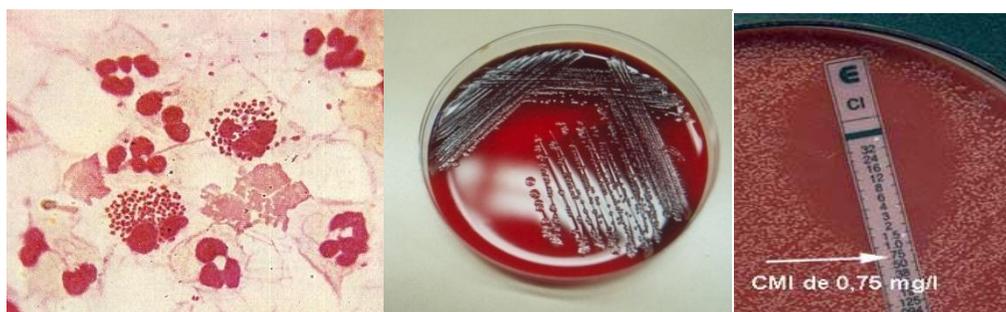


INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"



LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE NEISSERIAS PATÓGENAS

Vigilancia microbiológica de *Neisseria meningitidis*. Fenotipos
y susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos causantes
de enfermedad invasiva, Cuba 2002-2011



Tesis en opción al título de Máster en Bacteriología-Micología

Autora: Dra. Nirtza Esther Suárez Navarro

La Habana

2013

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"



LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA DE NEISSERIAS PATÓGENAS

Vigilancia microbiológica de *Neisseria meningitidis*. Fenotipos
y susceptibilidad antimicrobiana de cepas causantes de
enfermedad invasiva, Cuba 2002-2011



Tesis en opción al título de Máster en Bacteriología-Micología

Autora: Dra. Nirtza Esther Suárez Navarro

Tutores: Dra. Isabel Martínez Motas, Dr C

Dr. Rafael Llanes Caballero, MsC

Asesora: Lic. Onelkis Feliciano Sarmiento, MsC

La Habana

2013

A la plenitud de Aquel que todo lo llena en todo

A mi madre mujer virtuosa

A mi esposo y a mi hijo

*Y todo lo que hagáis, hacedlo de corazón,
para el Señor y no para los hombres.*

Col 3:23

RESUMEN

Neisseria meningitidis es uno de los principales agentes causales de meningitis bacteriana y sepsis. La identificación de los marcadores epidemiológicos y la susceptibilidad antimicrobiana de las cepas circulantes constituyen una actividad fundamental para la vigilancia de la enfermedad meningocócica. Se realizó un estudio transversal descriptivo para la caracterización de aislamientos remitidos al Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas del IPK, durante 10 años (2002-2011). Se estudiaron 69 aislamientos de meningococo, la identificación de especie y seroagrupación se realizó por métodos convencionales; cuando esta última fue dudosa, se determinó por PCR. La caracterización fenotípica se realizó por ELISA de células enteras con anticuerpos monoclonales y la susceptibilidad antimicrobiana se determinó por E-test. Predominó el serogrupo B (98,6%); un solo aislamiento fue C (1,4%); entre los serotipos prevalecieron el 4 (55,1%), las cepas NT (15,9%) y el 2a (8,7%). Mientras que, los subtipos más frecuentes fueron el P1.15 (42,0%), P1.19 (20,3%) y cepas no subtipables (NST, 10,1%); otros sero/subtipos mostraron porcentajes inferiores. En el serogrupo B predominó el fenotipo B: 4:P1.15 (26,1%), y por primera vez se detectó en Cuba al fenotipo C: 2a:P1.5. Predominaron las cepas sensibles: ceftriaxona (100,0%), rifampicina (98,2%), cloranfenicol (92,8%), ciprofloxacina (89,3%), penicilina (87,5%), excepto para el cotrimoxazol, donde 92,8% de los aislamientos fueron resistentes; se detectó también resistencia a ciprofloxacina (10,7%), penicilina (8,9%) y cloranfenicol (5,3%), y hubo cepas con porcentajes bajos de susceptibilidad intermedia para penicilina, cloranfenicol y rifampicina. Los resultados obtenidos aportan datos imprescindibles para una mejor interpretación epidemiológica y control de la enfermedad meningocócica.

ABREVIATURAS

AcM: Anticuerpos monoclonales

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMH: Agar Mueller Hinton

BHE: Barrera hematoencefálica

CID: Coagulación intravascular diseminada.

Cl₂Mg: Cloruro de magnesio

CINa: Cloruro de sodio

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CMI₅₀: Concentración mínima inhibitoria que inhibe el 50% de las cepas

CMI₉₀: Concentración mínima inhibitoria que inhibe el 90% de las cepas

CPHEM: Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología

CTA: Cistina tripticasa agar

ECP: Electroforesis en campo pulsado

EDO: Enfermedad de Declaración Obligatoria

EDTA: Acido etilen diamino tetra acético

EEM: Electroforesis de Enzimas Multilocus

ELISA: Ensayo inmunoenzimático

EM: Enfermedad meningocócica

IPK: Instituto Pedro Kourí

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LNRNP: Laboratorio Nacional Referencia de Neisserias Patógenas

LOS: Lipooligosacárido

LPN: Leucocito polimorfonuclear

LPS: Lipopolisacárido

MB: Meningitis bacteriana

MINSAP: Ministerio de Salud Pública

MOP: Manual de Operaciones y Procedimientos

MSLT: *Multilocus sequence typing*

NA: No agrupable

NIBSC: Instituto Nacional para el control Biológico y Estándares del Reino Unido

NST: No subtipable

NT: No tipable

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: Proteínas fijadoras de penicilina (del inglés: *Penicillin Binding Protein*)

PC: Polisacárido capsular

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)

PME: Proteínas de membrana externa

PNI: Programa Nacional de Inmunización

RIA: Radio inmunoensayo

RV: Región variable

RV1: Región variable 1 de la proteína PorA de *N. meningitidis*

RV2: Región variable 2 de la proteína PorA de *N. meningitidis*

S: Sensible

SDS: Sodio dodecil sulfato

SI: Sensibilidad intermedia

SIREVA: Sistema Regional de Vigilancia en las Américas

TNF α : Factor de necrosis tumoral

TBE: Tris-borato

TRS: Tracto respiratorio superior

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV: Ultravioleta

VCN: Vancomicina, colistina, nistatina

VME: Vesículas de membrana externa

VNMB: Vigilancia Nacional de Meningitis Bacteriana

ÍNDICE	Pàg.
I. INTRODUCCIÓN	2
II. MARCO TEÒRICO	9
III.MATERIALES Y METODOS	33
IV.RESULTADOS	46
V.DISCUSIÒN	53
VI.CONCLUSIONES	74
VII.RECOMENDACIONES	76
VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÀFICAS	78
ANEXOS	

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Neisseria meningitidis constituye hace más de 200 años uno de los principales agentes causales de meningitis bacteriana y sepsis en el mundo, se distingue de los otros agentes por su potencial epidémico. Este microorganismo es un patógeno exclusivo del hombre, coloniza la nasofaringe humana y puede formar parte de la microbiota normal sin producir síntomas ni signos clínicos evidentes de infección (Almeida *et al* 2004; Chiavetta *et al.*, 2007). Se calculan alrededor de 500 millones de portadores asintomáticos en el mundo, los que representan un elemento crucial en la diseminación de la enfermedad meningocócica (EM). Durante etapas endémicas, las cifras de portadores oscilan entre 5-35%; estas suelen incrementarse por encima de 50%, a partir de la cual pueden surgir brotes o epidemias (Hannah *et al.*, 2010; Ochoa *et al.*, 2010).

Durante el siglo XX la EM muestra una distribución global y causa endemias, epidemias y pandemias. Al inicio del siglo XXI, la incidencia anual es de 500 000 casos, entre los cuales 300 000 se notifican en el África subsahariana, número que asciende durante los brotes y las epidemias (Frosch y Maiden, 2006; WHO, 2009). El término EM engloba a un conjunto de manifestaciones clínicas (sobre todo, meningitis y sepsis); entre 5-20% de los pacientes presentan sepsis meningocócica, con fiebre y exantema purpúrico, 50% muestran afectación meníngea, aunque otras localizaciones (neumonía, artritis, uretritis, pericarditis, conjuntivitis, otitis media y epiglotitis) muestran bajos porcentajes (Rosenstein *et al.*, 2003; Ochoa *et al.*, 2010).

La EM afecta principalmente a los niños pequeños (6 meses a 4 años de edad), aunque es también frecuente en los adolescentes y adultos jóvenes. No obstante, puede presentarse a cualquier edad (Kugelberg *et al.*, 2010; Ibarz-Pavón *et al.*, 2011). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la ubica entre las 10 principales enfermedades del ser humano; se estima que ocurren alrededor de 1 200 000 casos invasivos y 135 000 muertes, con una mortalidad global de 10% (WHO, 2009). En América Latina se notifican alrededor de 5 000 casos anuales,

de los cuales, 14% termina en muertes prematuras (Gabastou *et al.*, 2008; Sáfadi y Cintra, 2010).

Se describen factores de riesgo que favorecen el desarrollo de la EM. Entre ellos: la edad, las infecciones virales, las deficiencias de algunos factores del complemento, así como otras alteraciones del sistema inmune. También el hacinamiento y el humo del tabaco, contribuyen a la diseminación de *N. meningitidis*. Por sus características epidemiológicas, la gravedad de sus manifestaciones clínicas y la alarma social que origina en la comunidad, la notificación de casos requiere de una vigilancia constante por parte del personal de salud pública, sobre todo en el momento actual, pues la introducción de vacunas puede modificar la dinámica de esta enfermedad (Stephens *et al.*, 2009).

La caracterización fenotípica sobre la base de sus marcadores epidemiológicos (serogrupo, serotipo, subtipo e inmutotipo) constituye un objetivo fundamental en las investigaciones dirigidas al estudio de las cepas de *N. meningitidis* circulantes (Vázquez, 2006). La identificación del polisacárido capsular (PC) permite la clasificación en serogrupos, además, el estudio de las proteínas de la membrana externa (PME) y las diferencias estructurales de sus lipooligosacáridos (LOS), determinan los serotipos, subtipos e inmutotipos, respectivamente (Frasch *et al.*, 1985). Las diferencias antigénicas del PC clasifica a *N. meningitidis* en 13 serogrupos (A, B, C, H, I, K, L, M, X, Y, Z, 29E y W-135), aunque cinco (A, B, C, Y y W-135), causan cerca de 90% de los casos invasivos.

El serogrupo B se caracteriza por su virulencia, capacidad para provocar epidemias con una alta morbimortalidad y en algunas regiones desplaza a los serogrupos A y C (Rosenstein *et al.*, 2003; Flores, 2009). Es también el principal responsable de EM endémica en países desarrollados, representando hasta 90% de los casos esporádicos en varios países europeos, y cerca de 50% en Estados Unidos (Racloz y Silva, 2010). Las epidemias por el serogrupo B se producen de manera más lenta, se asocian a bajas proporciones de enfermedad, a la emergencia de cepas hipervirulentas y pueden durar más de 10 años. En algunos

países se identifica en más de 60% de los casos notificados; aunque los serogrupos A y C son también importantes agentes causales de epidemias (Harrison *et al.*, 2009; Caugant y Maiden, 2009; Ibarz-Pavón *et al.*, 2011). Sin embargo, algunas regiones señalan un aumento de los serogrupos W-135 y Y (Weidlich *et al.*, 2008; Agudelo *et al.* 2008; Rentero y Romero, 2011).

A pesar de las dificultades que presenta la caracterización fenotípica por la variabilidad antigénica de *N. meningitidis* y la incapacidad para suptipar todos los aislamientos, esta metodología es aún fundamental en la vigilancia microbiológica (Bae y Kang, 2008).

La epidemiología molecular aporta métodos valiosos para el estudio de los brotes y epidemias, detecta las diferencias genéticas existentes entre las cepas de *N. meningitidis* e incrementa la información que ofrecen los métodos fenotípicos (Vázquez y Berrón, 2004). Entre los métodos moleculares, los estudios de polimorfismo enzimático brindan 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 (Brehony *et al.* 2007; Caugant, 2008) No obstante, a finales de la década del 90, basado en la secuenciación de genes estructurales y virulentos, un nuevo esquema de identificación bacteriana reconocido con las siglas MLST del inglés “*multilocus sequence typing*”, establece las relaciones genéticas entre las cepas e identifica los miembros de linajes hipervirulentos. Además, permite trabajar con un material no infeccioso distribuido por correo y comparar los resultados obtenidos en diferentes laboratorios del mundo (Brehony *et al.* 2007; Climent *et al.*, 2010; Ochoa *et al.*, 2010).

En esta era, donde la emergencia de la resistencia a los antimicrobianos representa un problema para la Infectología, *N. meningitidis* no muestra altos índices de resistencia a los fármacos utilizados en el tratamiento y la profilaxis de la EM. A partir del fallo clínico a la sulfadiacina descrito en 1963 (Millar *et al.*, 1963), la notificación de cepas resistentes a este fármaco aumenta, las que se

vinculan a brotes y epidemias (Oppenheim, 1997). Además, desde 1985, emergen cepas con sensibilidad intermedia (SI) a la penicilina, uno de los fármacos de elección para el tratamiento de la EM (Muhamed *et al* 2006; Brown *et al.*, 2010; Bertrand *et al.*, 2012; Ibarz-Pavón *et al.*, 2012). Se describen también cepas resistentes a la tetraciclina, la rifampicina y al cloranfenicol (Galimand *et al.*, 1998; Shultz *et al.*, 2005; Saguer *et al.*, 2006). Recientemente, se señalan cepas con SI y resistencia a la ciprofloxacina (Alcalá *et al.*, 2004; Corso *et al.*, 2005; Singhal *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). El comportamiento de *N. meningitidis* frente a los antimicrobianos utilizados para la profilaxis y el tratamiento de la EM obliga al estudio sistemático de la susceptibilidad de este microorganismo, con el fin de establecer *in vivo* la correcta selección de los mismos.

