJ. Comparison of different culture media and storage temperatures for the long-term preservation of *Streptococcus pneumoniae* in the tropics. *Bull WHO* 2001;79:43-49.
- 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 in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14:195-10.
- Simmons G, Jones N, Calder L. Equivalence of ceftriaxone and rifampicin in eliminating nasopharyngeal carriage of serogroup B *Neisseria meningitidis*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:909-11.

- Simmons G, Martin D, Stewart J, Jones N, Calder L, Bremmer 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.
- Skoczynska A, Kriz P, Konradsen HB, Hryniewicz W. Characteristics of the mayor etiologic agents of bacterial meningitis isolated in Poland in 1997-1998. *Microb Drug Resist* 2000;6:147-53.
- Smith MJ, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioassays* 2000;22:1115-22.
- Smith MJ, Smith NH, O'Rouker M, Spratt BG. How clonal are bacteria. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90:4384-88.
- Smith NH, Holmes EC, Donovan GM, Carpenter GA, Spratt BG. Networks and groups within the genus *Neisseria* analysis of *argF*, *recA*, *rho* and 16SrRNA sequences from human *Neisseria* species. *Mol Biol Evol* 1999;16:773-83.
- Soberg CO. Infecciones meningocócicas. En: Fauci AS, Braunwal E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martín JB, Kasper DL et al. Editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. Vol1. 14ª ed. España: Mc Graw -Hill-Interamericana;1998. p.1040-45.
- Sosa J, Llanes R, Guzmán D, Quintana I, Flores M, Gutiérrez O. Typing and susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Cuba (1993-1999). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:523-25.
- Sotolongo F, González N. VA-MENGOC-BC®, una década de experiencia. *Avances Médicos de Cuba* 1999;18:8-12.
- Sotolongo Padrón F. *Neisseria meningitidis*: Aspectos Teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Serie Monográfica. Ciudad Habana, Ediciones Finlay, 1995.
- Spratt BG, Bowler LD, Zhang QY, Zhou J, Smith JM. Role of interspecies transfer of chromosomal genes in the evolution of penicillin resistance in pathogenic and commensally *Neisseria* species. *J Mol Evol* 1992;34:115-25.
- Stefanelli P, Caratolli A, Neri A, Fazio C, Mastrantonio P. Prediction of decreased susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* strains by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41:4666-70.
- Stefanelli P, Fazio C, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, Mastrantonio P. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease: detection of point mutations in the *rpoB* gene and molecular characterization of the strains. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:219-22.

- 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.
- Stefanelli P, Fazio C, Neri A, Sofia T, Mastrantonio P. Emergence in Italy of a *Neisseria meningitidis* clone with decreased susceptibility to Penicillin. *Antimicrob Agents and Chemother* 2004;48:3103-06.
- Stein KE. Thymus independent and thymus dependent responses to polysaccharide antigens. *J Infect Dis* 1992;165:49-52.
- Stuart JM, Cartwright KAV, Robinson PM, Noah ND. Effect of smoking on meningococcal carriage: *Lancet* 1989;ii:723-5.
- Suker J, Feavers IM, Achtman M, Morelli G, Wang JF, Maiden MCJ. The porA gene in serogroup A meningococcus: evolutionary stability and mechanism of genetic variation. *Mol Microbiol* 1994;12: 253-65.
- Suri M, Kabra M, Singh S, Rattan A, Verma IC. Group B meningococcal meningitis in India. *Scand J Infect Dis* 1994;26:771-3.
- Takahashi H, Kuroki T, Watanabe Y, Tanaka H, Inouye H, Yamai S, et al. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. *J Med Microbiol* 2004;53:657-662.
- Takahashi H, Tanaka H, Inouye H, Kuroki T, Watanabe Y, Yamai S. Isolation from a healthy carrier and characterization of a *Neisseria meningitidis* strain that is deficient in gamma-Glutamyl aminopeptidase activity. *J Clin Microbiol* 2002;40:3035-7.
- Tappero J, Lagos R, Maldonado A, Plikaytis B, Williams D, Dykes J et al. Immunogenicity of 2 serogroup B outer membrane protein meningococcal vaccines. *JAMA* 1999; 281:1520-7.
- Tapsall JW, Shultz T, Limnios E, Munro R, Mercer J, Porritt R et al. Surveillance of antibiotic resistance in invasive isolates of *Neisseria meningitidis* in Australia 1994-1999. *Pathology*. 2001;33:359-61.
- Tenover FC, Albert RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2233-9.
- 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;38:3323-28.

- Tondella ML, Rosenstein NE, Mayer LW, Tenover FC, Stocker SA, Reeves MW et al. Lack of evidence for chloramphenicol resistance in *Neisseria meningitidis*, Africa. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1-2.
- Toro S, Berrón S, de la fuente L, Fernández S, Franco E, León L et al. Un clon de *Neisseria meningitidis* serogrupo C fue responsable en 1994 de una inusual alta tasa de cepas con resistencia moderada a penicilina en Caracas. *Enf Infecc Microbiol Clin* 1997;15:414-17.
- Trotter CL, Fox AJ, Ramsay ME, Sadler F, Gray SJ, Mallard R et al. Fatal outcome from meningococcal disease an association with meningococcal phenotype but not with reduced susceptibility to benzylpenicillin. *J Med Microbiol* 2002;51:855-60.
- Tsakris A, Trakatelli C, Souliou E, Sofianou D, Ntoutsou K, Antoniadis A. Failures of rifampicin and ciprofloxacin to eradicate a susceptible meningococcal isolate from a close contact of a fatal case. *Infection* 2001;29:293-4.
- Tsang RS, Kiefer L, Law DK, Stoltz J, Shahin R, Brow S et al. Outbreak of serogroup C meningococcal disease caused by a variant of *Neisseria meningitidis* serotype 2a ET-15 in a community of men who have sex with men. *J Clin Microbiol* 2003<sup>a</sup>;41:4411-4.
- Tsang RS, Squires SG, Tam TW. Characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive meningococcal disease cases in Canada in 2001. *Can J Microbiol* 2003<sup>b</sup>;49:633-8.
- Tsang RS, Tsai CM, Zhu P, Ringuette L, Lorange M, Law DK. Phenotypic and genetic characterization of a unique variant of serogroup C ET-15 meningococci (with the antigenic formula C:2a:P1.7,1) causing invasive meningococcal disease in Quebec, Canada. *J Clin Microbiol* 2004;42:1460-5.
- Tsend N, Enkhbold B, Deviatkina NP, Martynov IuV, Demina AA. The evolution of meningococcal infection in Mongolia. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1992;11-12:27-30
- Turner PC, Southern KW, Spencer NJ, Pullen H. Treatment failure in meningococcal meningitis. *Lancet* 1990;335:732-33
- Tyrrell GJ, Chui L, Johnson M, Chang N, Rennie RP, Talbot JA et al. Outbreak of *Neisseria meningitidis*, Edmonton, Alberta, Canada. *Emerg Infect Dis* 2002;8:519-21.
- 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.
- Uno Y. Investigate of nasopharyngeal flora in infants and children with influenza. *Kansenshogaku Zasshi* 2003;77:1024-31.
- Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. *Editorial Ciencia Médicas, Ciudad Habana, Cuba, 1991.p.13-71.*

- van Deuren M, Brandtzaeg P, van der Meer J. Update of meningococcal disease with emphasis on pathogenesis and clinical management. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:144-66.
- van Looveren M, Vandamme P, Hauchecorne M, Wijdooghe M, Carion F, Caugant DA et al. Molecular epidemiology of recent Belgian isolates of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Clin Microbiol* 1998;36:2828-34.
- Vázquez JA, Arreaza L, Block C, Ehrhard I, Gray SJ, Heuberger S et al. Interlaboratory comparison of agar dilution and E-test methods for determining the MICs of antibiotics used in management of *Neisseria meningitidis* infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3430-4.
- Vázquez JA, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:113-20.
- Vázquez JA, Marcos C, Berrón S. Sero/subtyping of *Neisseria meningitidis* isolated from patients in Spain. *Epidemiol Infect* 1994;113:267-74.
- Vázquez JA. Infección meningocócica. Informe del Laboratorio de Referencia de Meningococos. Años 1989-1992. *Bol Epidemiol Microbiol* 1993;1:209-11.
- Vázquez JA. Portadores de meningococo: un enigma a finales del siglo XX. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000;18:352-55.
- Vázquez JA. The resistance of *Neisseria meningitidis* to the antimicrobial agents: an issue still in evolution. *Rev Med Microbiol* 2001;12:39-45.
- Vázquez JA. Vacunas frente a meningitis bacteriana: ¿realidad o mito? *Aten Primaria* 2002;30:643-47.
- Verdu ME, Coll P, Fontanals D, March F, Pons I, Sanfeliu I et al. Endemic meningococcal disease in Cerdanyola, Spain 1987-93: molecular epidemiology of the isolates of *Neisseria meningitidis*. *Clin Microbiol Infect* 1996;2:168-78.
- Verdu ME, Coll P, Vázquez JA, March F, Fontanals D, Berrón S et al. Association between asymptomatic carriage and sporadic (endemic) meningococcal disease in an open community. *Epidemiol Infect* 2001;127:245-59.
- Verheul AFM, Snippe H, Poolman JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev* 1993;57: 34-39.
- Vienne P, Ducos-Galand M, Guiyoule A, Pires R, Giorgini D, Taha MK et al. The role of particular strains of *Neisseria meningitidis* in meningococcal arthritis, pericarditis, and pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003;37:1639-42.

- Virji M, Makepeace K, Ferguson DJP, Achtman M, Sakari J, Moxon ER. Expression of the Opc protein correlates with invasion of epithelial and endothelial cells by *Neisseria meningitidis*. Mol Microbiol 1992;6:2785-95.
- Visakorpi R. Ciprofloxacin in meningococcal carriers. Scand J Infect Dis 1989;60:108-11.
- Vogel U, Hammer Schmidt S, Frosch M. Sialic acids of both the capsule and the sialylated lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* serogroup B are prerequisites for virulence of meningococci in the infant rat. Med Microbiol Immunol (Berl) 1996;185:81-7.
- Vogel U, Morelli G, Zurth K, Clau H, Kriener E, Achtman M et al. Necessity of molecular techniques to distinguish between *Neisseria meningitidis* strains isolated from patients with meningococcal disease and from their healthy contacts. J Clin Microbiol 1998;36:2465-70.
- Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock 1989. Association between interleukin 6, interleukin 1 and fatal outcome. J Exp Dis 1989;169:333-8.
- Wade JJ, Graver MA. Survival of six auxotypes of *Neisseria gonorrhoeae* in transport media. J Clin Microbiol 2003;41:1720-21.
- Wasas AD, Huebner RE, De Blanche M, Klugman KP. Long-term survival of *Streptococcus pneumoniae* at room temperature on Dorset egg medium. J Clin Microbiol 1998;36:1139-40.
- Wasas AD, Huebner RE, Klugman KP. Use of Dorset Egg medium for maintenance and transport of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b. J Clin Microbiol 1999; 37:2045-6.
- Wedege E, Caugant DA, Musaschio A, Saunders NB, Zollinger WD. Redesignation of a proposed P1.15 subtype-specific meningococcal monoclonal antibody as a P1.19-specific reagent. Clin Diagn Lab Immunol 1999;6:639-41.
- Wedege E, Kuipers B, Bolstad K, van Dijken H, Froholm LO, Vermont C et al. Antibody specificities and effect of meningococcal carriage in Icelandic teenagers receiving the Norwegian serogroup B outer membrane vesicle vaccine. Infect Immun 2003;71:3775-81.
- West D, Reddin K, Matheson M, Heath R, Funnell S, Hudson M. Recombinant *Neisseria meningitidis* transferrin binding protein A protects against experimental meningococcal infection. Infect Immun. 2001;69:1561-7.
- Whalen CM, Hockin JC, Ryan A, Ashton F. The changing epidemiology of invasive meningococcal disease in Canada, 1995 through 1992. Emergence of a virulent clone of *Neisseria meningitidis*. JAMA 1995;273:390-94
- WHO. Control of Epidemic Meningococcal Disease. WHO Practical Guidelines Second edition, 1998.

- Wilder-Smith A, Paton NI, Barkham TM, Earnest A. Meningococcal carriage in Umra pilgrims returning from Saudi Arabia. *J Travel Med* 2003;10:147-9.
- Winstead JM, McKinsey DS, Tasker S, De Groote MA, Baddour B. Meningococcal pneumonia: Characterization and review of cases seen over the past 25 years. *Clin Infect Dis* 2000;30:87-94.
- Wyle FA, Artenstein MS, Brandt BL, Tramont EC, Kasper DL, Alteiri PL et al. Immunologic response of man to group B polysaccharide vaccines. *J Infect Dis* 1972;126:514-22.
- Yagupsky P, Ashkenazi S, Block C. Rifampicin-resistant meningococci causing invasive disease and failure of chemoprophylaxis. *Lancet* 1993;341:1152-53.
- Zerouali K, Elmdaghri N, Bodouma M, Benbachir M. Serogroups, serosubtypes and antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* isolates in Casablanca, Morocco. *Eur Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:483-85.
- Zhen H. Epidemiology of meningococcal disease in China. In: Vedros NA, ed. *Evolution of Meningococcal Disease*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1987; II:19-32.
- Zhu P, Tsang RS, Tsai CM. Non-encapsulated *Neisseria meningitidis* strain produces amylopectin from sucrose: altering the concept for differentiation between *N. meningitidis* and *N. polysaccharea*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:273-8.
- Zorgani AA, Stewart J, Blackwell CC, Elton RA, Weir DM. Inhibitory effect of saliva from secretor and non-secretors on binding of meningococci to epithelia cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994;9:135-42.

#### OTROS DOCUMENTOS CONSULTADOS NO PUBLICADOS

- Alea Vivian. Fenotipos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba. [Trabajo para optar por el título de Especialista de I Grado en Microbiología]. IPK-Instituto Finlay, Ciudad de La Habana, 2001.
- Álvarez N. Portadores de *Neisseria meningitidis* en una población infantil [Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología]. Ciudad de La Habana, IPK, 2001.
- Camaraza MA. Inmunidad inducida por VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en una población de adolescentes después de 12 años de la vacunación. [Trabajo para optar por el Título de Master en Ciencias en Microbiología Mención en Clínica] Ciudad Habana, Universidad de La Habana, Facultad de Biología. 2002.
- Caro Assoy E. Marcadores epidemiológicos en cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba (1985-1992) y Argentina (1991-1993). Tesis para optar por el Título Académico de

Master en Microbiología. Mención: Microbiología Clínica. Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Ciudad de La Habana, 1999.

- García AM. Estudio comparativo de la purificación por proteína A y proteína G de un anticuerpo monoclonal contra una proteína de membrana externa de *Neisseria meningitidis*. Aplicación en un ELISA de células. Trabajo de Diploma. Instituto Finlay. Facultad de Biología. Universidad de La Habana, 1991.
- García D. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. [Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología]. Ciudad de La Habana, IPK, 1998.
- López O. Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de una escuela primaria [Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología]. Ciudad de La Habana, IPK, 2002.
- Matute I. Ensayo de un diseño metodológico para la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis*. [Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología]. Ciudad de La Habana, IPK, 1998.
- Suárez Echeverría JI. Portadores de *Neisseria meningitidis* en contactos efectivos de casos presuntivos y confirmados de enfermedad meningocócica. Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología, Ciudad de La Habana, 1984.
- Zamora L. Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. Cuba (1998-1999). [Trabajo de Diploma Facultad de Biología]. Ciudad de La Habana, Universidad de La Habana, 2000.

## BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS

1. Sotolongo F, Martínez I, Sampedro MC, Arnet A. Actualización de técnicas de diagnóstico de *N. meningitidis*. Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo. MINSAP, Ciudad de la Habana. 1987.
2. Arce A, Martínez I, Sotolongo F, Patton AS, Arnet A. Comparación de los resultados de la serotipificación de *Neisseria meningitidis* por los métodos de la inmunodifusión y contraelectroforesis. Rev Cub Hig Epidemiol 1988;26:13-18.
3. Sotolongo F, Martínez I, Patton AS, Sampedro MC. Utilización de un nuevo medio de transporte y conservación para *Neisseria meningitidis*. Rev Cub Hig Epidemiol 1989;27:63-69.
4. Martínez I, Sotolongo F, Patton AS, Sampedro MC. Comparación de cuatro medios de cultivo para la conservación de *Neisseria meningitidis*. Rev Cub Hig Epidemiol 1989;27:9-16.
5. Demina AA, Devjatkina NP, Martynov YU, Koroleva IS, Moliner HT, Valcárcel NM, Martínez I, Patton AS. Two epidemiological types of meningococcal infection incidence caused by serogroup B meningococci In: Achtman M, Kohl P, Marchal C, Morelli G, Seiler A, Thiesen B (Editors). *Neisseriae-1990*. Proceedings of the VIII International Pathogenic *Neisseria* Conference, Berlin, Federal Republic of Germany, September 9-14, 1990, Walter de Gruyter Ed. 1990; p.129-134
6. Sotolongo F, Patton AS, Martínez I, Sampedro MC, Arnet A. *Neisseria meningitidis*: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 2ª ed. MINSAP, La Habana, Cuba, 1991.
7. Martínez I, Patton AS, Sotolongo P, Rico O, Rodríguez E. Septicemia a *Moraxella catarrhalis*. Reporte de un caso. ACTA CIENTIFICA SVBE 1994;3:28-30.
8. Delgado F, Llop A, Martínez I, Patton AS, Arnet A, Maestre J, Días R. Detection of pilin DNA of pathogenic *Neisserias* by Polymerase Chain Reaction. In: CJ Conde Glez, Morse S, Rice P, Sparling F, Calderón E. Pathobiology and Immunology of *Neisseriaceae*. International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México, 1994; p 459-461.
9. Galguera M, Gutiérrez M, Caro E, Rodríguez L, Sotolongo F, Sierra G, Campa C, Martínez I, Patton AS, Delgado F, Llop A. Studies of serogroup B strains of *Neisseria meningitidis*: main causal agent of the meningococcal disease in Cuba after 1980. In: CJ Conde Glez, Morse S, Rice P, Sparling F, Calderón E. Pathobiology and Immunology of *Neisseriaceae*. International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México, 1994; p. 222-225.