En mayo de 1976 comienza una epidemia de EM en Cuba ocasionada por *N. meningitidis* serogrupo C. En 1979, la incidencia es de 5,6/100 000 hab, pero tras una vacunación masiva con la vacuna francesa A-C, la incidencia asciende a expensas del serogrupo B. El pico de la epidemia ocurre en 1983, con una tasa de 14,4/100 000 hab (Valcárcel *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2010). El desarrollo de la epidemia representa el principal problema de salud durante la década de los años 80 y conduce a la obtención de una vacuna eficaz para su prevención y control. Además, se inician las investigaciones microbiológicas necesarias para la selección de la cepa (CU385/83) representativa de la epidemia cubana; tras su identificación, se desarrolla la vacuna VA-MENGOC-BC[®] y en 1988, el Ministerio de Salud Pública (Minsap), realiza una campaña de inmunización en siete provincias del país. Luego, VA-MENGOC-BC[®] se incluye en el Programa Nacional de Inmunización (PNI), medida que logra una disminución paulatina y creciente de la incidencia de la EM a menos de 1/100 000 hab desde 1993 hasta la fecha, por lo que, en estos momentos, esta enfermedad no constituye un problema de salud en Cuba (Valcárcel *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2010).

La vigilancia microbiológica de *N. meningitidis* permitirá identificar la emergencia de cepas surgidas por el intercambio genético capsular (Caugant, 2008; Climent *et*

al., 2010). El control de la EM es de alta prioridad debido a sus elevadas tasas de mortalidad, su naturaleza epidémica y por las graves secuelas que persisten en los casos que sobreviven. Estas características, conllevan a que Cuba, al igual que otros países, desarrolle una rigurosa vigilancia epidemiológica como una de las bases fundamentales para su control, con una fuerte orientación hacia el desarrollo de las estrategias de prevención (Pérez *et al.*, 2010).

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. Por la problemática descrita con anterioridad, esta investigación se propone analizar la vigilancia microbiológica de las cepas de *N. meningitidis* recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas (LNRNP) del Instituto “Pedro Kourí” (IPK) durante un período de 10 años (2002-2011).

Tomando en consideración los aspectos analizados se proponen los siguientes objetivos:

I.1 OBJETIVOS

General

- Contribuir a la vigilancia microbiológica de la enfermedad meningocócica mediante la identificación de los marcadores epidemiológicos y el comportamiento de la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *N. meningitidis* en el período 2002-2011.

Específicos

- Identificar los fenotipos de los aislamientos de *N. meningitidis* objeto de estudio.
- Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *N. meningitidis* frente a los fármacos recomendados para el tratamiento y profilaxis de la enfermedad meningocócica.

MARCO TEÓRICO

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Generalidades

La historia de la EM refleja el desarrollo científico y tecnológico de la misma a través del tiempo. Cada avance, desde la observación microscópica temprana de *N. meningitidis*, hasta el cultivo y las diferentes técnicas utilizadas para su clasificación, así como los modelos matemáticos, la genética y la microbiología molecular aplicadas, junto con la proteómica, permiten una mejor comprensión y entendimiento para el control de esta afección (Cartwright, 2006).

II.2 Breve reseña histórica de la enfermedad meningocócica

Durante el siglo XIX las comunicaciones sobre la EM son limitadas, no existían la microbiología ni la epidemiología. La primera descripción de la “*meningitis cerebroespinal epidémica*”, la realiza Viesseux, en 1805, al observar un brote de EM en Ginebra, Suiza. Al año siguiente, esta afección emerge en Massachusetts (Estados Unidos) y luego, ataca al ejército prusiano en Europa. Desde entonces, la EM invade nuevos países y se extiende a todos los continentes, a veces en proporciones epidémicas, seguida de períodos de latencia, pero siempre reaparece en forma de brotes con una mayor o menor intensidad. A lo largo del tiempo, sufre un incremento paulatino en su distribución geográfica y el número de casos notificados. Según algunos autores, durante el siglo XIX se establecen diferentes períodos de prevalencia: 1805-1830 (prevalece en Norteamérica); 1837-1850 (prevalece en Francia y los países nórdicos); 1854-1874 (se extiende a Europa y América) y a partir de 1875, se propaga a los demás continentes. La mayoría de los brotes ocurre entre poblaciones militares y por corresponder este período a la era pre-antibiótica, la mortalidad es muy elevada (70%) (Cartwright, 2006).

El primer aislamiento de *N. meningitidis* lo obtiene Weichselbaum, en 1887, a partir de seis casos mortales de EM ocurridos en Viena. Unos años después (1893), Quinke practica la primera punción lumbar y en 1896, Kiefer lo aísla e

identifica por primera vez a partir del hisopado faríngeo, lo que permite avanzar en el entendimiento de su mecanismo de transmisión. Entre 1900-1920, investigadores alemanes y americanos obtienen el primer suero antimeningocócico, considerado como el más importante avance del período, demostrándose que tras su aplicación a los animales se logra protección contra *N. meningitidis*, lo que permite luego su administración a los humanos por vía intratecal. En esa etapa se desarrollan brotes de EM entre las tropas militares, sobre todo en los reclutas de nuevo ingreso a la I Guerra Mundial. Esta situación obliga a tomar medidas preventivas para reducir el estado de portador (Cartwright, 2006).

La etapa comprendida entre 1921-1939 se caracteriza por brotes de EM ocasionadas por el serogrupo A, con epidemias severas en el África subsahariana. En 1935, se demuestra la composición polisacáridica de su cápsula y dos años después (1937), describen a la sulfonamida como el primer fármaco terapéutico específico para la EM, convirtiéndose en el medicamento de elección durante la II Guerra Mundial. Posteriormente, en 1940, se utiliza como quimioproláctico para eliminar el estado de portador. Desde esa etapa se documentan epidemias masivas en África y en 1963, *Lapeysonnie* describe al “cinturón de la meningitis”; y Millar *et al.*, 1963, publican la emergencia de cepas resistentes a la sulfonamida (Cartwright, 2006).

II.3 Taxonomía y consideraciones microbiológicas de *N. meningitidis*

Neisseria meningitidis pertenece al Reino Procarionte; División I: Protophyta; Sección IV: Bastones y cocos gramnegativos aerobios/microaerófilos; Familia VIII: Neisseriaceae; Género I: *Neisseria*; Especie tipo: *Neisseria gonorrhoeae* (Rouphael y Stephens, 2012).

La familia Neisseriaceae se describe por *Neisser*, un bacteriólogo alemán que descubre a *Neisseria gonorrhoeae* en 1879. Esta familia abarca cuatro géneros (*Neisseria*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Kingella*) y las especies que los integran se

diferencian entre sí por su morfología, las reacciones de oxidasa, catalasa, la presencia de anhidrasa carbónica, así como la producción de ácido a partir de la glucosa, su habilidad para reducir el nitrito, la presencia de timidina fosforilasa, deoxirribosil nucleósido transferasa y timidina quinasa (Ochoa *et al.*, 2010; Roupael y Stephens, 2012).

El género *Neisseria* abarca más de 20 especies, algunas se aíslan en el hombre y otras de los animales. Entre las identificadas en los humanos, *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* son las únicas patógenas; las otras (*N. polysaccharea*, *N. lactamica*, *N. subflava*, *N. flavescens*, *N. mucosa*, *N. cinerea*, *N. elongata*, *N. sicca*, y *N. wearieri*), integran la microbiota normal, aunque, en ocasiones se comportan como oportunistas (Ryan y Ray ,2004; Ochoa *et al.*, 2010).

Neisseria meningitidis tiene forma esférica (coco), se presenta aislada o en parejas (diplococos), con los lados adyacentes planos y la apariencia de riñón o grano de café. Es una bacteria gramnegativa, aunque en ocasiones resiste la decoloración. La observación microscópica directa a partir de las muestras clínicas muestra su localización dentro o fuera de los leucocitos polimorfonucleares (LPN). En dependencia de la fuente de aislamiento y la edad del cultivo, presentan diámetros entre 0,6 a 1,5 μm ; poseen cápsula y pili, son no esporulados e inmóviles (Manchanda *et.*, al 2006). Se cultiva en medios enriquecidos, requiere de una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 , una temperatura entre 35-37 $^{\circ}\text{C}$ y un pH entre 7,2-7,4. Es sensible a la desecación, a los antisépticos y los desinfectantes, así como a los cambios de temperatura. Su crecimiento puede inhibirse por la acción de los ácidos grasos o las sales presentes en los medios de cultivo, comportamiento que suele contrarrestarse mediante la adición de suero, albúmina o carbón, capaces de adsorber los productos tóxicos liberados al medio. Este microorganismo es un patógeno exclusivo del hombre; su identificación y diferenciación de las otras especies del género *Neisseria* se hace por pruebas bioquímicas y enzimáticas (Roupael y Stephens, 2012). Degrada la glucosa y la

maltosa, con la producción de ácido, pero no de gas. No degrada otros azúcares (sacarosa, fructosa, lactosa ni manitol), aunque se describen aislamientos con un comportamiento diferente, denominados “cepas deficientes”, las que causan cuadros clínicos diversos. Entre las pruebas claves para su identificación se destacan: la producción de oxidasa y catalasa, la actividad γ -Glutamil-aminopeptidasa positiva y el no poseer β -Galactosidasa, lipasas ni DNasa (Ochoa *et al.*, 2010).

II.4 Estructura antigénica

Como todas las bacterias gramnegativas, posee una pared celular que recubre su membrana citoplasmática (Sperandeo *et al.*, 2009). La pared está compuesta por una capa rígida de peptidoglicano y una membrana externa. Insertas en esa membrana aparecen proteínas con capacidad antigénica (Buckee *et al.*, 2011). Las de clase 2/3 (Por B) definen a los 20 serotipos conocidos, son mutuamente excluyentes y se expresan por números arábigos.

Las proteínas de clase 1 (PorA) distinguen 11 subtipos, se identifican también con números, pero precedidos del prefijo P1 (Harrison *et al.*, 2010; Ochoa *et al.*, 2010). En la pared celular se localiza el lipopolisacárido (LPS), otra de las estructuras antigénicas, que permite clasificar a 13 determinantes de inmunitipos diferentes. Estos se identifican con números del 1 al 13, pero precedidos de la letra L (Ochoa *et al.*, 2010; Brandtzaeg y van Deuren, 2012).

Rodeando la membrana externa aparecen polisacáridos acídicos que a veces constituyen una verdadera cápsula. Los meningococos poseen, además, proyecciones filamentosas o pili de naturaleza proteica que median la adherencia a las células epiteliales de la mucosa y a las células endoteliales del sistema nervioso central y que son también responsables de la capacidad antigénica del microorganismo. Basándose en las estructuras antigénicas de *N. meningitidis* se desarrolla una amplia clasificación fenotípica (Poolman *et al.*, 1995; Vogel *et al.*, 2001).

II.4.1 Polisacárido capsular

Es un poliósido. Desde el punto de vista químico y serológico, permite la diferenciación de *N. meningitidis* en 13 serogrupos (A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K y L) mediante técnicas de aglutinación en lámina con antisueros específicos de grupo. Los serogrupos A, B y C son los responsables de la mayor parte de los casos notificados, aunque los serogrupos Y y W-135 también causan procesos invasivos (Harrison *et al.*, 2010).

El antígeno capsular del serogrupo A es un N-acetil-O-acetil manosamina fosfato. El polisacárido B es un 2-alfa-ligado ácido N-acetil neuramínico, idéntico inmunológicamente al PC de *Escherichia coli* K1. Mientras que, el polisacárido C es un 2-9-alfa-ligado-acetil, ácido O-acetil neuramínico (Jolley *et al.*, 2006). La identificación y purificación de los PC de los grupos A, C, W-135 y Y, se utilizan para la producción de vacunas e inducen la formación de anticuerpos específicos (Vázquez, 2002; Borrow y Miller, 2006); mientras que, la cápsula del serogrupo B es poco inmunogénica debido a su similitud con componentes estructurales presentes en las membranas externas de las células neuronales del hospedero (Ochoa *et al.*, 2010).

II.4.2 Proteínas de la membrana externa

Neisseria meningitidis posee seis clases de proteínas mayoritarias de membrana externa. Las de clase 2/3 definen al serotipo y las de clase 1 al subtipo, que según algunos estudios, pueden cambiar en una cepa a lo largo del tiempo. Estas tres proteínas son estructurales y actúan como porinas, transportando moléculas fuera y dentro de la célula bacteriana (Frasch *et al.*, 1985).

Las proteínas de clase 4, muy conservadas, están presentes en todas las cepas. Las de clase 5 son heterogéneas e intervienen en la adherencia. La de clase 6 es termomodificable y está presente en algunos meningococos del serogrupo A, pero no en los serogrupos B o C (Poolman *et al.*, 1995).

II.4.3 Lipopolisacárido

Los LPS de meningococo son similares desde el punto de vista estructural a los que expresan muchos bacilos gramnegativos, son termoestables y de potente actividad endotóxica, carecen de cadenas laterales de antígeno O y se les suele denominar lipooligosacáridos (Jones *et al.*, 2009). La fracción de lípido A de los LOS, llamada endotoxina (en oposición a las exotoxinas bacterianas) es la porción que gobierna la inducción de las citocinas inflamatorias frecuentes en la EM (Bos *et al.*, 2004). Tanto la morbilidad como la mortalidad de la bacteriemia meningocócica y la meningitis son directamente proporcionales a la cantidad de endotoxina meningocócica circulante. La variabilidad en su composición permite la clasificación serológica de 13 inmunotipos diferentes basados en la estructura antigénica del LOS (Pedersen *et al.*, 2008).