10. Sotolongo F, Patton AS, Martínez I, Sampedro MC, Malberty AM, Arnet A. *Neisseria meningitidis*: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 3ª ed. Instituto Finlay, La Habana, Cuba, 1994.
11. 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.
12. Patton AS, Martínez I, Valdés EA, Sosa J, Llanes R, Palma S. Estudio de la sensibilidad de *Neisseria meningitidis* a diferentes agentes antimicrobianos (enero 1990-diciembre 1992). Boletín Sociedad Venezolana Microbiología 1995;15:16-19.
13. Sotolongo F, Patton AS, Martínez I, Sampedro MC, Malberty AM, Arnet A. Monografía: *Neisseria meningitidis*: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. 4ª ed. Ediciones Finlay, Ciudad de La Habana, 1995.
14. Martínez I, Patton AS, Valdés EA, Palma S, Llanes R, Sosa J, Llop A, Sotolongo F, Sampedro MC. Estudio longitudinal de la sensibilidad por concentración mínima inhibitoria en cepas de *Neisseria meningitidis*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1996;16:74-79.
15. Delgado Bustillo J, Martínez E, Martínez M I, Tamargo I, Sierra G, Rico O. Programa Control de las Meningoencefalitis Bacterianas. MINSAP, 1997.
16. Martínez I, Palma S, Totaro R, Valdés A, Llanes R, Sosa J, Bravo J. Detección de cepas de *Neisseria meningitidis* con sensibilidad intermedia a la penicilina. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997;17:23-26.
17. Acanda ME, Leiva T, Bolaños G, Quintero R, Sotolongo F, Martínez I, Ramírez A, Ancheta O. Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997;17:149-52.
18. Almeyda L, Leiva T, Sierra G, Martínez I. Meningitis meningocócica en el Estado de Yobe, Nigeria, febrero-abril de 1996. Enfermedades Infecciosas y Microbiología, Noviembre-Diciembre 1997;17:160-63.
19. Camaraza MA, Martínez I, Arnet A, Sotolongo F, Sampedro MC, González N. Empleo del medio de transporte y conservación para el traslado de cepas de *Neisseria meningitidis* procedentes de Turquía. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997;17:164-169.
20. Sosa J, Llanes R, Martínez I, Patton AS, Gutiérrez Y, Guzmán D, García LC, Llop A. Comportamiento del sero/subtipo vacunal cubano en cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos entre 1986 y 1996. Avances en Biotecnología Moderna 1997;4:21.
21. Sotolongo PF, Martínez M I, Patton MAS, Arnet ZA, Sampedro HMA. Método de conservación y transporte con cultivo para cepas de *Neisseria meningitidis* Certificado No. 2242. Registro de Patente CIP 5 ed. C12N 1/04 1998.

22. Sosa J, Maestre JL, Martínez I, Patton AS, Llanes R, Suárez O, Llop A, Gutiérrez O, Fernández I. Estudio de DNA por análisis de restricción de cepas de *Neisseria meningitidis*. Enfermedades Infecciosas y Microbiología 1998;18:198-02.
23. Martínez I, Sotolongo F, Gutiérrez M, Sampedro MC, Arnet A, Rodríguez L, Caro E. Viabilidad de cepas de *Neisseria meningitidis* en medio TC después de 12 años de conservación a temperatura ambiente. *VacciMonitor* 1998;7:4-8.
24. Quintana I, Sotolongo F, Cuevas I, Martínez N, Velásquez JA, Álvarez Fumero R, Martínez E, Tamargo I, Pérez A, Martínez I, Leiva T. Programa Nacional de Prevención y Control de Síndromes Neurológicos Infecciosos. República de Cuba. MINSAP, 1999.
25. Guzmán D, Llanes R, Martínez I, Valdés EA, Sosa J. Primer reporte de *Neisseria polysaccharea* en Cuba. *Rev Cubana Med Trop* 1999;51:133-34.
26. Martínez I, Matute I, Gutiérrez M, Nuñez N, Sotolongo F, García D, Caro E, Rodríguez L, Leiva T, Ginebra M. Ensayo de un diseño metodológico para la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis*. *VacciMonitor* 1999;8(12): 2-9.
27. Caro E, Martínez I, Gutiérrez M, Nuñez N, Rodríguez L, Sotolongo F, Bravo J, Loren G, Caugant D, Ginebra M, Rojas N. Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante el periodo 1985-1992. *VacciMonitor* 2000;9(1):5-11.
28. Martínez I, García D, Sotolongo F, Gutiérrez M, Matute I, Nuñez N, Caro E, Rodríguez L, Ginebra M, Cuevas I. Sensibilidad a agentes antimicrobianos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. *VacciMonitor* 2000;9(2):7-13.
29. Martínez I "Neisserias y *Moraxella Catarrhalis*". En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo J. Microbiología y Parasitología Médicas. Capítulo 24. Tomo I, p 197-238. Editorial Ciencias Medicas, 2001.
30. Zamora L, Martínez I, Gutiérrez M, Ginebra M, Climent Y, Sotolongo F, Camaraza MA. Serogrupos, serosubtipos, inmunotipos y sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores. *VacciMonitor* 2002;11(1):1-4.
31. Climent Y, Martínez I, Nuñez N, Ginebra M, Zamora L, Gutiérrez M, Sotolongo F, Acosta A, Climent L. Detección e identificación por PCR de microorganismos causantes de meningoencefalitis bacteriana. *VacciMonitor* 2002;11(2):2-5.
32. Álvarez N, Martínez I, Sotolongo F, Gutiérrez M, Zamora L, Izquierdo L, Climent Y, Ginebra M. *Neisseria meningitidis* carriers in a day-care center in the city of Havana. In: Abstracts of the XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Oslo, Noruega, Sep. 16, 2002. Editors Dominique A. Caugant, Elisabeth Wedege 2002; p. 329.

33. Climent Y, Martínez I, Núñez N, Ginebra M, Zamora L, Gutierrez M, Sotolongo F, Acosta A. Detection and identification by PCR microorganisms causing bacterial meningitis. In: Abstracts of the XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Oslo, Noruega, Sep. 1-6, 2002. Editors Dominique A. Caugant, Elisabeth Wedege 2002; p. 342.
34. Zamora L, Martínez I, Gutiérrez M, Núñez N, Ginebra M, Climent Y, Sotolongo F. Reduced sensibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba. In: Abstracts of the XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Oslo, Noruega, Sep. 1-6, 2002. Editors Dominique A. Caugant, Elisabeth Wedege 2002; p. 404.
35. Martínez I, Sotolongo F, Zamora L, Caro E, García D, Gutiérrez M, Núñez N, Llanes R, Palma S, Arnet A, Valdés EA. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba during 1985-2000 period. In: Abstracts of the XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Oslo, Noruega, Sep. 1-6, 2002. Editors Dominique A. Caugant, Elisabeth Wedege 2002; p. 372.
36. Camaraza MA, Ochoa R, Arnet A, Sotolongo F, Martínez I, Cuevas I, Ferriol X, Hernández D. Assessment of immune response against C11 (ATCC) strain induced by Cuban meningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>) in adolescents of Ciego de Avila, Cuba. In: Abstracts of the XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Oslo, Noruega, Sep. 1-6, 2002. Editors Dominique A. Caugant, Elisabeth Wedege 2002; p. 240.
37. Alea V, Martínez I, Sotolongo F, Núñez N, Gutiérrez M, Zamora L, Climent Y, Izquierdo L, Ginebra M, Álvarez N. Phenotypes of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba (1982-2001). In: Abstracts of the XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC). Oslo, Norway, Sep. 1-6, 2002. Editors Dominique A. Caugant, Elisabeth Wedege 2002; p.240.
38. 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.
39. 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.
40. Alea V, Martínez I, Sotolongo F, Gutiérrez M, Núñez N Fenotipos y susceptibilidad a la penicilina de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba. Rev Cub Farmacia. Vol 38, No Especial; 2003:1-5.En: [http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol37\\_s\\_03/farsus02.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol37_s_03/farsus02.htm)
41. Martínez I, Sotolongo F, Llanes R, Palma S, Zamora L, García D, Caro E. Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de enfermos y portadores. Rev Cub Farm Vol 38, No. Especial; 2003:78-82. [http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol37\\_s\\_03/farsus02.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol37_s_03/farsus02.htm).

42. Camaraza MA, Ochoa R, Arnet A, Sotolongo F, Martínez I, Cuevas I, Hernández D. Inmunogenicidad inducida por la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> contra la cepa de *N. meningitidis* ATCC C11 en adolescentes después de 12 años de vacunados. Rev Cub Med Trop 2004;56:26-30.
43. Martínez M I Sotolongo F, Camaraza MA, Arnet A. Survival of *Neisseria meningitidis* in a transport–conservation medium. A 12 years study. Reseñas en Quimioterapia Latinoamericana 2004;2(6):176-78.