No existen suficientes estudios que refieran su distribución, pero se señala que los inmunotipos L8, L9, L10 y L11 se asocian al serogrupo A, de ellos, L10 y L11 son los más frecuentes. También se documenta que L1 al L9 se identifican en los serogrupos B y C (Zollinger y Mandrell, 1980).

II.4.4 Pili

Son filamentos de naturaleza proteica distribuidos por la superficie bacteriana y están relacionados con la capacidad de adherencia de *N. meningitidis*. Constituyen uno de los principales componentes que determinan el ataque a las células no ciliadas (Virji, 2009; Szeto *et al.*, 2011). Por tanto, le confieren una mayor virulencia, hasta tal punto de que, el pili junto a la cápsula, parecen ser los factores más importantes que median en la interacción con las células del endotelio y el epitelio (Nassif, 1999; Brown *et al.*, 2010).

II.4.5 Proteasas IgA1

Las cepas patógenas de *N. meningitidis* pueden producir estas enzimas, capaces de descomponer las IgA1 en diferentes puntos del segmento bisagra de la inmunoglobulina. Además, participan en la colonización de la mucosa, jugando un

papel importante en la supervivencia intracelular de *N. meningitidis*, ya que parecen estar relacionadas con la prevención de la fusión de los fagolisosomas en el interior de las células (Lin *et al.*, 1997).

II.5 Factores de virulencia

Las cepas invasoras de *N. meningitidis* se caracterizan por la expresión de su PC y otras estructuras de la membrana externa, tales como las endotoxinas (LOS). Algunos de los factores importantes para la virulencia son la formación de vesículas en la membrana externa, la autólisis del meningococo, la imitación molecular, la plasticidad del genoma, el intercambio horizontal de ADN y la variación antigénica o de fase (Lappann y Vogel, 2010; ; Livorsi *et al.*, 2011).

II.5.1 Otros mecanismos de virulencia

La expresión o estructura de los componentes de la membrana externa de *N. meningitidis* (vellosidades, LOS, proteínas Opa, Opc, cápsula) varían con gran frecuencia (10⁻² a 10⁻⁴/célula y generación). Estas variaciones son la consecuencia de cambios genéticos que estimulan o mitigan la expresión de un componente, regulan su cantidad o modifican su estructura (Bourdoulous y Nassif, 2006). Los eventos genéticos que originan variaciones de fase y estructura permiten el escape inmunitario y crean una gran variabilidad de las estructuras que son importantes en la patogenicidad (estimulación o disminución) de la expresión de los ligandos de fijación, la protección contra la aniquilación sérica y los factores que definen la invasión (Schielke *et al.*, 2010).

La cápsula del serogrupo B constituye un ejemplo de la manera como *N. meningitidis* modera la respuesta inmune del ser humano por medio de la expresión de antígenos similares a los del hospedero. La cápsula de ácido polisialico de serogrupo B es idéntica a las estructuras de la molécula N-CAM de adherencia de las células nerviosas humanas (Holst *et al.*, 2009).

Neisseria meningitidis se caracteriza, además por una frecuente formación de vesículas en la membrana externa. Estas vesículas contribuyen al comienzo inmediato de la secuencia inflamatoria y a la cascada de la coagulación. Quizás están también vinculadas a la autólisis natural de meningococo, que genera la liberación del ADN y facilita la transformación genética.

II.6 Patogenia

El hombre es el único hospedero natural para el cual *N. meningitidis* es patógena. Su hábitat natural y reservorio son las superficies mucosas del tracto respiratorio superior (Rusniok *et al.*, 2009). Este microorganismo puede permanecer en la nasofaringe, por períodos variables, sin provocar signos clínicos evidentes de infección (Brandtzaeg, 2006). En el caso del serogrupo B, la colonización persiste varios meses. *N. meningitidis* se transmite de persona a persona por vía aérea, aunque para que esta se produzca, deben cumplirse los requisitos de proximidad (menos de un metro de nariz a nariz) y continuidad (exposición por tiempos prolongados). Se describen factores de riesgo que predisponen a la EM y entre ellos se señalan: las alteraciones anatómicas del sistema inmune (asplenia) o alteraciones funcionales (deficiencia de la properdina y los componentes del complemento). Existe también el peligro de casos secundarios en núcleos familiares con un caso clínico. El riesgo de contraer EM entre los miembros de esa familia se eleva entre 400-800 veces, es mayor en la raza negra y en personas que viven bajo malas condiciones socioeconómicas. La exposición activa o pasiva al tabaco, así como las infecciones virales del TRS, aumentan también el riesgo de contraer EM (Caugant *et al.*, 2007; Ochoa *et al.*, 2010).

La puerta de entrada de *N. meningitidis* 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 una toxina soluble. Después de su adhesión, penetra en la mucosa por endocitosis y

una vez que pasa del extremo apical al basal de la célula epitelial, alcanza al torrente sanguíneo (Hill *et al.*, 2010; Trivedi *et al* 2011).

En el compartimiento vascular puede destruirse por la acción de los anticuerpos séricos, el complemento y las células fagocitarias o puede multiplicarse, iniciando la fase bacteriémica. A ese nivel, la defensa principal del hospedero es el sistema del complemento. La vía clásica requiere la presencia de anticuerpos específicos (bactericidas), estos activan la cascada del complemento y conducen a la lisis bacteriana. Cuando el hospedero carece de anticuerpos específicos, depende de la vía alternativa del complemento. La capacidad de evadir esta vía, facilita la permanencia de *N. meningitidis* en la circulación sanguínea (Rouphael y Stephens, 2012).

La liberación de LOS desempeña un papel central en la aparición de la EM, estos se liberan en la sangre durante la multiplicación y tras la autólisis de *N. meningitidis* se establece una correlación entre los niveles de LOS en el plasma y la gravedad de esta entidad. En los casos fulminantes, la presencia de LOS inicia y estimula los principales sistemas de cascada asociados a la inflamación y a la producción de citocinas. La respuesta inflamatoria produce una vasodilatación intensa, hay 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 (Pedersen *et al.*, 2008)

Para que ocurra meningitis, *N. meningitidis* debe atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) e inducir una respuesta inflamatoria en el espacio subaracnoideo. Por microscopía se demuestra 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. En el LCR, por su pobre contenido en opsoninas, *N. meningitidis* se multiplica, pero para que se produzca la inflamación de las meninges, se requiere de decenas de miles de bacterias por mm³. La permeabilidad de la BHE aumenta debido a los 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 los 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 multiórgano (van Deuren *et al.*, 2000; Stephens, 2009; Aspholm M *et al.*, 2010).

II.7 Síndromes clínicos

En dependencia de los órganos afectados, la infección por *N. meningitidis* ocasiona manifestaciones clínicas diversa, estas van desde una colonización asintomática de la nasofaringe hasta la meningococemia fulminante (síndrome de *Waterhouse Friderichsen*). La infección es asintomática, si *N. meningitidis* queda restringida en la nasofaringe (portadores sanos). Las formas clínicas más frecuentes son la meningococemia y la meningoencefalitis (Goldman y Ausiello ,2007).

II.7.1 Infección de las vías respiratorias superiores: Después de colonizar la nasofaringe, *N. meningitidis* puede permanecer en ella por períodos de tiempo variables. 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 (Vázquez, 2000; Fauci *et al.*, 2008).

II.7.2 Meningococemia: Entre 30-40% de los pacientes con EM muestran meningococemia, sin sintomatología meníngea. 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 (39-41⁰C), 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. Son indicadores de mal pronóstico: la erupción petequial diseminada, la hipotensión, la disminución o reducción de la circulación periférica y la ausencia de signos meníngeos. Se señalan casos de meningococemia asociados a un síndrome broncopulmonar 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 (Soult y Muñoz, 2005; Rentero y Romero, 2011).

II.7.3 Meningococemia fulminante: Denominada síndrome de *Waterhouse-Friderichsen*, difiere de la forma más leve de EM, por su evolución rápida y fulminante. Se presenta en 10-20% de los casos y se caracteriza por shock, coagulación intravascular diseminada (CID) y fallo multiórgano. Afecta a los lactantes y niños pequeños; 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 a la piel, las mucosas y los 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, 50% de los pacientes mueren por insuficiencia cardíaca, respiratoria o ambas (Soberg, 1998; Daley, 2003).

II.7.4 Meningococemia crónica: Es poco frecuente y se asocia a un déficit inmunitario. Se describe desde 1902, pero su evolución no está precisada; la mayoría de los casos evolucionan de forma favorable, puede ocurrir a cualquier

edad, pero afecta preferiblemente a las personas mayores de 16 años. 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. El LCR es con frecuencia negativo y la mayoría son producidos por el serogrupo B. El mecanismo inmunopatológico responsable no está dilucidado y se describen varias hipótesis. Algunos casos, presentan un déficit de la fase terminal del complemento (Farron *et al.*, 1996; Hansen *et al.*, 2003).

II.7.5 Meningitis meningocócica: Es la manifestación clínica más frecuente y la complicación más común de la meningococemia. Sucede en cerca de 50% de los casos y su cuadro clínico es similar a las otras meningitis bacterianas. 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. En pacientes de edad avanzada, comienza sin signos clínicos específicos. Durante la meningitis ocurren convulsiones, parálisis de los pares craneales, hemiparesia, u otros signos neurológicos focales. En alrededor de 11-19% de los enfermos pueden quedar secuelas; Barreiro *et al.*, 2002; Daley, 2003).

II.7.6 Otras manifestaciones: Cerca de 10% de los pacientes con EM tienen artritis, la que se refleja, en los primeros días de la enfermedad, por una invasión directa de la articulación por *N. meningitidis*. La artritis de inicio tardío se atribuye a depósitos de inmunocomplejos (Vienne *et al.*, 2003). La neumonía meningocócica se detecta en casos aislados, considerándose al serogrupo Y como responsable de hasta 44,2% de los casos descritos. Se presenta como una neumonía adquirida en la comunidad, cuya patogenia implica la diseminación hematológica o la aspiración de *N. meningitidis* seguida de una invasión directa del parénquima pulmonar. Se observa, sobre todo, en personas con factores de riesgo predisponentes (adultos y poblaciones militares) (Rentero y Romero, 2011).

Aunque en ocasiones se ven casos con pericarditis, la endocarditis por *N. meningitidis* es rara. La conjuntivitis meningocócica primaria puede complicarse con meningococemia, por tanto, está justificado el tratamiento por vía general cuando se diagnostica este trastorno. Se describen uretritis meningocócica en sujetos que realizan sexo oral (Pollard y Nadel, 2006).

II.7.7 Complicaciones: Los pacientes con meningitis meningocócica pueden presentar parálisis de pares craneales, tromboflebitis venosa cortical y edema cerebral. En los niños puede haber derrames subdurales. Entre las posibles secuelas permanentes figuran el retraso mental, la sordera y la hemiparesia. La mayor morbilidad a largo plazo de la meningococemia fulminante es la pérdida de la piel, las extremidades o los dedos a causa de una necrosis o infarto (Barreiro *et al.*, 2002; Pollard y Nadel, 2006).

II.8 Diagnóstico clínico y microbiológico

El diagnóstico de certeza de la EM se basa en el aislamiento de *N. meningitidis* a partir del LCR, de la sangre, las petequias o de los líquidos sinovial, pleural o pericárdico. Las tres primeras muestras son las más utilizadas. El LCR típico de una meningitis tiene la presión aumentada, está turbio o purulento, tiene un elevado número de células ($\geq 2\ 000$ células/ μL), con predominio de LPN, las proteínas están también elevadas (> 200 mg/dL) y existe hipogluorraquia (glucosa en LCR/glucosa plasmática $< 40\%$) (Rouphael y Stephens, 2012).

Los estudios microbiológicos a realizar son:

- Tinción de Gram: Se observan diplococos gramnegativos y numerosos LPN.
- Cultivo: *N. meningitidis* crece en los medios de cultivo enriquecidos habituales no selectivos; su crecimiento se favorece con una atmósfera enriquecida con 5% de CO_2 . Tras comprobar que se trata de diplococos gramnegativos, oxidasa y catalasa positiva, se realiza la identificación enzimática, bioquímica y

el seroagrupamiento por aglutinación en láminas portaobjetos con antisueros específicos de grupo.

- Detección de antígeno capsular. Existen métodos útiles para aquellos pacientes que por recibir tratamiento antimicrobiano previo, el crecimiento del microorganismo se inhibe. Este método se aplica en casos con una celularidad elevada en el LCR, pero donde no se observan microorganismos en la tinción de Gram.
- Otras técnicas: La Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*) (PCR), de elevada sensibilidad y especificidad, podría tener utilidad en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo (Jordens *et al* 2002).
- Las radiografías de tórax, cráneo y senos paranasales permiten el diagnóstico de focos primarios. La resonancia magnética de cráneo es útil en la detección de complicaciones o de focos parameningeos (Apicella, 2005).

II.9 Epidemiología de la EM

La EM afecta a todos los países, con un predominio de casos en los niños menores de cinco años. Su patrón y frecuencia varía; en los países fríos, es usualmente endémica y presenta una incidencia anual entre 1-10/100 000 hab, con tasas más elevadas en el invierno. Se presentan períodos hiperendémicos, con una incidencia de hasta 20/100 000 hab, asociados a la expansión de clones virulentos entre las poblaciones no inmune o en grupos con una mayor susceptibilidad de enfermar (pobreza, hacinamiento) o en aquellos donde existe una influencia genética. En muchos países industrializados, predomina el serogrupo B, seguido por el C (Caugan y Maiden, 2009; Lee y Harrison 2010).

Los serogrupos B y C, prevalecen en Europa y América Latina; mientras que, el A y C, sobresalen en Asia y África (Gray *et al.*, 2006; Vyse *et al.*, 2011; Nakayama *et al* 2011). Israel, Suecia y Estados Unidos, son los países con un incremento de

EM por *N. meningitidis* Y (Gray *et al.*, 2006; Rentero y Romero, 2011, Gorla *et al.*, 2012). En los últimos años, los serogrupos Y y W-135 ascienden en Chicago, donde ocasionan un tercio de los casos notificados. Un cambio similar se describe en Canadá y Colombia (Agudelo *et al.*, 2008). La emergencia del serogrupo W-135 se manifiesta en Arabia Saudita, donde el elevado número de peregrinos musulmanes que acuden a la ceremonia religiosa del Hajj, ocasiona brotes de EM. Tras el regreso de los musulmanes a su lugar de origen, el serogrupo W-135 causa brotes en países europeos y, especialmente, en el año 2002, ocasiona una epidemia en Burkina Faso (Memish y Alrajhi, 2002; Badolo O *et al.*, 2008). Así, la vigilancia de los cambios de incidencia de estos y otros serogrupos dará respuesta al interrogante que surge sobre si otros serogrupos no habituales serán más o menos frecuentes en el futuro (Vázquez, 2006).

El serogrupo parece condicionar parte del comportamiento epidemiológico temporal de las cepas. El B causa ondas epidémicas con períodos interepidémicos de duración variable (Racloz y Silva, 2010; Steindl *et al.* 2010), el C se asocia a brotes y ondas de corta duración y el serogrupo A ocasiona grandes epidemias cíclicas en los países subsaharianos (Stephens *et al.*, 2007).

Entre 1993-1996, *N. meningitidis* B predomina en Europa; este serogrupo provoca brotes en los países desarrollados, con tasas de ataque entre 5-50/100 000 hab. En los últimos 100 años, la EM por el serogrupo A, representa un grave problema para las organizaciones de salud, sobre todo en el “cinturón de la meningitis” (Rosenstein *et al.*, 2003), donde la incidencia es más alta que la notificada en los países industrializados, y la mortalidad, se encuentra cerca del 10%, valor similar al de los países desarrollados. En los últimos años, las epidemias se extienden fuera de esa región y otros países señalan su ascenso, lo que hace muy difícil el control epidémico de la EM (Rouphael y Stephens, 2012).

Durante el siglo pasado se notifican ciclos epidémicos en Asia y China. Algunos clones ocasionan enfermedad hiperendémica o epidémica en varias regiones del mundo (Vyse *et al.*, 2011). El clon ET-5 (tipo electroforético 5), que incluye sobre

todo a cepas del serogrupo B, es responsable de brotes en Cuba, Brasil, Chile, Noruega y Estados Unidos (Harrison *et al.*, 2009), país donde en la década del 90, cepas de este complejo clonal, causan un brote en Oregón y Washington (Diermayer *et al.*, 1999).

II.10 La enfermedad meningocócica en Cuba

El primer caso de EM notificado en Cuba se remonta al año 1928, aunque esta enfermedad se observa desde 1916. Entre 1916-1976 (etapa pre-epidémica), la EM muestra un comportamiento endémico, se notifican casos esporádicos y pequeños brotes. El primer aislamiento de *N. meningitidis* se realiza en 1938 por los hermanos Martínez Cruz luego en 1946 Aballí refiere casos sospechosos relacionándolos con la movilización de las tropas norteamericanas a Cuba (Valcárcel *et al.*, 1991).

En 1976, se describe el primer brote intradomiciliario ocurrido hasta esa fecha, hecho que se relaciona con el inicio de la epidemia; a partir de ese momento, los casos aumentan y en 1980, el Minsap considera la EM como el principal problema de salud. En 1979, la incidencia es de 5,6/100 000 hab y debido al predominio del serogrupo C (50%), se inmuniza con la vacuna antimeningocócica A+C (Mérieux) a la población comprendida entre los 3 meses y 19 años de edad. Los niños de 10-14 años, seguidos por los menores de un año, constituyen los grupos priorizados. De esta manera, el porcentaje de casos ocasionados por el serogrupo C disminuye (7,2%) y se incrementa el B (78,4%) (Valcárcel *et al.*, 1991).

El pico de la epidemia ocurre en 1983 (14,4/100 000 hab) y para los menores de un año, la cifra es muy alta (120/100 000 hab). En ese momento, la ausencia de una vacuna efectiva contra el serogrupo B, hace imprescindible la caracterización de las cepas circulantes, con el objetivo de seleccionar un candidato vacunal. Se inicia la serotipificación de cepas aisladas de enfermos y portadores, así como la clasificación de las PME de *N. meningitidis*. En cinco años, y tras investigaciones básicas, estudios farmacológicos, preclínicos y clínicos (Fase I, II, II), junto a la intensificación de las etapas de desarrollo y el escalado productivo, un grupo de

investigadores del Instituto Finlay, desarrollan y obtienen una vacuna efectiva contra *N. meningitidis* B y C (VA-MENGOC-BC[®]) (Sotolongo y González, 1999). Entre 1989-1990, se realiza una campaña de inmunización masiva con VA-MENGOC-BC[®] en la población comprendida entre los 3 meses y 24 años, con una cobertura general de 95%. La inmunización tiene un efecto inmediato, pues se constata un descenso pronunciado y sostenido de la tasa de incidencia, descenso que se mantiene hasta el presente, actualmente se registra una incidencia de 0,1/100 000, cifra inferior a la registrada en el período pre-epidémico (0,6/100 000 hab) (Anuario Estadístico, 2011). El comportamiento de la EM durante los años que abarcó este estudio se muestra en la figura 1.

VA-MENGOC-BC[®], elaborada a partir de la cepa CU385/83 (B:4:P1.19,15), aislada de un caso invasivo, demuestra su eficacia clínica (83%), en la población de 10-66 años de edad. Además, la morbilidad descende en los menores de 5 años. En 1991, el Minsap incorpora la vacuna al PNI mediante un esquema de administración de dos dosis, la primera a niños de 3½ meses, con una segunda dosis a los 5½ meses de edad (Valcárcel *et al.*, 1991; Sotolongo *et al.*, 2007).

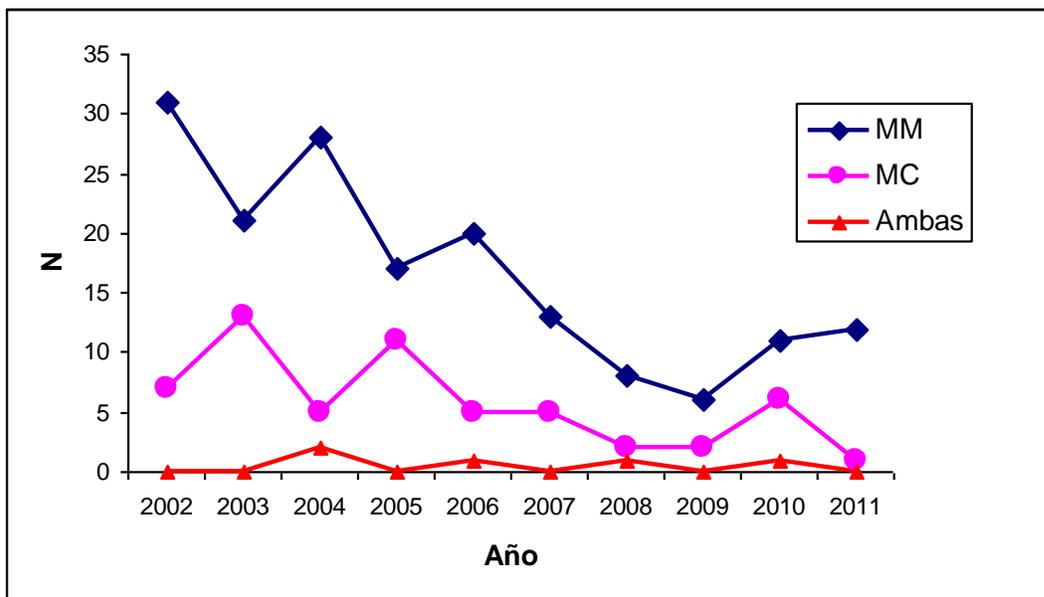


Figura 1. Comportamiento de la enfermedad meningocócica en Cuba, 2002-2011

Fuente: Sistema de Vigilancia Nacional de Meningitis Bacteriana. IPK

II.11 Marcadores epidemiológicos

Durante muchos años, las investigaciones epidemiológicas de los brotes de EM se basan en la caracterización serológica de las cepas de *N. meningitidis*, seguido del desarrollo de un esquema que incluye al PC y dos de las mayores PME (PorA y PorB) (Frasch *et al.*, 1985). Dicho esquema, sirve de base para el desarrollo y la distribución de estuches comerciales de gran aceptación, los que se utilizan para la identificación de los serogrupos, serotipos y subtipos (Abdillahi y Poolman, 1987). Sin embargo, a pesar de la ventaja de serotipificar los microorganismos aislados, el método muestra los inconvenientes provocados por una cobertura incompleta del panel de AcM utilizado, el fallo en el reconocimiento de los epítopes debido a la variación de fase y al intercambio de ácido desoxirribonucleico (ADN) por los mecanismos de transformación que ocurren en esta bacteria, así como por la selección impuesta por la respuesta inmune del hospedero (Brehony *et al.*, 2007). La clasificación solo del serogrupo es insuficiente para las investigaciones epidemiológicas. Una mejor discriminación está dada por la determinación del serotipo y subtipo, sin embargo, muchas cepas se clasifican como no tipables (NT) o no subtipables (NST) particularmente las de portadores.

II.11.1 Nuevos marcadores

Desde el punto de vista del aporte de la microbiología a los estudios epidemiológicos es importante tener en cuenta la epidemiología local y la global. Para dar respuesta a las necesidades de la epidemiología local, se desarrollan los sistemas de tipificación microbiológicos que podrían definirse como clásicos, incluyendo los fenotípicos y los moleculares o genotípicos. En los últimos años, se desarrollan sistemas definidos como universales por poder aplicarse a todas las especies bacterianas: Análisis del ADN mediante electroforesis en campo pulsado (ECP), PCR (del inglés: “*Polymerase Chain Reaction*”) arbitrario (AP-PCR), entre otros (Vázquez y Berrón, 2004).

La epidemiología global hace imprescindible el intercambio rápido y preciso de información entre los laboratorios. A menudo, estos no utilizan los mismos métodos, y aún sí lo hicieran, los resultados son difíciles de comparar. Los métodos mencionados se basan en la generación de patrones de bandas en geles de agarosa y su comparación en formato de imagen. Así pues, con el empleo de los mismos, compartir la información es un proceso complejo que requiere la formación de amplias redes capaces de estabilizar el método, así como implantar una metodología idéntica para el análisis e intercambio de imágenes, lo cual complica mucho todo el procedimiento. La necesidad de desarrollar un marcador válido para la epidemiología global en el caso de meningococo se hace, pues, evidente.

II.12 Prevención y control

II.12.1 Quimioprofilaxis

Como en otras enfermedades transmisibles, al interrumpir la cadena de transmisión se previene la aparición de casos invasivos de EM; actuar sobre el estado de portador, constituye una forma básica para el control de esta afección y configura la base de la quimioprofilaxis (Lepe y Aznar, 2009). La población diana de esta medida son los contactos estrechos de los casos clínicos, grupo con un mayor riesgo, sobre todo durante la primera semana de la aparición del caso índice. Reducir el riesgo de enfermar entre los contactos justifica la intervención precoz después de la notificación de los casos invasivos (Cardeñosa, 2006).

La sulfadiacina sódica, por su efectividad, bajo costo y ausencia de efectos secundarios fue considerada como el mejor quimioprofiláctico para la prevención de la EM. Sin embargo, en el año 1963, se describen las primeras cepas resistentes (Millar *et al.*, 1963), las que ascienden y se vinculan a brotes y epidemias (Cartwright, 2006). Ese comportamiento justifica su abandono y el inicio de ensayos con nuevos fármacos de probada eficacia “*in vitro*” frente a

N. meningitidis (minociclina, espiramicina, ofloxacina, ciprofloxacina, rifampicina y ceftriaxona), (Neri *et al.*, 2010).

La minociclina es efectiva como quimioproláctico, pero los efectos vestibulares que produce limitan su administración. Se utiliza en los casos de resistencia a la sulfadiacina y a la rifampicina (Fraser *et al.*, 2005). Por otro lado, las quinolonas, penetran fácilmente el tejido faríngeo y por alcanzar una concentración elevada en la saliva y las secreciones nasales, son también efectivas en la erradicación del portador de *N. meningitidis*. Además, tras su administración, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se mantiene alta durante más de 12 h. Sin embargo, puede producir lesiones en el cartílago de crecimiento y no se recomienda en los niños pequeños ni en las gestantes. No obstante, a pesar de su eficacia, se notifican cepas con sensibilidad disminuida y resistentes a la ciprofloxacina (Corso *et al.*, 2005; Singhal *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2007; Strahilevitz *et al.*, 2007; Enriquez *et al.*, 2008).

La rifampicina es uno de los fármacos más eficaces para reducir los portadores de *N. meningitidis*, aunque después de su utilización puede conducir a la aparición de cepas resistentes, por mutaciones en el gen *rpoB* o alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (Stefanelli *et al.*, 2001; Rainbow *et al.* 2005). Algunos autores señalan fallos en su utilización para prevención de la EM y la reducción de portadores, otros refieren la ocurrencia de brotes por cepas resistentes (Pérez *et al.*, 2010).

Las cefalosporinas de tercera generación (ceftriaxona), tras su aplicación mantienen una larga vida media en sangre. Esto permite administrarlas en monodosis y son útiles para el tratamiento y la profilaxis de la EM. En situaciones epidémicas no se recomienda la quimioprofilaxis masiva en los colectivos abiertos. Esta medida se justifica entre las personas que conviven en el domicilio del paciente, los niños que comparten la misma aula o guardería, en los reclusos de una misma celda y en el personal de salud que tiene contacto con las secreciones nasofaríngeas del enfermo (Cardeñosa, 2006).