#### **BIBLIOGRAFÍA DEL AUTOR NO RELACIONADA CON EL TEMA DE TESIS**

1. Suárez Hernández M, Martínez I, Cesar J, Valdés L, Toriza F, Salazar A. Evaluación de las pruebas de seroaglutinación lenta, mercaptoetanol, fijación del complemento y rosa de bengala en casos de brucelosis humana y serorreectores. Rev Cub Hig Epidemiol 1984;22:416-31.
2. Suárez Hernández M, Rodríguez R, Martínez I, Falcón A, Lorenzo P. Evaluación de distintas formas clínicas de la leptospirosis detectadas por macroaglutinación rápida y hemoaglutinación en pacientes de la provincia de Ciego de Ávila. Rev Cub Hig Epidemiol 1987;25:405-17.
3. Llanes R, Azahares L, Pérez M, Martínez I, Patton A. Resistencia antimicrobiana de *H. influenzae* en la ciudad de La Habana, Cuba. Rev Argentina Microbiol 1996 28: 17-21.
4. Sosa J, Llop A, Martínez I, Sotolongo F. Characterization of *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated from a conjunctivitis outbreak. In: Zollinger WD, Frasch CE, Deal CD. Proceedings Pathogenic *Neisseria*. X International Pathogenic *Neisseria* Conference. Baltimore, Maryland, USA. 1996; p 49-51.
5. Llanes R, Sosa J, Martínez I, Llop A, Palma S, Valdés EA, Pino Y, Sotolongo F. In: Antimicrobial susceptibility of 42 *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in 1995, in Cuba. In: Zollinger WD, Frasch CE, Deal CD. Proceedings Pathogenic *Neisseria*. X International Pathogenic *Neisseria* Conference. Baltimore, Maryland, USA. 1996; p.52-54.
6. Martínez I, Sosa J, Llanes R, Valdés EA, Palma S. Medio de cultivo para el transporte y conservación de *N. gonorrhoeae*. Registro de Patente CIP 6 ed. C12N 1/04 1998.
7. Llanes R, Sosa J, Martínez I. Detection of PPNG strains in Cuba. 1995-1998. Journal Sexually Transmitted Infections 2000;76:58-90.
8. Llanes R, Gonzáles M, Martínez I, Sánchez L, Sosa J, Guzmán D, Sotolongo F. Comparison of four methods for detection B-lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae*. In: Abstract Guide XII International Pathogenic *Neisseria* Conference, Texas, USA 2000; p. 78.

9. Quiñones D, Tamargo I, Martínez I Colonización nasofaríngea de *Moraxella catarrhalis* en niños sanos y su sensibilidad a drogas antimicrobianas. CD-ROM SLIPE 2001, Memorias IX Congreso Latinoamericano de Infectología, El Salvador, SLIPE 2001.
10. Llanes R, Sosa J, Guzmán D, Llop A, Valdés EA, Martínez I, Palma S, Lantero MI. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Cuba (1995-99). Implications on Therapy of Gonorrhoea. Sex Transm Dis 2003;30:10-14 .
11. Villasusa I, Llanes R, Sosa J, Martínez I, García J. Resistencia de cepas de *Neisseria gonorrhoeae* aisladas en Cuba. Memorias Foro 2003, T4 0162.
12. Llanes R, González M, Martínez I, Sosa J, Guzmán D, Gutiérrez O, Llop A, Sánchez L. Evaluation of four methods for detecting the beta-lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003;98:1089-91.

#### **TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS PRESENTADOS EN EVENTOS CIENTÍFICOS**

1. I Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. La Habana, 1981.
  - Enfermedad meningocócica: Estudio comparativo durante los años 1979-80 en la provincia de Ciego de Ávila.
2. I Jornada Científica del Hospital Provincial Docente “Antonio Luaces Iraola” de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, 1982.
  - Enfermedad meningocócica en la sala de infeccioso del Hospital Provincial Docente.
3. II Simposio Nacional de Enfermedad Meningocócica. La Habana, 1984.
  - Diagnóstico bacteriológico de la enfermedad meningocócica en el Hospital Provincial Docente de Ciego de Ávila.
  - Estudio de la enfermedad meningocócica en la provincia de Ciego de Ávila, 1980-83. Análisis clínico y de laboratorio.
4. II Congreso Nacional de Microbiología y Parasitología. La Habana, 1985.
  - Serotipificación y fagotipaje de cepas de *Neisseria meningitidis*
  - Utilización de un nuevo medio para el transporte-conservación de *N. meningitidis*.
5. III Congreso Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, 1986.
  - Comparación de 4 medios de cultivo para la conservación de *N. meningitidis*.
  - Diagnóstico de le enfermedad meningocócica según el aspecto del LCR.
  - Tipificación por PAGE de cepas de *N. meningitidis* provenientes de enfermos (1985).
6. V International Pathogenic *Neisseria* Conference. Amsterdam, Holanda, 1986.

- Epidemiological characteristics of *Neisseria meningitidis* B epidemic in Cuba.
  - Use a new culture medium for transport and preservation of *N. meningitidis*.
7. Congreso 50 Aniversario del IPK. La Habana, 1988.
    - Sensibilidad a los antimicrobianos en cepas de meningococo procedentes de enfermos.
    - Sensibilidad antimicrobiana en cepas de *N. meningitidis* procedentes de portadores.
    - Tipificación de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores.
    - COA con AcM contra *N. meningitidis*: uso en el diagnóstico e investigación.
    - Aspectos epidemiológicos de la enfermedad meningocócica en Cuba
    - *N. meningitidis*: Estudio inmunopidemiológico.
  8. VII International Pathogenic *Neisseria* Conference. Berlin, Federal Republic of German, 1990.
    - Two epidemiological types of meningococcal infection incidence caused by serogroup B meningococci.
  9. III Congreso Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, 1990.
    - Serotipificación de *N. meningitidis* en el LNRM, Cuba, 1er. Semestre.
    - Estudio de la sensibilidad por CMI en cepas de *N. meningitidis*.
  10. XI Seminario Científico del CNIC. La Habana, 1990.
    - Estudio preliminar de la tipificación de cepas de *N. meningitidis* por ELISA celular con un AcM.
    - Estudio de la sensibilidad antimicrobiana en cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba.
    - Tipificación por PAGE de cepas de *N. meningitidis* procedentes de enfermos.
  11. I Seminario Latinoamericano de Infectología. La Habana, 1992.
    - Estudio de 5 años de cepas de *N. meningitidis* procedentes de enfermos por PAGE (1986-90).
    - Detección de DNA de pili de *Neisserias* patógenas por PCR.
    - Estudio de la sensibilidad a los agentes antimicrobianos en cepas de *N. meningitidis* procedentes de Cuba y el extranjero.
    - Comportamiento de anticuerpos antimeningocócicos en niños entre 5-12 años de edad vacunados con VA-MENGOC-BC®.
  12. VIII International Pathogenic *Neisseria* Conference. Cuernavaca, México, 1992.
    - Detection of pilin DNA of pathogenic *Neisserias* by Polimerase Chain Reaction.
    - Studies of serogroup B strains of *Neisseria meningitidis*: main causal agent of the meningococcal disease in Cuba after 1980.
  13. IV Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. IV Congreso Ecuatoriano de Medicina Tropical y Parasitología. Guayaquil, Ecuador, 1993.
    - Sensibilidad por el método de CMI en cepas de *N. meningitidis* procedentes de enfermos.

- Estudio de 3 años de cepas de *N. meningitidis* procedentes de enfermos.
- 14. IV Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología y I Congreso Cubano de Medicina Tropical. La Habana, 1993.
  - Evaluación serológica de VA-MENGOC-BC® por un período de 30 meses en una población de riesgo.
  - Estudio de la sensibilidad por CMI en cepas de *N. meningitidis* por un período de 7 años (1986-92).
  - Tipificación de cepas de *N. meningitidis* durante un período de 7 años (1986-92).
- 15. II Seminario Latinoamericano de Infectología. La Habana, 1994.
  - Sensibilidad por CMI en cepas de *N. meningitidis*.
  - Mesa Redonda sobre Enfermedad Meningocócica en Cuba.
- 16. XVII Jornadas Venezolanas de Microbiología “Dr. José Antonio Serrano”. Mérida, Venezuela, 1994.
  - Simposio “Meningitis”.
  - Tipificación de *N. meningitidis* por PAGE.
  - Sensibilidad por CMI en cepas de *N. meningitidis*.
- 17. V Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical, V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. La Habana, 1997.
  - Empleo del medio de transporte y conservación (TC) para el traslado de cepas de *N. meningitidis* procedentes de Turquía.
- 18. V Congreso Latinoamericano de Medicina Tropical. V. Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. II Congreso Cubano de Medicina Tropical, La Habana, 1997.
  - Detección de cepas de *N. meningitidis* con sensibilidad intermedia a la penicilina por el método de concentración mínima inhibitoria.
- 19. VII Congreso Latinoamericano de Infectología Pediátrica. III Congreso Venezolano de Infectología “Dr. Raúl Iztúriz”. Mérida, Venezuela, 1997.
  - Sensibilidad antimicrobiana a la penicilina en cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba.
- 20. II Taller Nacional de Medios de Cultivo. BIOCEN-QUELAB-CIENVAR, La Habana, Cuba, 1997.
  - Diseño y desarrollo de medios de cultivo para la producción biotecnológica y biofarmacéutica.
- 21. Inmunoensayo/97. La Habana, 1997.
  - Determinación de adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales Hep-2 mediante citometría de flujo.