II.12.2 Inmunoprofilaxis

La principal medida de prevención para la EM es la vacunación. Desde la década del 70 existen vacunas contra los principales serogrupos de *N. meningitidis* (Bilukha y Rosenstein ,2005; Dominguez *et al.*, 2006). Las primeras se obtienen mediante la purificación de sus PC, y aunque son eficaces en los niños mayores de dos años y adultos, son poco inmunogénicas en las edades más tempranas, etapa cuando hay una mayor susceptibilidad a esta afección (WHO, 2008). El proceso de conjugación del PC con una proteína transportadora se desarrolla a partir de 1987 (Verma y Fisher, 2009). Las vacunas conjugadas son eficaces frente a los principales agentes etiológicos de las meningitis bacteriana y a diferencia de las polisacáridicas, son seguras y eficaces a partir de los dos meses de edad, producen una protección de larga duración al eliminar el estado de portador nasofaríngeo y reducen la transmisión de serogrupos incluidos en la vacuna. Existen vacunas conjugadas efectivas contra los serogrupos A, C, Y y W-135. Mientras que, para la prevención de *N. meningitidis* B, existen las vacunas de PME. (Harrison *et al.*, 2010; Sadarangani y Pollard, 2010).

II.13 Susceptibilidad antimicrobiana de *N. meningitidis*

Desde que Ehrlich, en 1913, postula el ideal terapéutico de un quimioterápico, se avanza considerablemente en este campo. No obstante, pese a los beneficios obtenidos, no existe el fármaco que cumpla con estos postulados y la investigación sigue vigente. Por otro lado, la emergencia de nuevas infecciones y la resistencia a los antimicrobianos actuales, lleva a la búsqueda de nuevas moléculas o a la recuperación de otras y que el mundo del tratamiento con antimicrobianos sea un tema muy actual (Lepe *et al.*, 2006). La consecuencia directa de este fenómeno es la emergencia de cepas multirresistentes y su solución involucra esferas como la vigilancia epidemiológica y el control de los antimicrobianos, acciones que aportan mejores resultados que el diseño y la producción de nuevos fármacos (Spellberg *et al.*, 2008). *N. meningitidis* no

escapa a esta problemática y a través del tiempo se describen cambios en su comportamiento frente a los antimicrobianos profilácticos y terapéuticos utilizados en la EM (Jorgensen, 2006; Crawford *et al.*, 2006; Enriquez *et al.*, 2009).

El uso de la penicilina desde 1944, supuso un tratamiento eficaz para la EM y a pesar de que *N. meningitidis* no desarrolla con facilidad resistencia a los fármacos, la emergencia de cepas con SI a partir de 1985, se convierte en un problema actual (Arreaza *et al.*, 2000; Jorgensen *et al.*, 2005; Valdés *et al.*, 2008; Ibarz-Pavón *et al.*, 2012). La penicilina, por su escasa toxicidad, sustituye a la sulfadiacina sódica y utilizada en altas dosis es una alternativa válida para el tratamiento de la EM (Trotter *et al.*, 2002), pero la descripción de cepas con SI es un problema de amplia distribución geográfica y gran diversidad poblacional (Jorgensen *et al.*, 2005; du Plessis, *et al.* 2008; Ibarz-Pavón *et al.*, 2012). Las cepas con estas características muestran una disminución de la afinidad por la proteína fijadora de la penicilina 2 (PBP2), comportamiento también descrito en *Neisserias* saprófitas, atribuyéndose su aparición a procesos de recombinación genética que sustituyen partes del gen *penA* de la PBP, por las correspondientes regiones de este gen en *Neisserias* comensales (Stefanelli *et al.*, 2011). Por otro lado, la resistencia a la penicilina mediada por β -lactamasa se señala en casos muy aislados (Botha, 1995; Fontanals *et al.*, 1989).

El cloranfenicol, descrito en 1947, es un excelente antimicrobiano frente a *N. meningitidis*. Se utiliza para el tratamiento de la EM en el continente africano y por motivos económicos, constituye una buena alternativa terapéutica para esa región. En España, es una opción para los pacientes alérgicos a la penicilina y a las cefalosporinas de tercera generación. La resistencia a este fármaco se debe a la producción de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa y es poco frecuente, aunque se notifican en Francia y Vietnam (Oppenheim, 1997; Galimand *et al.*, 1998; Shultz *et al.*, 2005).

Por su parte, las cefalosporinas de tercera generación son eficaces contra *N. meningitidis*. La ceftriaxona se utiliza con éxito para el control de epidemias y

muestra su efectividad en la erradicación del estado de portador (Arreaza *et al.*, 2000; Antignac *et al.*, 2003; Ibarz- Pavón *et al.*, 2012).

*MATERIALES Y
MÉTODOS*

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño general de la investigación

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el marco de la vigilancia microbiológica pasiva de *N. meningitidis* que realiza el LNRNP del IPK y que incluyó la caracterización de los aislamientos recibidos durante 10 años (2002-2012). Los aislamientos fueron remitidos por los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de las diferentes provincias.

III.2 Marco de la investigación

Esta investigación se realizó en el LNRNP, perteneciente al Departamento de Bacteriología-Micología de la Subdirección de Microbiología del IPK. Este laboratorio posee el equipamiento tecnológico necesario para brindar servicios especializados, así como enfrentar las contingencias que se presenten en Cuba sobre la EM y otras enfermedades producidas por *Neisserias* patógenas, además realiza el control de calidad del diagnóstico de los CPHEM. Todos los años hace el diagnóstico microbiológico a los aislamientos remitidos por las diferentes provincias del país. Por sus condiciones técnicas y la preparación científica de los profesionales que laboran en él, constituye el Centro de Referencia Nacional reconocido por el MINSAP para acometer los estudios de vigilancia microbiológica de la EM en Cuba.

III.2.1 Universo de trabajo y muestra

El universo de este estudio incluyó 136 aislamientos previamente identificados como *N. meningitidis* en diferentes provincias del país, obtenidos de procesos invasivos y remitidos al LNRNP-IPK desde enero de 2002 hasta diciembre de 2011. De estos aislamientos, 67 fueron no viables, por lo que la muestra estudiada incluyó 69 aislamientos. El análisis de estos aislamientos se realizó en dos etapas, la primera incluyó la caracterización fenotípica de los mismos y en la segunda etapa se realizó el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana.

III.3 Consideraciones éticas

Se cumplieron las regulaciones descritas para este tipo de estudio, de acuerdo con lo establecido por las normas éticas, institucionales y regionales de la medicina actual. La información obtenida en el LNRNP-IPK solo se utilizó para la investigación, manteniéndose la debida privacidad de los datos del paciente.

III.4 Identificación y caracterización de los aislamientos

III.4.1 Cepas utilizadas

A continuación se describen las cepas que se incluyeron en esta investigación:

a) **Cepas utilizadas en la caracterización fenotípica:** Se estudiaron 69 cepas de *N. meningitidis* remitidas durante 10 años (2002-2011) al LNRNP-IPK desde las diferentes provincias de Cuba.

d) **Cepas para el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana:** De las 69 cepas viables recibidas durante el período objeto de estudio, se investigaron 56 que mantenían la viabilidad en la segunda etapa.

III.4.2 Procesamiento de los aislamientos

Los aislamientos se remitieron al LNRNP-IPK en cuñas de agar Chocolate y se procesaron de acuerdo con los métodos convencionales descritos en el Manual de Operaciones y Procedimientos (MOP) del LNRNP-IPK.

Todos los aislamientos se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton (AMH), enriquecido con suplemento Vitox (Oxoid) y una mezcla de inhibidores (VCN) compuesta por vancomicina (3 µg/mL), colistina (750 µg/mL) y nistatina (1 250 µg/mL). Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 18 a 24 horas en una atmósfera húmeda con 5-10% de CO₂; los aislamientos identificados y confirmados como *N. meningitidis* se conservaron a -80 °C en caldo Triptona Soya más glicerol al 20%, para su posterior estudio y clasificación (anexo 1).

III.4.3 Cultivo y replicación bacteriana

Los aislamientos se mantuvieron almacenados en caldo Triptona Soya con 20% de glicerol a -80°C . A partir de esta conservación se realizaron subcultivos a placas Petri de AMH tal como se describe en el acápite anterior (III.4.2).

III.4.4 Pruebas de identificación y confirmación de las cepas de *N. meningitidis*

En todos los cultivos obtenidos se siguió el siguiente proceso de identificación: tinción de Gram, producción de citocromo-oxidasa y catalasa, detección de la actividad γ -Glutamil-aminopeptidasa y la utilización de diferentes carbohidratos (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa) (Sotolongo F, 1995; OMS, 2009).

III.4.5 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 (MacFaddin, 2006).

Lectura e interpretación: En los casos positivos se observó la aparición de un color púrpura intenso en la estría realizada sobre el papel de filtro; en los casos negativos no se produjo este cambio de color.

III.4.6 Producción de catalasa

Se colocó una gota de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3% sobre una lámina portaobjetos. Luego, con la ayuda de un asa estéril desechable, se depositó una asada de la cepa a investigar sobre la gota de H_2O_2 (MacFaddin, 2006).

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.

III.4.7 Detección de la actividad γ -Glutamil-aminopeptidasa

Se determinó mediante el sistema Enzyline γ -GT 20S (bioMèrieux). 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 (Sotolongo F, 1995).

Lectura e interpretación: En los casos positivos, a los 30 min, la suspensión bacteriana tomó un color amarillo intenso y en los negativos, no hubo cambio de color.

III.4.8 Utilización de carbohidratos

Como medio base se empleó el agar Cistina Tripticasa (CTA) (Difco). Al medio base se le añadieron los azúcares (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa) a una concentración del 1%, previamente esterilizados de forma independiente (filtros 0,22 μ m, Sartorius) en soluciones al 10%. Para la siembra, mediante asa estéril desechable, se tomó un inóculo bacteriano abundante, el que se sembró por punción, en cada uno de los tubos que contenían los azúcares incorporados al medio base, posteriormente se incubó a 37 °C, sin CO₂ (Sotolongo F, 1995; OMS, 2009).

Lectura e interpretación: Se interpretó como reacción positiva, si existió un cambio de color del indicador de pH (Rojo Fenol), de anaranjado a amarillo. En los casos negativos, no se observó esta reacción.

III.4.9 Determinación de los serogrupos

La determinación de los serogrupos se realizó por el método de aglutinación en láminas portaobjetos con antisueros comerciales monovalentes dirigidos contra los serogrupos A, B, C, Y y W135 (Difco) y mediante la aglutinación con partículas de Látex (Wellcogen®). A partir de un cultivo puro de *N. meningitidis* se realizó una suspensión bacteriana densa; luego, una gota de cada suspensión se enfrentó a

los antisueros específicos, se realizó una rotación de la mezcla y se observó la aparición de aglutinación (Sotolongo F, 1995; OMS, 2009).

Interpretación: El resultado de la aglutinación 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 antisueros probados y aquellas que no aglutinaron con ninguno de estos, se identificaron como cepas de *N. meningitidis* no agrupables (NA). Respecto al látex, se interpretó como positiva, aquella reacción donde se observó una aglutinación visible de las partículas de látex en un plazo de tres minutos con alguno de los reactivos del panel, acompañado por reacciones negativas con los otros reactivos. Se clasificaron como cepas NA las que no aglutinaron, las que lo hicieron con más de uno de los antisueros y las que no aglutinaron con ninguno.

En aquellas cepas donde la reacción de aglutinación fue dudosa, la serogrupación se realizó mediante PCR a partir del ADN obtenido por el sistema comercial *Wizard Genomic DNA purification* (Promega).

III.4.10 Determinación del serogrupo mediante PCR

Se realizó un PCR cualitativo cuyos pasos se describen a continuación:

Extracción de ADN

A las cepas de *N. meningitidis* se le añadió 200 μ L de tampón lisis (ClNa 100 mM, EDTA 100 mM, 0.5% de SDS, pH 8). Se resuspendió por vórtex durante 30 segundos y se le añadió 50 μ L de proteinasa K (20 mg/ mL). Luego, se incubaron 1 hora a 56 $^{\circ}$ C. El ADN se extrajo mediante solución de fenol/cloroformo y se precipitó con 2 volúmenes de etanol frío al 95% y ClNa a una concentración final de 150 mM. El ADN se lavó con 1 mL de etanol al 70% y luego se resuspendió en 50 μ L de H₂O bidestilada estéril. El ADN se conservó a -20 $^{\circ}$ C para utilizarse posteriormente en la reacción de PCR.

Mezcla y condiciones de la reacción de PCR

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50 μ L compuesto por 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de Cl_2Mg ; 25 pM de cada cebador, 5 μ L de tampón 10X; 0,25 U de *Taq* polimerasa y 2 μ L de ADN (Promega). Las reacciones se amplificaron en un termociclador (Eppendorf *Mastercycler personal*, Alemania).

Para la determinación de los serogrupos se utilizaron cebadores que amplifican diferentes regiones del gen *orf* (tabla 1). El programa de PCR se realizó de la siguiente manera: desnaturalización inicial por 2 min a 94 $^{\circ}\text{C}$; seguido de 30 ciclos de 30 seg a 92 $^{\circ}\text{C}$, 30 seg a 58 $^{\circ}\text{C}$, 30 seg a 72 $^{\circ}\text{C}$ y una extensión final a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min. En cada una de las reacciones se utilizaron como controles positivos las cepas de referencia de *N. meningitidis* 2695 (serogrupo B), *N. meningitidis* (A, C, W-135, Y) y como control negativo se empleó una cepa de *N. lactamica*.

Análisis de los productos amplificados

Los productos de PCR se aplicaron en una electroforesis submarina en gel de agarosa (Promega) al 2% (p/v), con 2% de bromuro de etidio, utilizando el tampón de corrida Tris-Borato-EDTA (TBE) a una concentración de 1X, según el procedimiento estándar. Las tallas de los productos amplificados se determinaron comparándolos con el marcador de peso molecular de 100 bp ADN Step Ladder (Promega). Los resultados de la electroforesis se visualizaron a través de un transiluminador de luz UV (Vilber Loumat, Francia).

Tabla 1. Descripción de los cebadores utilizados para la determinación del serogrupo de las cepas de *N. meningitidis* estudiadas.

Genes Diana	Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Fragmento que amplifica
<i>orf-2 (A)</i>	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3' 5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	400pb
<i>siaD (B)</i>	5'-GGATCATTTCAGTGTTTTCCACCA-3' 5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	450pb
<i>siaD (C)</i>	5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3' 5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	250pb
<i>siaD (W135)</i>	5'-CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA-3' 5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	120pb
<i>siaD (Y)</i>	5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3' 5'-CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	120pb

Cepas patrón de serogrupos de *N. meningitidis*

Para la determinación del serogrupo se utilizaron las siguientes cepas de referencia: A (M139), B (M166), C (M137), X (M405), Y (M406), Z (M406) y W-135 (M603), todas pertenecientes a la colección de cultivos del IPK. Además, se utilizó la cepa vacunal cubana de *N. meningitidis* B (385/83) del Departamento de Colecciones de Cultivo del Instituto Finlay

III.3.11 Determinación de serotipos y subtipos

Se utilizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de células enteras 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 serotipos y subtipos se empleó un panel comercial de AcM, del Instituto Nacional para Control Biológico y Estándares del Reino Unido (NIBSC) (tablas 2 y 3).

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales específicos para determinar los serotipos de *N. meningitidis*

AcM	Serotipos
MN3C6B	1
MN2D3F	2a
MN2C3B	2b
MN14G21	4
MN5C8C	14
6B11-E2-B5	21

Tabla 3. Anticuerpos monoclonales específicos para determinar los subtipos de *N. meningitidis*

AcM	Subtipos
MN14C2.3	P1.1
MN16C13F4	P1.2
MN20B9.34	P1.4
MN22A9.19	P1.5
MN19D6.13	P1.6
MN14C11.6	P1.7
MN5A10F	P1.9
MN20F4.17	P1.10
MN20A7.0	P1.12
MN24H10.75	P1.13
MN3C5C	P1.15
MN5C11G	P1.16
8B5-5-G9	P1.19

Para la determinación de los sero/subtipos se utilizaron las siguientes cepas patrones (tabla 4), todas pertenecientes a la colección de cultivos del IPK. Además, se utilizó la cepa vacunal cubana de *N. meningitidis* B (385/83) del Departamento de Colecciones de Cultivo del Instituto Finlay.

Tabla 4. Cepas patrones empleadas para la determinación de serotipos y subtipos de *N. meningitidis*

Cepas	Serotipo/subtipos	Cepas	Serotipo/subtipos
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
M982	9:P1.9	S3032	12:P1.12,16
S3446	14:P1.6,14	H355	15:P1.15
H44/76	15:P1.7,16	882066	NT:P1.4

III.5 Susceptibilidad antimicrobiana

El estudio de la susceptibilidad antimicrobiana para la determinación de la CMI se llevó a cabo por E-test, siguiendo las normas establecidas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*), para los siguientes antimicrobianos: penicilina G, ceftriaxona, cloranfenicol, rifampicina, cotrimoxazol y ciprofloxacina (CLSI, 2012).

A partir del crecimiento bacteriano puro se prepararon suspensiones en caldo Mueller-Hinton y se ajustó la concentración, tomando como referencia el patrón de turbidez del tubo 0,5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Con la ayuda de un hisopo estéril, esta suspensión se sembró en tres direcciones, con el fin de asegurar la uniformidad del inóculo en las placas de AMH suplementadas con sangre de carnero al 5%. Las tiras de E-test se colocaron sobre la superficie del medio mediante pinzas estériles. Las placas se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 18-24 h.

Para la lectura de los resultados, se asumió como CMI el punto donde la elipse de crecimiento bacteriano interceptó la escala de la tira, leyéndose siempre el punto de completa inhibición de todo el crecimiento, incluyendo el desarrollo difuso y las colonias aisladas. Se interpretó como CMI, la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento microbiano y se emplearon las categorías de sensible (S), sensibilidad intermedia (SI) y resistente (R), según los rangos descritos (CLSI, 2012) (tabla 5).

Tabla 5. Valores de corte para los antimicrobianos utilizados en el estudio según los criterios del CLSI (2011).

Antimicrobianos	Criterios CLSI ($\mu\text{g/mL}$)		
	S	SI	R
Penicilina	$\leq 0,06$	0,12-0,25	$\geq 0,5$
Cotrimoxazol	$\leq 0,12/2,4$	0,25/4,75	$\geq 0,5/9,5$
Rifampicina	$\leq 0,5$	1	≥ 2
Cloranfenicol	≤ 2	4	≥ 8
Ciprofloxacina	$\leq 0,03$	0,06	$\geq 0,12$
Ceftriaxona	$\leq 0,12$	-	-

III.5.1 Producción de la enzima β -lactamasa

A los aislamientos identificados como resistentes a la penicilina se les determinó la actividad de la enzima β -lactamasa mediante el método de la Nitrocefina Cromógena, de acuerdo con las indicaciones del fabricante (Oxoid).

III.6 Recogida de la información

Para la recogida de la información se consultaron los datos incluidos en la planilla “Modelo de Envío de Muestras para el Diagnostico Microbiológico”, que constituye el documento vigente y autorizado por el MINSAP para este propósito. Además, se consultó el Libro de Registro de Entrada de las Cepas del LNRNP-IPK, de donde se tomaron los datos correspondientes (procedencia de las muestras por

provincias, fuente de los aislamientos y años) y el Sistema de Vigilancia Nacional de Meningitis Bacteriana del IPK (VNMB).

III.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se introdujeron en una base de datos, utilizando el programa Microsoft Excel 2007. Se calcularon las frecuencias absolutas y los porcentajes de las variables investigadas.

Operacionalización de las variables

Para cumplimentar los objetivos trazados se estudiaron las variables que se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Operacionalización de las variables demográficas y microbiológicas evaluadas durante el estudio.

Variables	Operacionalización de las variables		
	Clasificación de la variable	Categorías de la escala	Definición de las categorías de la escala
Procedencia del aislamiento	Cualitativa nominal	Regiones occidental, central y oriental	Se tuvo en cuenta la distribución de las provincias, según la división política administrativa vigente hasta el año 2011
Fuente de los aislamientos	Cualitativa nominal	Sangre, petequias y LCR	Según el lugar de procedencia de la toma de muestra para el aislamiento, referido en la boleta de recogida de los datos
Serotipos	Cualitativa nominal	4; NT; 2a; 7; 17; 4.15; 4.7; 15; 21; 7.17	Según resultado de ELISA con AcM específicos para cada serotipo
Subtipos	Cualitativa nominal	P1.2;P1.4,19;P1.9; P1.1;P1.19,15; P1.15,16; P1.9,15	Según resultado de ELISA con AcM específicos para
Fenotipos	Cualitativa nominal	B:4:P1.15; B:4:P1.19; B:2a:P1.5; B:7:P1.15; B:NT:P1.NST; B:NT:P1.15; B:4:P1.4,19; B:4:P1.9; B:NT:P1.2; B:4,7:P1.15; B:15:P1.4; B:17:P1.15; B:17:P1.15,16; B:21:P1.NST; B:4,15:P1.19; B:4,15:P1.4; B:4:P1.NST; B:4:P1.19.15; B:4:P1.9,15; B:7,17:P1.NST; B:NT:P1.1; B:NT:P1.4;C:2a:P1.5	Según la combinación de serogrupo serotipo y subtipo
Susceptibilidad antimicrobiana	Cualitativa Nominal	Sensible Intermedia Resistente	Susceptibilidad demostrada para cada aislamiento en estudio, según criterios CLSI, 2012

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 Caracterización del universo de estudio

La vigilancia microbiológica de este trabajo incluyó 10 años y durante este período se recibieron 136 aislamientos de *N. meningitidis*, remitidos desde las diferentes provincias del país (tabla 7). Al reagruparse estas por regiones (occidental, central y oriental) se observó que 53,7% correspondieron a la región central, donde las provincias con mayores porcentajes de remisión fueron: Villa Clara (26,5%), Cienfuegos y Camagüey, ambos con cifras idénticas (8,8%); en el occidente, se destacaron Ciudad de La Habana y Matanzas, con 11,0 y 9,6%, respectivamente

Tabla 7. Distribución de las cepas de *N. meningitidis* enviadas por las diferentes provincias de Cuba. LNRNP- IPK, 2002-2011.

Provincias*	n	%
Pinar del Río	5	3,7
La Habana	1	0,7
Ciudad de La Habana	15	11,0
Matanzas	13	9,6
Cienfuegos	12	8,8
Villa Clara	36	26,5
S. Spíritus	6	4,4
Ciego de Ávila	7	5,1
Camagüey	12	8,8
Las Tunas	5	3,7
Granma	7	5,1
Holguín	6	4,4
Santiago de Cuba	8	5,9
Guantánamo	2	1,5
Isla de la Juventud	1	0,7
Total	136	100,0

Fuente: Modelo de envío de muestras

Leyenda: *Dado el período de estudio, se adoptó según la distribución política administrativa vigente hasta el 2011.

IV.2 Análisis de la viabilidad de los aislamientos recibidos en el LNRNP por año de estudio

El porcentaje de cepas viables fue de 50,7% y el de no viables 49,3% (datos no mostrados en la tabla). El mayor número de aislamientos viables recibidos durante el período investigado correspondió al año 2006 (88,8%), seguidos por los años 2008 (77,7%) y 2009 (70,0%). Los otros años investigados mostraron porcentajes inferiores (tabla 8).

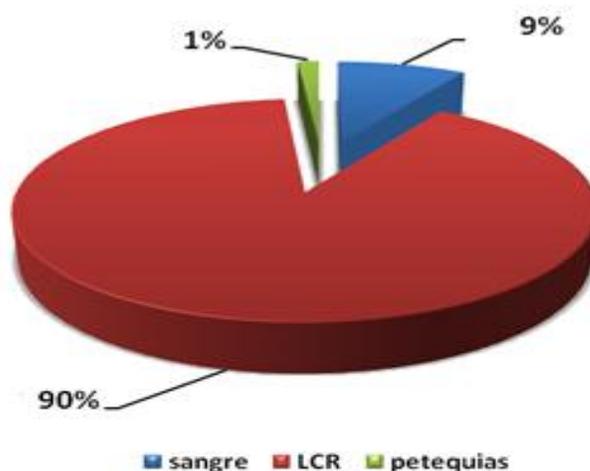
Tabla 8. Distribución anual de los aislamientos de *N. meningitidis*, recibidos y viables en el LNRNP- IPK, 2002-2011.

Años	Aislamientos		
	Recibidos	n	%
2002	38	13	34,2
2003	16	8	50
2004	13	3	23,1
2005	14	8	57,1
2006	11	9	88,8
2007	7	4	54,1
2008	9	7	77,7
2009	10	7	70,0
2010	13	7	53,8
2011	5	3	60,0

Fuente: Modelo de envío de muestras

IV.3 Fuente de los aislamientos recibidos en el LNRNP entre 2002-2011

De los 136 aislamientos se recuperaron el 90% (122) a partir del cultivo del LCR; 9% se obtuvieron de los hemocultivos (12) y el 1% se aislaron de las Petequias (2) (figura 2).



Fuente: Modelo de envío de muestras

Figura 2. Distribución de la fuente de los aislamientos de *N.meningitidis* recibidos en el LNRNP-IPK, 2002-2011

IV.4 Distribución de serogrupos y sero/subtipos en las cepas estudiadas

Los serogrupos, serotipos y subtipos detectados se describen en la tabla 9. Hubo un predominio casi absoluto del serogrupo B (98,6%), con un aislamiento del C (1,4%). La detección de serogrupo B para siete aislamientos se logró por PCR.

Respecto a los serotipos se observó un franco predominio del serotipo 4 (55,1%), seguidos por cepas NT (15,9%) y 2a (8,7%). Otros serotipos como el 15, 21 y 7,17 se identificaron en un aislamiento (1,4%). Se observó diversidad respecto a los subtipos, predominaron el P1.15 (42%) y P1.19 (20,3%), seguidos de los aislamientos NST (10,1%). Otros subtipos mostraron una baja frecuencia. La relación P1.19,15 se observó en un aislamiento (1,4%) (tabla 9).

Tabla 9. Marcadores epidemiológicos de las cepas de *N. meningitidis* identificados durante el período investigado. LNRNP-IPK, 2002-2011

Marcadores			
Epidemiológicos	Clasificación	Número de aislamientos	%
Serogrupos	B	68	98,6
	C	1	1,4
		Total: 69	Total: 100,0
Serotipos	4	38	55,1
	NT	11	15,9
	2a	6	8,7
	7	5	7,2
	17	2	2,9
	4,15	2	2,9
	4,7	2	2,9
	15	1	1,4
	21	1	1,4
	7,17	1	1,4
			Total: 69
Subtipos	P1.15	29	42,0
	P1.19	14	20,3
	P1.NST	7	10,1
	P1.5	6	8,7
	P1.4	3	4,3
	P1.2	2	2,9
	P1.4,19	2	2,9
	P1.9	2	2,9
	P1.1	1	1,4
	P1.19,15	1	1,4
	P1.15,16	1	1,4
P1.9,15	1	1,4	
		Total: 69	Total: 100,0

IV.4 Distribución de fenotipos en las cepas estudiadas

Predominó el fenotipo B:4:P1.15 (18/26,1%), seguido por el B:4:P1.19 (13/18,9%), B:2a:P1.5 y B:7:P1.15, ambos con el mismo número de aislamientos (5/7,2%). Otros mostraron porcentajes bajos, aunque es importante destacar la presencia del fenotipo C: 2a:P1.5 (1,4%) (tabla 10).