22. Primer Seminario-Taller sobre aspectos básicos del diagnóstico microbiológico de *Neisseria meningitidis*. Santo Domingo, República Dominicana, 9, 10, 11 de octubre, 1997.
  - Diagnóstico laboratorio de *Neisseria meningitidis*
23. Taller Nacional de Síndromes Neurológicos Infecciosos. Instituto Finlay, 1997, La Habana, Cuba.
24. Taller de Síndromes Neurológicos Infecciosos. La Habana, 1998.
25. XI International Pathogenic *Neisseria* Conference. 1-6 November 1998, Nice, France.
  - Viability of *Neisseria meningitidis* strains after 12 years incubation in TC medium at room temperature.
  - TC medium for transport, storage and characterization of *Neisseria meningitidis* strains from Turkey.
26. Taller internacional de avanzada en el diagnóstico microbiológico. CIMEQ, 1998.
  - Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* por ELISA de células enteras con AcM.
27. I Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. CIMEQ, 1999.
  - Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores.
  - Ensayo de una nueva metodología en la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis*.
28. BIOTECNOLOGIA HABANA/99, 1999.
  - Serogrupos, serotipos, subtipos y variables asociadas en cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores.
29. XIII Forum de Base del Instituto Finlay (Resultado Relevante).
  - Ensayo de una nueva metodología en la búsqueda de portadores de *N. meningitidis*. XIII Forum de Base del Instituto Finlay.
  - XIII Forum de Base del Instituto Finlay (Mención Destacada).
  - Caracterización fenotípica de cepas de *N. meningitidis* procedentes de la epidemia de Nueva Zelanda.
30. IV Jornada Internacional de Infectología Pediátrica y I de la Filial Cubana de la SLIPE, Holguín, Cuba, 2000
  - Tipos electroforéticos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba.
31. Infecciosas 2K. II Congreso Internacional de la Enfermedad Meningocócica en República Dominicana. I Congreso Internacional de Enfermedades Infecto-Contagiosas. Santo Domingo, República Dominicana, 2000.
  - Marcadores epidemiológicos de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores en Cuba, 1998-1999.

- Resistencia de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba: Resultados obtenidos durante 15 años de estudio.
- 32. Taller Pre-Congreso XIII Seminario Científico CNIC, Ciudad de La Habana y APUA, Capítulo Cuba, Junio 23 y 24, 2000.
  - Resistencia a drogas antimicrobianas de cepas de *Neisseria meningitidis*.
- 33. XIII Seminario Científico CNIC, Ciudad de La Habana, 2000
  - Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba (1985-1992) y Argentina (1991-1993).
  - Resistencia de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores.
- 34. X Congreso de la Asociación Panamericana de Infectología y Microbiología Clínica, VI Congreso de la Asociación Mexicana para el Estudio de las Infecciones Nosocomiales y II Congreso Panamericano de SIDA, Guadalajara, México, 2001.
  - Serogrupos, serotipos, tipos electroforéticos y sensibilidad a agentes antimicrobianos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba.
  - Resistencia de cepas de *N. meningitidis* a diferentes antimicrobianos. Resultados obtenidos en Cuba: 1985-1999.
  - Detección e identificación por PCR de microorganismos causantes de meningoencefalitis bacteriana.
  - Gérmenes patógenos más frecuentemente aislados en exudados nasofaríngeos de niños asmáticos.
- 35. XIII International Pathogenic *Neisseria* Conference (IPNC).Oslo, Norway, 2002.
  - Reduced sensibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba.
  - Antimicrobial susceptibility of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba during 1985-2000 period.
  - *Neisseria meningitidis* carriers in a day-care center in the city of Havana.
  - Detection and identification by PCR microorganisms causing bacterial meningitis.
  - Assessment of immune response against C11 (ATCC) strain induced by Cuban meningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>) in adolescents of Ciego de Avila, Cuba.
  - Phenotypes of *Neisseria meningitidis* strains isolated in Cuba (1982-2001)
- 36. Seminario-Taller “Epidemiología y Caracterización Microbiológica de *Neisserias* Patógenas”. Santo Domingo, República Dominicana, 2002.
- 37. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical, La Habana, Cuba.

- Tipos electroforéticos y su asociación con otros marcadores epidémicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba.
38. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical, La Habana, Cuba, 2002
- Fenotipos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba (1982-2000).
  - Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *N. meningitidis* aisladas en Cuba.
  - Portadores de *Neisseria meningitidis* y otros microorganismos potencialmente patógenos en niños de un círculo infantil.
39. Convención de Ciencias Básicas Médicas, Girón, 2002.
- Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de un círculo infantil.
40. VI Congreso Latinoamericano de Inmunología. III Congreso Cubano de Inmunología. La Habana, 2002
- Risk factors for carriage of *Neisseria meningitidis* in a Primary School in Havana.
41. Encuentro Interamericano de Farmacia y Nutrición. La Habana, Cuba, 2002.
- Fenotipos y sensibilidad a la penicilina de cepas de *Neisseria meningitidis*.
  - Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores.
42. X Congreso de SLIPE. Sociedad Latinoamericana de Infectología Pediátrica. XXIV Congreso Uruguayo de Pediatría. III Jornadas Uruguayas de Enfermería Pediátrica. 14-17 mayo de 2003. Montevideo-Uruguay.
- Portadores de *Neisseria meningitidis* en una escuela primaria.
  - Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de un círculo infantil.
  - Sensibilidad a la penicilina de cepas de *Neisseria meningitidis*.
43. XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica. La Habana, 2003.
- Anticuerpos monoclonales útiles en ensayos de identidad y consistencia en los preparados vacunales VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> y MenB (Mención Especial).
44. XV Forum de Ciencia y Técnica (Primera Etapa). Instituto Finlay, junio de 2003. La Habana, Cuba.
- Portadores de *N. meningitidis* en una escuela Primaria. XV Forum de Ciencia y Técnica (Primera Etapa). Instituto Finlay, junio de 2003. La Habana, Cuba.
  - Evaluación de la respuesta inmune contra cepas homólogas y heterólogas inducidas por las vacunas antimeningocócicas VA-MENGO-BC<sup>®</sup> y MEN B en modelos animales. XV Forum de Ciencia y Técnica (Primera Etapa). Instituto Finlay, junio de 2003. La Habana, Cuba.
45. "Biotecnología Habana 2003". Aplicaciones Médicas de la Biotecnología. 23-28 noviembre 2003.

- *Neisseria meningitidis* carriers in a primary school.
  - "Susceptibility to penicillin of *Neisseria meningitidis* strains.
  - *Neisseria meningitidis* carriers in a nursery in the city of Havana.
  - Assessment of immune response against C11 (ATCC) strain induced by Cuban meningococcal vaccine (VA-MENGOC-BC®) in adolescents of Ciego de Avila, Cuba.
46. V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. Centro de Convenciones "Plaza América, Varadero, Cuba, 24-27 de marzo, 2004.
- Evaluación de la respuesta de anticuerpos frente a la cepa C11 ATCC inducida por VA-MENGOC-BC® y estudio de portadores en adolescentes de Ciego de Ávila (2000-2002).
  - Sensibilidad a la penicilina de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba.
  - Factores de riesgo y portadores de *Neisseria meningitidis* en una población escolar de Ciudad de La Habana.
  - Prevalencia de microorganismos potencialmente patógenos en la nasofaringe de niños de un círculo infantil de Ciudad de La Habana. V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica. Centro de Convenciones "Plaza América. (Premio).

#### **LOGROS NACIONALES, PREMIOS FORUM DE CIENCIA Y TÉCNICA, RESULTADOS RELEVANTES RELACIONADOS CON EL TEMA DE TESIS**

1. Medio de transporte-conservación de cepas de *N. meningitidis*. Premio ANIR, 1986.
2. Perfeccionamiento del diagnóstico convencional e introducción al diagnóstico rápido de las infecciones respiratorias agudas bacterianas, IRAB (Logro Academia de Ciencias de Cuba, 1991).
3. Introducción de tecnología de avanzada en el diagnóstico rápido de algunas enfermedades infecciosas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Logro Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 1992).
4. Comprobación epidemiológica de la efectividad de VA-MENGOC-BC® (Logro Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 1992).
5. Estudio de cepas de *N. meningitidis* serogrupo B: Principal agente causal de la enfermedad meningocócica en Cuba (Logro Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 1993).
6. Estudio longitudinal durante 8 años de la sensibilidad por concentración mínima inhibitoria de cepas de *N. meningitidis* (Logro Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 1995).