Tabla 10. Distribución de los fenotipos de *N. meningitidis* identificados durante el período investigado. LNRNP-IPK, 2002-2011.

Fenotipos	Número de aislamientos	%
B:4:P1.15	18	26,1
B:4:P1.19	13	18,9
B:2a:P1.5	5	7,2
B:7:P1.15	5	7,2
B:NT:P1.NST	4	5,8
B:NT:P1.15	3	4,4
B:4:P1.4,19	2	2,9
B:4:P1.9	2	2,9
B:NT:P1.2	2	2,9
B:4,7:P1.15	2	2,9
B:15:P1.4	1	1,4
B:17:P1.15	1	1,4
B:17:P1.15,16	1	1,4
B:21:P1.NST	1	1,4
B:4,15:P1.19	1	1,4
B:4,15:P1.4	1	1,4
B:4:P1.NST	1	1,4
B:4:P1.19.15	1	1,4
B:4:P1.9,15	1	1,4
B:7,17:P1.NST	1	1,4
B:NT:P1.1	1	1,4
B:NT:P1.4	1	1,4
C:2a:P1.5	1	1,4
Total	69	100,0

IV.5 Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *N. meningitidis* estudiadas

Al analizar la susceptibilidad de los aislamientos investigados, aunque predominaron la cepas sensibles, cabe destacar la alta resistencia al cotrimoxazol (52/92,8%). Hubo también cepas resistentes a la penicilina (5/8,9%), al cloranfenicol (3/5,45%) y a la ciprofloxacina (6/10,76%). Todos los aislamientos fueron sensibles (100%) a la ceftriaxona (tabla 11) y ninguna cepa resistente a la penicilina produjo B-lactamasa.

Tabla 11. Susceptibilidad antimicrobiana de las cepas de *N. meningitidis* aisladas durante el período investigado. IPK, 2002-2011.

Antimicrobianos	Sensible		Sensibilidad intermedia		Resistente	
	n	%	n	%	n	%
Penicilina	49	87,5	2	3,57	5	8,9
Ceftriaxona	56	100	0	0,0	0	0,0
Cloranfenicol	52	92,8	1	1,78	3	5,3
Rifampicina	55	98,2	1	1,78	0	0,0
Ciprofloxacina	50	89,3	0	0,0	6	10,7
Cotrimoxazol	3	5,3	1	1,8	52	92,8

DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V. 1 Procedencia y viabilidad de los aislamientos remitidos al LNRNP

La vigilancia de las MB se establece en Cuba desde 1961 como parte de las Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO); luego, a partir de la epidemia de EM, se implanta una vigilancia especial de cobertura nacional para esta enfermedad, pero desde los años 90, el incremento de la frecuencia de otras bacterias causantes de MB (sobre todo de *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*), motiva la implementación, en 1998, de un sistema de VNMB en el IPK, como parte del Programa Nacional y Control de los Síndromes Neurológicos Infecciosos, lo que permite la obtención de una información más completa sobre la EM. (Valcárcel *et al.*, 1991; Pérez *et al.*, 2003). La remisión de *N. meningitidis* al LNRNP en condiciones óptimas, forma parte de la vigilancia epidemiológica de la EM y contribuye al conocimiento, identificación y caracterización de los aislamientos obtenidos en la comunidad.

En los 10 años analizados, la remisión de cepas de *N. meningitidis* desde las diferentes provincias de Cuba, puso de manifiesto que Villa Clara y Ciudad de La Habana, remitieron el mayor número de cepas, seguidas por Matanzas, Cienfuegos y Camagüey. El bajo número de aislamientos recibidos pudiera estar en correspondencia con el descenso de los casos de EM en Cuba después de la inmunización con VA-MENGOC-BC[®]. La introducción de esta vacuna al PNI produjo un descenso pronunciado y mantenido de la tasa de incidencia general de EM en todo el país, la que en estos momentos es muy baja (0,1/100 000 hab) (Pérez *et al.*, 2010^a; Anuario Estadístico, 2011).

No obstante, históricamente, algunas provincias centrales y occidentales, así como Camagüey mantienen una remisión sistemática, quizás porque durante la epidemia de EM mantenían altas tasas de incidencia e integraban las provincias involucradas en el trabajo de campo sobre la vacunación antimeningocócica cubana (Valcárcel *et al.*, 1991). Por otro lado, Pérez *et al.*, 2010^a, en

correspondencia con los resultados de este trabajo, destacan a Villa Clara, Cienfuegos y Ciudad de La Habana entre las provincias de más alta incidencia de MB en la comunidad durante la década 1998-2007, aunque incluyen también a Guantánamo, región que remitió un número muy limitado de cepas al LNRNP en los 10 años que abarcó este trabajo.

Ratifican también este planteamiento, Rodríguez *et al.*, 2010, quienes ubican a Ciudad de La Habana, Cienfuegos y Villa Clara, entre las provincias con las tasas de MB más elevadas. Otros autores, buscan una posible relación entre la incidencia de las MB y las características geográficas, al describir que, en la región central de Cuba, hay una mayor radiación solar y variabilidad climática, factores que pudieran favorecer a un mayor número de casos en esa región (Ortiz *et al.*, 2006).

Al analizar las cepas recibidas en el LNRNP se constató un número inferior al de los casos de EM notificados (222 casos), por el sistema de VNMB del IPK. Este resultado pudo estar vinculado a la no remisión de todas las cepas aisladas por los CPHEM, tal como está orientado por el Programa Nacional de Prevención y Control de Síndromes Neurológicos Infecciosos (Quintana *et al.*, 1999); además, en algunos casos, la notificación no siempre se acompaña de un aislamiento bacteriano. No obstante, la incidencia de EM en Cuba se mantiene muy baja y no representa un problema de salud después de más de 20 años de inmunización con VA-MENGOC-BC[®] (Pérez *et al.*, 2010^b). Este comportamiento apoyaría, en parte, el bajo número de cepas remitidas al LNRNP desde los CPHEM, aunque, el descenso en la remisión pudiera también relacionarse a un diagnóstico microbiológico menos fortalecido por los laboratorios que integran la red de salud. Influyen de manera significativa en la recuperación de este microorganismo problemas relacionados con la calidad de la toma de muestras, así como las dificultades en el transporte y la conservación de las cepas recuperadas y el tratamiento antimicrobiano previo de los pacientes (Pérez *et al.*, 2010^b).

Durante 1985 y 1986, el diagnóstico microbiológico de *N. meningitidis* alcanza porcentajes de 74,2 y 85,7%, cifras superiores a las obtenidas en los últimos años (Valcárcel *et al.*, 1991). Pérez *et al.*, 2008, señalan que los porcentajes de no identificación de los agentes causales de MB entre los años 1998-2007, oscilan entre 40,9-73,4%. Por otro lado, en Camagüey, Sanchén *et al.*, 2010, refieren una positividad bacteriológica (55%) superior al indicador nacional (50%). Las MB sin agente específico aislado o identificado constituyen alrededor de las $\frac{3}{4}$ partes del total de los casos reportados en este grupo de infecciones. (Pérez *et al.*, 2008). Rodríguez *et al.*, 2010 en su valoración de las MB en el primer semestre de 2010 y 2009, notifican 53 y 44%, respectivamente de MB sin agente específico o identificado.

En España, un estudio sobre el diagnóstico bacteriológico de la MB, llama la atención sobre el elevado número de casos de probable etiología bacteriana sin diagnóstico preciso, por no existir una confirmación bacteriológica en los cultivos realizados y relaciona este comportamiento con el uso indiscriminado de antibióticos previo a la toma de muestras (Martínez-Boné, 2004). Otros relacionan los fallos con una inadecuada técnica de recogida y remisión de las muestras al laboratorio, dada la labilidad de algunas bacterias como *N. meningitidis*, además, lo vinculan con la escasa sensibilidad que tienen algunos de los métodos microbiológicos disponibles (Costa, 2006).

La obtención de microorganismos viables es fundamental para el trabajo de los laboratorios de referencia, estos requieren de una remisión en condiciones adecuadas. En este sentido, hay que recordar la labilidad y difícil preservación de *N. meningitidis*. Además, los subcultivos frecuentes y el almacenamiento prolongado pueden conducir a una pérdida de su viabilidad y virulencia, así como ocasionar también cambios en sus propiedades antigénicas (Martínez *et al.*, 2003). La remisión constituye un obstáculo a vencer cuando se necesita la recuperación óptima de este microorganismo. Para lograr este propósito, se requieren métodos y medios de cultivo que garanticen su viabilidad, actividad que

adquiere mayor relevancia, cuando las cepas se remiten a lugares distantes (Ajello *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1998; Martínez *et al.*, 2004). La remisión de *N. meningitidis* al LNRNP en condiciones óptimas, forma parte de la vigilancia epidemiológica de la EM y contribuye al conocimiento, identificación y caracterización de los aislamientos obtenidos en la comunidad.

V.2 Fuente de los aislamientos recibidos en el LNRNP

El diagnóstico de certeza y la confirmación de la EM se basa en el aislamiento de *N. meningitidis* a partir de líquidos biológicos (LCR, sangre, líquido sinovial, pleural o pericárdico, entre otros) (Quintana *et al.*, 1999), las dos primeras muestras son las más investigadas. La punción lumbar y el análisis del LCR constituyen el procedimiento más importante para el diagnóstico de los casos con sospecha clínica de meningitis, siempre y cuando no represente ningún riesgo para la seguridad del paciente.

El resultado de este trabajo se correspondió con los descritos en la literatura. El grupo SIREVA (Sistema Regional de Vigilancia en las Américas, en América Latina y el Caribe), identifican los mayores porcentajes de aislamientos de *N. meningitidis* a partir del cultivo de LCR (78,7%), cifras inferiores refieren para el hemocultivo (19,9%) y las petequias (1,4%) (Gabastou *et al.*, 2008). Mientras que, Panchón y López (1998), así como Costa (2006), en España, refieren entre 60 y 80%, respectivamente de positividad en los cultivos de LCR.

Los hemocultivos son de una importancia capital no solo porque establecen con certeza el diagnóstico etiológico, sino también porque la identificación del microorganismo causal y el estudio de su sensibilidad a los antimicrobianos permite elegir el tratamiento más eficaz. Por ello, el diagnóstico de las bacteriemias, con un adecuado procesamiento de los hemocultivos debe ser una actividad prioritaria en los laboratorios de microbiología clínica. La positividad de esta muestra está muy vinculada al tratamiento previo con antimicrobianos. Bohr *et al.*, 1983 refieren 90% de positividad en pacientes sin tratamiento previo.

Las petequias representan microémbolos con bacterias presentes en la lesión y constituyen muestras útiles para el aislamiento y cultivo de *N. meningitidis*. A partir del raspado o punción de las mismas se puede practicar la tinción de Gram y el cultivo, con buenos resultados, sobre todo en los pacientes sin tratamiento antimicrobiano previo. Brines (1998), en España, detecta 80% de positividad a partir de pacientes con lesiones purpúricas. No se encontró en la literatura consultada ningún trabajo sobre la utilidad de esta muestra en Cuba; pero el número limitado de cepas remitidas al LNRNP, pudiera estar relacionado a que pocos laboratorios toman en cuenta la posibilidad de aislamientos a partir de esta muestra, a pesar de que la literatura describe un alto porcentaje de pacientes (75%) con manifestaciones purpúricas (Fauci *et al.*, 2008).

V. 3 Distribución de serogrupos y serosubtipos en las cepas estudiadas

El diagnóstico microbiológico de la EM es fundamental para la detección de los cambios y las tendencias epidemiológicas, así como la aparición de resistencia a los antimicrobianos en las cepas circulantes. Los procedimientos microbiológicos clásicos tienen especial importancia para el manejo clínico del paciente, mientras que las nuevas técnicas de microbiología molecular son fundamentales para la detección y la caracterización de nuevos brotes epidémicos. (Codina *et al.*, 2011). Frasch *et al.*, 1985, basado en la integración de esquemas previos, proponen un sistema único para la clasificación fenotípica de *N. meningitidis*, utilizando un diseño semejante al sistema OKH empleado para *Escherichia Coli*. En ese sistema, el serogrupo está dado por las diferencias antigénicas del PC; el serotipo por las diferencias de las PME de clase 2/3; el subtipo por las PME de clase 1 y el inmunotipo por las diferencias antigénicas de los LPS.

El seroagrupamiento puede condicionar el comportamiento epidemiológico temporal de las cepas de *N. meningitidis*. El serogrupo B ocasiona casos esporádicos, endémicos o epidémicos con períodos interepidémicos de duración variable, asociándose con brotes prolongados en Cuba, Europa, Chile y Nueva

Zelanda, regiones donde los casos presentan una elevada morbimortalidad (Valcárcel *et al.*, 1991; Castillo *et al.*, 1994; Stephens, 2007; Caugant, 2009; Ibarz-Pavón *et al.*, 2011).

Mientras que, el serogrupo C se vincula con brotes y ondas epidémicas no perdurables. Este serogrupo provoca brotes locales en Estados Unidos, Canadá y Europa Occidental (Rouphael y Stephens, 2012). Por otro lado, *N. meningitidis* A se relaciona con grandes epidemias, sobre todo en el "cinturón de la meningitis", zona del continente africano que abarca 21 países y que se extiende desde Senegal hasta Etiopía. En esa región se notifican también desde 2002, brotes por el serogrupo X en Níger y Ghana (Boisier *et al.*, 2007). Es en el "cinturón de la meningitis" donde ocurren los mayores brotes de EM del mundo. La epidemiología molecular y el análisis genético sugieren que el serogrupo A es su principal agente etiológico, aunque los serogrupos C, W-135 y X están también involucrados; entre los años 2000-2002, *N. meningitidis* W-135 provoca brotes de EM asociados al peregrinaje de los musulmanes a La Meca (Ragunathan *et al.*, 2006; Lemos *et al.*, 2010).