7. Estudio longitudinal de la sensibilidad antimicrobiana por concentración mínima inhibitoria (CMI) de cepas de *N. meningitidis* (Mención Especial, X Forum Nacional de Ciencia y Técnica).
8. Estudio longitudinal de la sensibilidad antimicrobiana por concentración mínima inhibitoria (CMI) de cepas de *N. meningitidis* (Mención Especial), X Forum Provincial de Ciencia y Técnica, 1995).
9. Empleo del medio de transporte y conservación TC en el traslado de cepas de *N. meningitidis* procedentes de Turquía. (Destacado en el 1er. Taller Nacional Colecciones de Cultivo, 1996).
10. Uso del medio de transporte y conservación TC para el traslado de cepas de *N. meningitidis* procedentes de Turquía (Destacado en el Primer Forum de Base del Instituto Finlay, 1996).
11. Viabilidad de cepas de *N. meningitidis* en medio de transporte y conservación después de 12 años a temperatura ambiente (Relevante en el XII de Base del Instituto Finlay, 1997).
12. Impacto epidemiológico de la aplicación de la vacuna VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en la República de Cuba: Un nuevo enfoque para su evaluación post-licenciamiento (Resultado Relevante IPK, Logro Anual de la Academia de Ciencias de Cuba).
13. Comportamiento del sero/subtipo vacunal cubano en cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en enfermos desde 1986 a 1996 (Resultado Relevante IPK, 1997).
14. Sensibilidad antimicrobiana de cepas de *N. meningitidis* aisladas de portadores (Destacado en el Forum de Base Instituto Finlay, 1998).
15. Ensayo de una nueva metodología en la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis* (Relevante en el Forum de Base del Instituto Finlay, 1999).
16. Enfermedad meningocócica. Resultados de 17 años de vigilancia (Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2000).
17. Enfermedad meningocócica. Resultados de 17 años de vigilancia (Premio Anual del Ministerio de Salud Pública, 2001).
18. Evaluación de la respuesta anamnésica inducida por VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en adolescentes después de 12 años de su aplicación. (Destacada. Forum de Base Instituto Finlay, 2001).
19. Enfermedad meningocócica: 17 años de vigilancia. Premio en la Categoría de Investigación Aplicada. Consejo Nacional de Sociedades Científicas de la Salud del Concurso Nacional del Premio Anual de la Salud, Año 2001.
20. Microbiología y Parasitología Médicas (Libro). Premio de la Crítica Científico-Técnica 2001. Instituto Cubano del Libro, 2001.
21. Microbiología y Parasitología Médica (Libro). Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2001.

22. Microbiología y Parasitología Médicas (Libro) Ponencia Relevante XIV Forum Provincial de Ciencia y Técnica. Noviembre 2002.
23. Enfermedad meningocócica: 17 años de vigilancia. Mención Especial XIV Forum Nacional de Ciencia y Técnica, Enero 2003.
24. Portadores de *Neisseria meningitidis* en una escuela Primaria. Mención Especial XV Forum de Ciencia y Técnica (Primera Etapa). Instituto Finlay, Junio de 2003. La Habana, Cuba.
25. Evaluación de la respuesta inmune contra cepas homólogas y heterólogas inducidas por las vacunas antimeningocócicas VA-MENGO-BC y MEN B en modelos animales. Destacado XV Forum de Ciencia y Técnica (Primera Etapa). Instituto Finlay, Junio de 2003. La Habana, Cuba.
26. Prevalencia de microorganismos potencialmente patógenos en la nasofaringe de niños de un círculo infantil de Ciudad de La Habana. Trabajo Premiado en la “V Jornada Internacional de Infectología Pediátrica”. Centro de Convenciones “Plaza América”, Marzo 2004.
27. Anticuerpos monoclonales útiles en ensayos de identidad y consistencia en los preparados vacunales VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> y MenB. Mención Especial XV Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 2003.
28. Evaluación de la respuesta inmune contra cepas homólogas y heterólogas inducida por el candidato vacunal MenB en modelos animales así como su seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad en voluntarios humanos. Destacado XV, Forum de Base del Instituto Finlay, Junio del 2004.

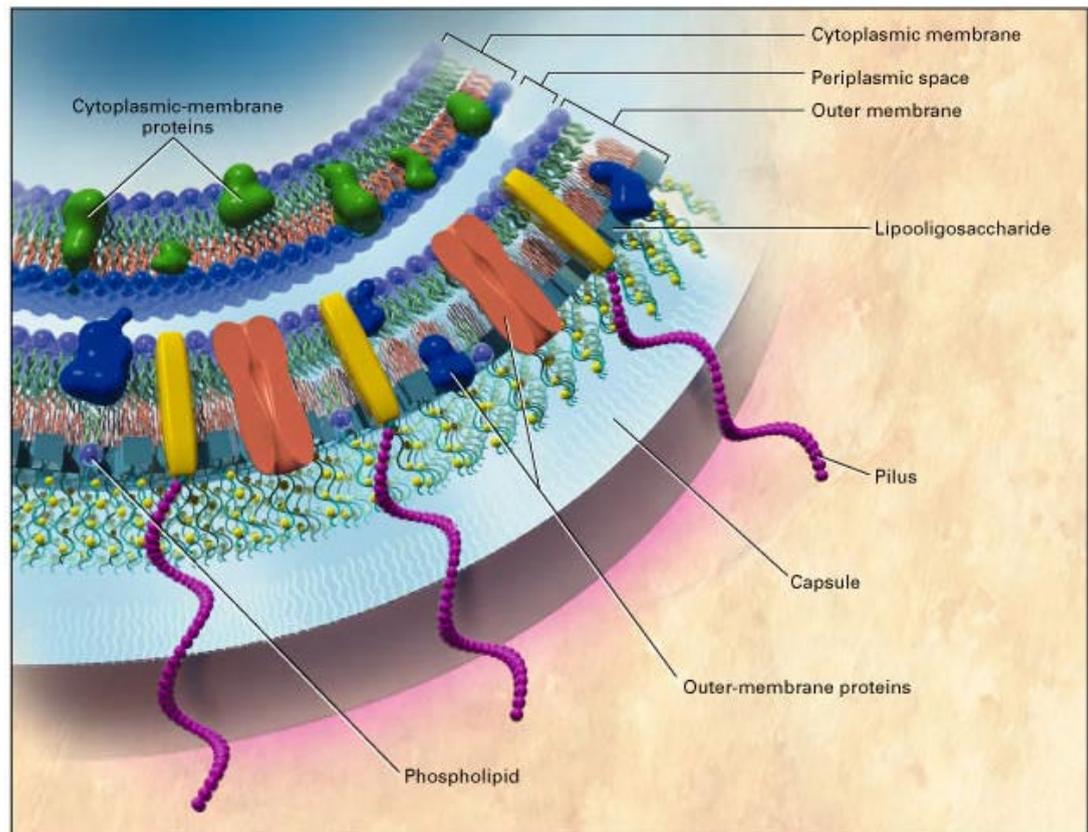
#### **TUTORÍAS Y/O ASESORÍAS DEL AUTOR RELACIONADAS CON EL TEMA DE TESIS**

1. Respuesta serológica a la vacuna antimeningocócica BC cubana en niños de una escuela primaria. Trabajo para optar por el Título de Médico Especialista de I Grado en Microbiología. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba, 1990.
2. Detección de la enzima beta-lactamasa y plásmidos en cepas de *Neisseria meningitidis* con sensibilidad disminuida a la penicilina. Proyecto de Grado para obtener el Título de Técnico Medio de Laboratorio. IPK, Instituto Mártires de Girón, 1993.
3. Detección de cepas de *Neisseria meningitidis* moderadamente resistentes a la penicilina. Trabajo para optar por el Título de Master en Microbiología. Perfil Bacteriología-Micología. IPK, Instituto Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
4. Diferenciación y caracterización de cepas previamente identificadas como *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores nasofaríngeos. Trabajo de Diploma, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 1996.

5. Adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales. Trabajo para optar por el Título de Master en Microbiología. Perfil Bacteriología-Micología. IPK, Instituto Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
6. Determinación de adherencia de *Neisseria meningitidis* a células epiteliales Hep-2 mediante citometría de flujo. Trabajo para optar por el Título de Médico Especialista de I Grado en Microbiología. IPK, Instituto Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba, 1997.
7. Ensayo de una nueva metodología en la búsqueda de portadores de *Neisseria meningitidis*. Tesis para optar por el Título de Médico Especialista de I Grado en Microbiología, Instituto Finlay, IPK. La Habana, Cuba, 1998.
8. Estudio de la sensibilidad antimicrobiana en cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. Tesis para optar por el Título de Médico Especialista de I Grado en Microbiología, La Habana, Cuba, 1998.
9. Marcadores epidemiológicos en cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba (1985-1992) y Argentina (1991-1993). Tesis para optar por el Título Académico de Master en Microbiología. Mención: Microbiología Clínica. Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Ciudad de La Habana, 1999.
10. Marcadores epidemiológicos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. Cuba (1998-1999). Trabajo de Diploma, Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Ciudad de La Habana, Cuba, 2000.
11. Nuevos cebadores para la detección de microorganismos causantes de meningoencefalitis bacteriana. Trabajo de Diploma, Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Ciudad de La Habana, Cuba, 2000.
12. Portadores de *Neisseria meningitidis* en una población infantil. Tesis para optar por el Título de Médico Especialista de I Grado en Microbiología. La Habana, Cuba, 2001.
13. Fenotipos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba. Tesis para optar por el Título de Médico Especialista de I Grado en Microbiología. La Habana, Cuba, 2001.
14. Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de una escuela primaria de Ciudad de La Habana. Trabajo para optar por el Título de Especialista de I Grado en Microbiología. Ciudad de La Habana, Cuba, 2002.
15. Inmunidad inducida por VA-MENGOC-BC® en una población de adolescentes después de 12 años de la vacunación. Tesis para optar por el Título Académico de Master en Microbiología. Mención: Microbiología Clínica. Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Ciudad de La Habana, 2002.

16. Sensibilidad a la penicilina y fenotipos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba. Trabajo para optar por el Título de Master en Bacteriología-Micología. Instituto Finlay-IPK. Ciudad de La Habana, Cuba, 2003.
17. Prevalencia de microorganismos potencialmente patógenos en la nasofaringe de niños de un “Círculo Infantil”. Trabajo para optar por el Título de Master en Microbiología. Perfil Bacteriología-Micología. IPK, Instituto Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba, Enero 2004.

## **ANEXOS**

Anexo 1. Estructura antigénica de *N. meningitidis*

Tomado de: N Engl J Med 2001; 344; 1380. [www.nejm.org](http://www.nejm.org)

Anexo 2. Cronología de los hechos más importantes de la historia de la EM en Cuba (Valcárcel y cols., 1991; Sotolongo, 1999).

- 1916: Se citan los primeros casos de meningitis cerebroespinal epidémica por Martínez Fortún en su cuaderno *Historia Sanitaria*.
- 1921: Se plantea por Martínez Fortún un brote epidémico de EM en Ciudad de La Habana.
- 1925: Se registran casos de meningitis cerebroespinal en Cuba.
- 1925-1934: Notifican 7 casos de meningitis cerebroespinal epidémica en Cuba.
- 1929-1937: Sólo se conoce del informe de un caso de EM en una niña de 13 años de edad.
- 1938: Se realiza el primer diagnóstico bacteriológico de *N. meningitidis* por Martínez Cruz y Curbelo.
- 1946. Realizan el segundo aislamiento bacteriológico de *N. meningitidis*
- 1948: El Dr. Martínez Cruz presenta el primer trabajo recopilatorio de 340 meningitis purulenta en la infancia (1937-1947) y entre éstos, 5 casos corresponden a *N. meningitidis* (4 serogrupo C y 1 B).
- 1938-1970: Casos de EM muy esporádicos, su notificación varía entre 10 y 41 al año.
- 1968-1971: El Dr. Córdova Vargas, en el Hospital William Soler de Ciudad de La Habana, realiza un estudio controlado de los síndromes neurológicos infecciosos (SNI) atendidos en esa unidad y observa que de 94 aislamientos obtenidos en niños mayores de 1 mes de nacidos, *N. meningitidis* se aísla en 18 casos (19,2%).
- 1969: Se publica por la Comisión Nacional de SNI del MINSAP, un manual titulado “Nomenclatura, clasificación y estudio clínico de las infecciones del sistema nervioso central”, dirigido a los médicos generales.
- 1971: Se discute en la IV Reunión Nacional de Laboratorios de Higiene, Epidemiología y Microbiología, las Normas de Microbiología que incluyen el estudio de las muestras de LCR y el hemocultivo.
- 1973: Asiste delegación de Cuba al “Simposio Internacional sobre Meningitis Cerebroespinal Epidémica: Clínica, Epidemiología y Microbiología” y se presenta el trabajo “Estudios etiológicos de las meningitis en Cuba”.
- 1974: Aunque la EM no constituía un problema de salud para Cuba, en el “II Forum Nacional de Higiene y Epidemiología”, de La Ciudad de La Habana, se establecen las medidas de control a seguir en esta entidad clínica.
- 1975: Se revisan de nuevo por la Dirección Nacional de Epidemiología del MINSAP, los aspectos epidemiológicos y de laboratorio relacionados con la EM, en respuesta a la nota de

- alerta enviada por la OPS, sobre el peligro que representaba para los países del continente americano, la epidemia de meningitis meningocócica que desde 1971, se desarrollaba en Brasil.
- 1976: Marca el comienzo de la epidemia con el brote intradomiciliario más importante ocurrido hasta esa fecha, en sólo 17 días, se presentan 6 casos y 3 fallecidos. Se aisló *N. meningitidis* serogrupo A, sensible a la sulfadiacina sódica.
  - 1977: Se eleva la incidencia de EM en un 50%, del 0,4-0,8/100 000 habitantes; los lugares más afectados son: Isla de la Juventud, Ciudad de La Habana, Villa Clara y La Habana. La problemática epidemiológica refleja un mayor riesgo en escolares y reclusos.
  - 1978: La Dirección Nacional de Higiene y Epidemiología, crea en el Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología, el Centro Nacional de Referencia para Meningococo. Se solicitó la importancia de los recursos necesarios para desarrollar los laboratorios provinciales y de los hospitales con vistas a mejorar el diagnóstico de la EM. Realizan el primer estudio de portadores y detectan una prevalencia del 36,9%. Este estudio tiene el mérito de ser el primero que brinda la prevalencia de portadores con el empleo del medio selectivo de Thayer Martin y plantea la existencia de cepas resistentes a la sulfadiacina sódica. La incidencia de EM resulta de 1,8/100 000 y las provincias más afectadas son: Isla de la Juventud, Sancti Spiritus, Cienfuegos, Villa Clara, Las Tunas, Ciudad de La Habana y Matanzas, predominan los serogrupos C (50%) y B (34,3%).
  - 1979: Realizan inmunización masiva a la población entre 3 meses y 19 años con la vacuna francesa A-C (Mérieux). Crean la Comisión Nacional y Comisiones Provinciales de SNI. Ponen en marcha el Sistema de Vigilancia Epidemiológica y se crea el Programa de Lucha para la EM. Se conocen con certeza los serogrupos circulantes y se verifica la presencia de cepas resistentes a las sulfamidas, eliminándose este antimicrobiano como quimioproláctico. La incidencia es de 5,6/100 000 habitantes con un mayor número de casos en: Las Tunas, Villa Clara, Sancti Spiritus, Isla de la Juventud y Ciego de Ávila.
  - 1980: Caracterizan a la EM como el primer problema epidemiológico del país. La incidencia se eleva a 5,9/100 000 habitantes y existe un alarmante ascenso del serogrupo B. Entre las provincias más afectadas se sitúan: Villa Clara, Las Tunas y Ciego de Ávila. Se perfecciona el diagnóstico bacteriológico y el Sistema de Vigilancia de los SNI.
  - 1981: Inician las investigaciones para lograr un preparado vacunal efectivo contra *N. meningitidis* B y realizan estudios con la vacuna A-B-C soviética. La incidencia asciende a 9,4/100 000 habitantes con un mayor número de casos en Ciego de Ávila, Villa Clara y Camagüey. El serogrupo B, representa el 93,6% de los aislamientos, seguido por el C (3,6%). Realizan estudios de portadores, estudios de sensibilidad y aplican técnicas de diagnóstico

- rápido (contrainmunolectroforesis). En este año, el serogrupo C, deja de constituir un problema para Cuba.
- 1982: Visitan a Cuba especialistas de países vinculados a brotes y epidemias de EM; comienza la producción de antisueros con cepas autóctonas. Continúan trabajos de sensibilidad con diferentes antimicrobianos recomendados en la quimioprofilaxis. La tasa de incidencia aumenta al 12,5/100 000 habitantes con un mayor número de casos en: Ciego de Ávila, Villa Clara y Sancti Spiritus. Se crea un grupo de investigación encargado de obtener una vacuna efectiva contra *N. meningitidis* B.
  - 1983: El EM continúa su tendencia ascendente (14,3/100 000 habitantes) y se registra el pico máximo de la epidemia, pero en los menores de 1 año, sobrepasa la cifra de 120/100 000 habitantes. Las provincias más afectadas son: Ciego de Ávila, Isla de la Juventud, Villa Clara. En la Isla de la Juventud, ocurre un brote de EM en becarios extranjeros de Ghana. Realizan estudio de portadores y en el 86,2% de los estudiantes ghaneses se aísla *N. meningitidis* C. Visitan médicos cubanos varios países nórdicos y España, existe un intenso intercambio con especialistas de otros países y se realiza el montaje y aplicación del método de caracterización por SDS-PAGE.
  - 1984: Se efectúa I Simposio Nacional de Enfermedad Meningocócica. Realizan la Encuesta Nacional de Portadores y un estudio especial de portadores entre contactos efectivos de casos con EM en Ciudad de La Habana. Crean el nuevo Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo. Este es el único año desde 1975, que no se produce un incremento en la tasa de incidencia (14,0/100 000 habitantes). Sin embargo, aumentan los casos en las provincias occidentales y orientales.
  - 1985: Se realizan estudios de inmunogenicidad y reactividad de la vacuna en animales y los primeros ensayos en humanos. Se desarrolla el II Taller Nacional de Enfermedad Meningocócica. Se realizan estudios de portadores en focos antiguos de EM y se realiza el folleto de "Actualización de Técnicas de Diagnóstico Bacteriológico e Inmunológico de las Meningitis". Este material se envía a todos los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología del país.
  - 1986-1987: Se realiza Protocolo de estudios de campo con VA-MENGOC-BC®.
  - 1987-1988: Se ejecuta ensayo de Fase III, estudio experimental, aleatorio, a doble ciego, con placebo y vacuna en niños de 10-16 años de escuelas internas y se demuestra una eficacia del 83%.

- 1989: Cumplimentados satisfactoriamente las fases de los estudios preclínicos y clínicos de la vacuna, se le otorga a VA-MENGOC-BC<sup>®</sup>, el Registro Médico Sanitario por la Autoridad Nacional Regulatoria.
- 1989-1990: Se realiza en Cuba una campaña de inmunización masiva con VA-MENGOC-BC<sup>®</sup> en la población de 3 meses-24 años de edad y se alcanza una cobertura del 95%. A partir de esa etapa, se refleja una caída sostenida de la tasa de incidencia de la EM.
- 1991: Se incorpora VA-MENCOC-BC<sup>®</sup> al Programa Nacional de Inmunización del MINSAP con un esquema de dos dosis. Se crea el Instituto Finlay en la Ciudad de La Habana.

## Anexo 3. Reactivos, medios de cultivo y equipos utilizados en el trabajo

**a) Reactivos y medios de cultivo**

- $\gamma$ -Glutamil-aminopeptidasa (Enzyline  $\gamma$ -GT 20S, *bioMérieux*)
- Ácido Acético (Merck)
- Ácido Clorhídrico (Merck)
- Ácido Tioglicólico (Sigma)
- Agar Cerebro Corazón (Merck)
- Agar Dextrosa Almidón (Difco)
- Agar DNasa (Merck)
- Agar Mueller Hinton (Merck)
- Agar Noble (Difco)
- Agar Tributirina Base (Merck)
- Almidón (Connaught)
- Almidón Soluble (Merck)
- Anti-IgG fosfatasa alcalina de ratón (Sigma)
- Antisueros de *N. meningitidis* serogrupos: A, B, C, X, Y, Z, W<sub>135</sub> (Difco)
- Azúcares (Glucosa, Maltosa, Lactosa, Sacarosa) (Merck)
- Azul de Bromotimol (BDH)
- Bicarbonato de sodio (BDH)
- Caldo Mueller Hinton (Merck)
- Carbón (Sigma)
- Cistina Tripticasa Agar (Merck)
- Clorhidrato de L-Cisteína (Merck)
- Cloruro de Calcio (Merck)
- Cloruro de Magnesio (Merck)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Colorantes para tinción de Gram (Centro de Producción de Biológicos, Instituto Finlay)
- Dietanolamina (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Enzimas (Sigma): Enzima Máfica (ME); Glucosa 6-fosfato (GGP); Peptidasas (PEP); Isocitrato; Deshidrogenasa-NAD (GD1); Glutamato Deshidrogenasa-NADP (GD2); Alcohol Deshidrogenasa (ADH); Fumarasa (FUM); Fosfatasa alcalina (ALK); Indofenol Oxidasa 1 (IP1); Indofenol oxidasa 2 (IP2); Adenilato Kinasa (ADK); Deshidrogenasa (IDH); Aconitasa (ACO); Glutamato Deshidrogenasa desconocida (UDH).

- Extracto de Levadura (Oxoid)
- Fosfato Disódico (Merck)
- Fosfato Monopotásico (Merck)
- Gelatina (Merck)
- Glucosa (Merck)
- Hidrocarburo de Tetrametil-Parafenilendiamina (Oxidasas) (BHD)
- Hidróxido de Sodio (Merck)
- L-Cistina (Merck)
- Leche Desnatada, en polvo (Merck)
- L-Glutamina (Merck)
- Medio TC (Instituto Finlay)
- Metanol (Merck)
- Mezcla inhibidora VCN (*bioMérieux*)
- Monoclonal Kit. Serosubtyping Meningococci, National Institute for Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, Holanda (RIVM).
- MOPS (3-{N-Morpholino}propane-sulfonic acid) (Sigma)
- NADP (Sigma)
- Nitrato Férrico (Merck)
- Ortonitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG) (*bioMérieux*)
- Penicilina (Merck)
- Peptona Bacteriológica (Oxoid)
- Peróxido de Hidrógeno (Merck)
- p-nitrofenilfosfato (Sigma)
- Rojo Amaranto (Sigma)
- Suero bovino (Hyclone)
- Suplemento N (Instituto Finlay)
- Tributirato de Glicerina (Merck)
- Tris (Sigma)
- Tween 20 (Merck)

**b) Equipos**

- Agitador Magnético con calor (Ikamag® RH)
- Baño de María termostático (Gallenkamp)
- Congelador de -70 °C (Sanyo).
- Espectrofotómetro (Pharmacia)

- Fuente Electroforesis (Poly-Labo)
- Gabinete de Seguridad (Gelaire, Flow Laboratories, BSB 4<sup>a</sup>)
- Incubadora con atmósfera de CO<sub>2</sub> (Incubadora Assab, Kebo Biomed, Suecia)
- Lavador automático (Denley)
- Lector de micro ELISA (Anthos Labtec)
- Medidor de pH (Retomed)
- Lavador automático (Denley)
- Lector de micro ELISA (Anthos Labtec)
- Medidor de pH (Retomed)
- Micropipetas fijas y graduables (Gilson)
- Microscopio Binocular (Leyca)
- Microscopio estereoscópico (Olympus)
- Placas de poliestireno (Costar)
- Replicador Steer (Microtiter)
- Zaranda orbital (Infors AG)

## Anexo 4. Suplemento enriquecedor Nm (Sotolongo, 1995)

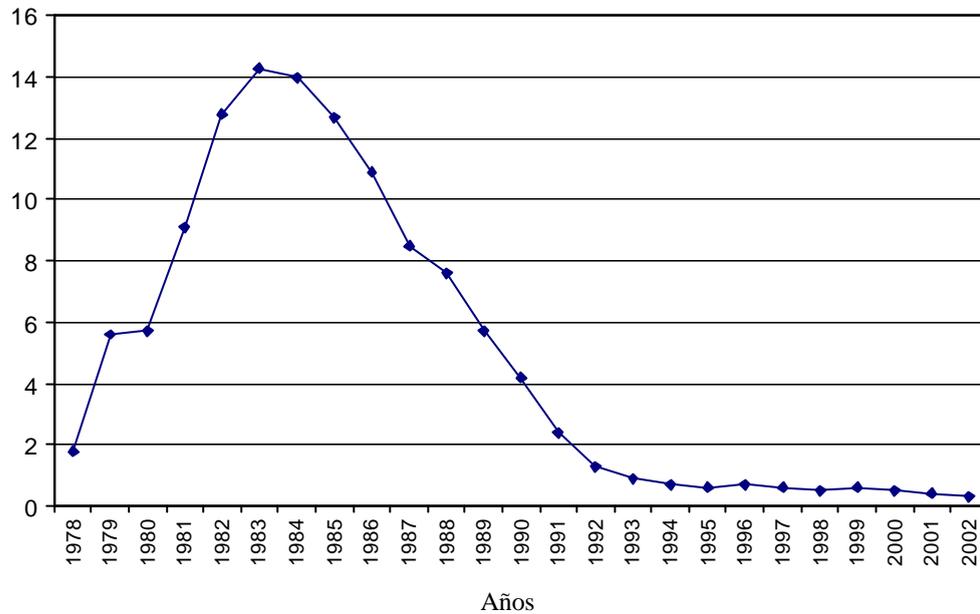
Nitrato Férrico	0,01 g
L-Glutamina	5,00 g
L-Cistina	1,10 g
Clorhidrato de L-Cisteína	0,10 g
Extracto de Levadura	1,00 g
Glucosa	1,30 g
Cloruro de Sodio	20,00 g
Fosfato Disódico	20,00 g
Fosfato monopotásico	4,00 g
Peptona Bacteriológica	10,00 g
Lab-Lemco	10,00 g
Agua destilada	800 mL
Suero bovino o de caballo	200 mL

## Preparación del Suplemento Nm

- Disolver, mediante calentamiento, el Extracto de Levadura en 200 mL de agua destilada, posteriormente, añadir el resto de los componentes, excepto el suero.
- Para esterilizar el Suplemento Nm puede hacerse lo siguiente:
  - a) Esterilizar por autoclave (121<sup>0</sup>C, 15 minutos), la solución sin el suero. Dejar enfriar a la temperatura ambiente y posteriormente mezclar con el suero en condiciones estériles. Al final, distribuir en frascos estériles a razón de 75 ml por frasco.
  - b) Filtrar la solución sin el suero, por un filtro de membrana de 0,22µm. Mezclar con el suero en condiciones de esterilidad y posteriormente, distribuir 75 mL en frascos estériles.
  - c) Mezclar la solución y el suero. Filtrar por filtro de membrana de 0,2 M, distribuyendo el suplemento en cantidad de 75 mL por cada frasco previamente estéril.
- Cuando se va a realizar la distribución del medio de cultivo a placas Petri, añadir el suplemento Nm a la base del medio a utilizar, a una concentración del 25 %.

## Anexo 5. Incidencia de enfermedad meningocócica en Cuba (1976-2003)

Tasa/100 000 habitantes

Fuente: <http://www.sld.cu/anuario/indice.html>.

## Anexo 6. Niveles de significación asociados a la Figura 2

	ADA	ACH	CTA
TC	0.00357	0.00012	0.00001
ADA	-	0.01834	0.00001
ACH	-	-	0.00087

## Anexo 7. Niveles de significación asociados a la Figura 3.

	ADA	ACH	CTA
TC	0.28968	0.00084	0.00000
ADA	-	0.01054	0.00004
ACH	-	-	0.12315