En este trabajo, la casi totalidad de la cepas pertenecieron al serogrupo B y el C se identificó en un caso. El serogrupo B aumenta a partir de la década de los años 90 en las Américas, Europa y Asia. En América, se notifican brotes o epidemias en Cuba, Estados Unidos, Brasil, Chile, Argentina y Uruguay, entre otros (Castillo *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1998; González de Aledo *et al.*, 2004; Vázquez, 2006; Chiavetta *et al.*, 2007; Gabastou *et al.*, 2008; Climent *et al.*, 2010; Ibarz-Pavón *et al.*, 2011). Ibarz-Pavón *et al.*, 2012, en 4 735 aislamientos de *N. meningitidis* notificados por 19 países latinoamericanos y caribeños entre 2006 a 2010 describen el predominio del serogrupo C en Brasil; el B prevalece en el Cono Sur; mientras que, en los países andinos como México, Centro América y la región del Caribe circulan los serogrupos B, C y Y.

En Europa, el serogrupo B se identifica en España, Francia, Australia, Noruega, República Checa y Nueva Zelanda, entre otros. En este último, ocasiona una

epidemia con una morbimortalidad elevada, que motiva al igual que en Cuba, el desarrollo de una vacuna hecha a la medida a partir de la cepa responsable (B: 4:P1.7b, 4) de esa epidemia (Martin *et al.*, 1998; Tapsall, 2008). España, identifica un alto porcentaje del serogrupo B (80 - 90%) desde finales de los años 70 (Vázquez, 2006) y en la República Checa, observan también el ascenso del serogrupo C, asociado a un complejo clonal virulento (Kris, 2004).

En Cuba, durante la epidemia de EM, *N. meningitidis* B se aísla en 93,6% de las cepas investigadas, seguido por el C (3,6%) (Valcárcel *et al.*, 1991). El predominio del serogrupo B detectado en este trabajo se correspondió con los resultados descritos con anterioridad por Martínez *et al.*, 2006, quienes en 728 cepas de *N. meningitidis* correspondientes a enfermos y portadores (1982-2002) de dos etapas diferentes: epidémica y posepidémica, detectan durante la epidemia, un predominio del serogrupo B en enfermos (96,77%) y portadores (67,30%). Sin embargo, en la etapa posepidémica, todas las cepas invasivas son serogrupo B (100%), pero en los portadores predominan las NA (70,77%) (Martínez *et al.*, 2006^a; Martínez *et al.*, 2006^b). Un predominio del serogrupo B describen también Climent *et al.*, 2010 (96,60%), así como Pérez *et al.*, 2010^a.

Un porcentaje inferior del serogrupo B (36,65%) observan Jorgensen *et al.*, 2005, en 442 cepas aisladas en Estados Unidos y regiones de Europa, América, Asia y Australia. Es también inferior (69%) la cifra notificada por Gabastou *et al.*, 2008, en 6 955 aislamientos de casos invasivos en América Latina y el Caribe. Mientras que, Canadá, refiere en 552 aislamientos invasivos, a los serogrupos B (34,6%), C (50%), Y (11,1%) y W-135 (4,2%) (Tsang *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2006), resultados que no se correspondieron con los de este trabajo.

Aunque en esta investigación, el número de cepas del serogrupo C fue mínimo, este serogrupo es un importante agente causal de EM en diversas regiones del mundo (Tsang *et al.*, 2004; Kris, 2004; Vázquez 2006; Gabastou *et al.*, 2008; Roupheal y Stephens, 2012). Respecto al mismo, el autor de esta tesis considera su hallazgo como una importante señal de alerta epidemiológica, ya que cepas del

serogrupo C no se notificaban en Cuba desde la etapa epidémica (Martínez *et al.*, 2006^b); aunque, Pérez *et al.*, 2010^a, en 314 aislamientos de *N. meningitidis* investigados desde 1989 hasta 2006, describen una cepa aislada en el año 2001, pero obtenida de un paciente extranjero.

Al igual que en este trabajo, Climent *et al.*, 2010, detectan en 69 cepas invasivas aisladas entre 1983-1988 y pertenecientes a la etapa previa a la vacunación con VA-MENGOC-BC[®], un bajo porcentaje del serogrupo C (1,43%). Comportamiento diferente describen Chavietta *et al.*, 2007, en Argentina, entre 2 244 cepas invasivas, donde 65% son serogrupo C. Mientras que, para América Latina y el Caribe, Gabastou *et al.*, 2008, señalan 25,7%. Ambos porcentajes muy superiores al de este trabajo. La baja frecuencia del serogrupo C en Cuba, pudiera asociarse a la inmunización sostenida que se realiza con VA-MENGOC-BC[®] desde 1989. Esta vacuna muestra su seguridad y efectividad para controlar brotes de EM causados por *N. meningitidis* de los serogrupos B y C (Sotolongo *et al.*, 2007).

Otra situación presenta África, donde las epidemias son tradicionalmente ocasionadas por el serogrupo A, pero en los últimos años se asocian también al W-135 (Ibarz-Pavón *et al.*, 2011). En el primer trimestre de 2004, Burkina Faso notifica 2 783 casos y 527 fallecidos, ocasionados por los serogrupos A y W-135 (Ahmad, 2004; Mueller *et al.*, 2007; Shingal *et al.*, 2007 ratifican al serogrupo A como el principal agente causal de meningitis en África y Asia. En este último continente, Taiwán, detecta hasta el año 2000, una prevalencia de los serogrupos B y W-135. Sin embargo, los serogrupos A, C y Y, ascienden a partir de 2001-2002 en los casos invasivos (Chiou *et al.*, 2006).

En este trabajo no se identificaron cepas del serogrupo Y; sin embargo, en las últimas décadas se observa su incremento en varias regiones (Estados Unidos, Corea, Italia, Colombia y Finlandia, entre otros) (Agudelo *et al.* 2008). El serogrupo Y, se asocia con frecuencia a neumonía meningocócica primaria y emerge como el agente etiológico más frecuente de EM en algunas regiones de Estados Unidos

(Bae yKang., 2008; Fazio *et al.*, 2009; Rentero y Romero, 2011; Ibarz-Pavón *et al.*, 2012; Fazio *et al.*, 2009).

En estos últimos años, se describen cepas de *N. meningitidis* que intercambian el material genético responsable de la producción del PC y acarrear cambios del serogrupo B al C o viceversa, esta sustitución ocurre tras las campañas de inmunización masivas con vacunas que inducen una protección serogrupo específica y convierten esta situación en un importante mecanismo de virulencia, pues las nuevas cepas circulantes mantienen el potencial epidémico de las precursoras (Alcalá *et al.*, 2004; Vázquez, 2006).

En este trabajo no se identificaron cepas NA, ya que en las muestras donde hubo reacciones de aglutinación dudosa se realizó PCR para definir el serogrupo. El resultado obtenido corroboró la importancia de contar con esta herramienta, ya que la caracterización molecular brindó un diagnóstico preciso. De no haber podido realizar PCR a las muestras con una aglutinación dudosa, las cepas se hubieran clasificado como NA. Múltiples autores recomiendan y aplican este método sobre todo para el diagnóstico de *N. meningitidis* a partir de muestras clínicas en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo. (Hoang *et al.*, 2005; Climent *et al.*, 2010). Sin embargo, los aislamientos NA son frecuentes entre las cepas de portadores estudiadas en Cuba (Martínez *et al.*, 2006^a). Está documentado que alrededor de 50% de las cepas de portadores pierden su cápsula, clasificándose como NA. Además, al ser *N. meningitidis* naturalmente transformable, se facilita el intercambio genético entre estos microorganismos, dando lugar, en ocasiones, a que cepas de un determinado serogrupo expresen otro a través de los procesos de recombinación genética que afectan al complejo génico implicado en la expresión del PC. Esta estructura, importante factor de virulencia y fundamental en la patogénesis de la EM, está vinculada con la invasividad, por la presencia de un complejo de genes que codifican los factores necesarios para la expresión del serogrupo (Hoang *et al.*, 2005). Claus *et al.*, 2005, demuestran que cuando una cepa pierde el operón *cps*, esta región es

reemplazada por otra no codificante denominada “*capsule null locus*” (locus nulo de la cápsula, *cnl*). Las cepas no capsuladas se asocian principalmente con el estado de portador (Hoang *et al.*, 2005).

Entre las cepas de *N. meningitidis* se describen más de 20 serotipos y 11 subtipos. La vigilancia continua de la distribución en serotipos y subtipos de *N. meningitidis* constituye un elemento crucial frente a la perspectiva de las vacunas basadas en PME. Las proteínas de clase 1, actúan también como porinas y la mayoría de las cepas aisladas de casos invasivos las expresan, aunque con valores variables.

Al igual que en este trabajo, Martínez *et al.*, 2006^b describen el predominio del serotipo 4 en cepas invasivas correspondientes a la etapa epidémica (85,66%) y posepidémica (88%). Mientras que, el porcentaje de cepas NT identificadas en portadores fue inferior en la etapa epidémica (6,45%) y posepidémica (5,33%). Climent *et al.*, 2010, señala al serotipo 4 (93,88%), con un porcentaje superior al de este trabajo. Sin embargo, para Núñez *et al.*, 2006, en el estudio longitudinal de portadores realizado a una población militar de Ciudad de La Habana, el porcentaje de cepas NT es muy elevado (79%), con solo 10% de aislamientos pertenecientes al serotipo 4. Difieren también de este trabajo, los serotipos encontrados por Valdés *et al.*, 2008, en portadores adolescentes de un Politécnico de Oficios de Ciego de Ávila, donde las cepas NT (53,1%) superan las de esta tesis, seguidas por los serotipos 15 y 4, ambos con un porcentaje de 21,9%.

El serotipo 4 predomina también en cepas invasivas de Nueva Zelanda (Martin *et al.*, 1998) y España, donde a principios de los años 90, predomina el serotipo 2b entre las cepas del serogrupo C, pero a partir del año 2000, la mayoría de los aislamientos invasivos son del serotipo 2a. La situación es diferente entre las cepas de serogrupo B, donde en los últimos 15 años, el serotipo 4 se identifica entre 30-40% (Vázquez, 2006).

En Argentina, Chiavetta *et al.*, 2007, al analizar 2 244 aislamientos de casos invasivos recuperados entre 1993-2005, detectan los siguientes serotipos: 15 (220

cepas), 4 (207 cepas), NT (146 cepas) y 2b (142 cepas). Cabe destacar que el número de cepas pertenecientes al serotipo 15 en este trabajo fue muy bajo y no se observó al serotipo 2b. El serotipo 15 se asocia a 69% de los casos identificados en un brote de EM por *N. meningitidis* B ocurrido en Oregón, Estados Unidos (Diermayer *et al.*, 1999). También en Italia señalan su incremento (Mastrantonio *et al.*, 2003). Por otro lado, en 552 cepas investigadas en Canadá por Tsang *et al.*, 2004, entre 1999-2000, predominan los serotipos 2c y 14, resultados que difieren de los obtenidos en este trabajo.

Es de destacar la presencia del serotipo 2a en la cepa correspondiente al serogrupo C detectado en este trabajo, serotipo no descrito anteriormente en Cuba (Martínez *et al.*, 2006^a; Núñez *et al.*, 2006; Valdés *et al.*, 2008; Climent *et al.*, 2010). Sin embargo, Chiavetta *et al.*, 2007, en Argentina, lo detectan en casos invasivos del serogrupo C, correspondientes al período de 1993-2005; aunque, al compararlo con el serogrupo B, el C muestra una menor variabilidad y una prevalencia del serotipo 2b durante los 13 años que duró el estudio, alcanzando 68% del total de los aislamientos serogrupo C investigados.

En el período que abarcó este estudio hubo heterogeneidad en la distribución de los subtipos, aunque los más frecuentes fueron: P1.15, P1.19 y las cepas NST.

Estos resultados no se correspondieron con los identificados en Argentina por Chiavetta *et al.*, 2007, quienes señalan un alto porcentaje de cepas NST (52,8%), relacionando su resultado a la limitada capacidad de serotipificación que ofrecen los métodos convencionales. Se sugiere la utilización de métodos alternativos como la secuenciación de las regiones variables del gen *porA*. Su secuenciación permite conocer la expresión de las tres regiones variables (RV1, RV2, RV3). Las dos primeras son las de mayor polimorfismo y constituyen la base para la subtipificación de *N. meningitidis* (Climent *et al.*, 2010).

Los subtipos más frecuentes del serogrupo B detectados por Chiavetta *et al.*, 2007 se agrupan en dos períodos, el primero abarca desde 1993 a 1999, destacándose los subtipos P1.10; P1.7,16; P1.15 y P1.14; mientras que, entre 2000-2005

prevalecen: P1.7,16; P1.14 y P1.15, con una marcada disminución del P1.10, resultados que difieren de los identificados en este trabajo. No hubo tampoco correspondencia entre este trabajo y los descritos por Sacchi *et al.*, 2001, en Brasil, donde prevalecen los subtipos P1.19,15 (66%) y P1.7,16 (4%).

El subtipo P1.19,15, predomina entre las cepas invasivas estudiadas por Climent *et al.*, 2010 y Martínez *et al.*, 2006^b, con 82,99 y 78,32%, respectivamente. No obstante, en los estudios de portadores realizados en Cuba predominan las cepas NST, así lo describen Núñez *et al.*, 2006 (36,0%), Valdés *et al.*, 2008 (31,2%) y Martínez *et al.*, 2006^a (29,31%), resultados que difieren de los obtenidos en este trabajo.

Se observó una gran diversidad fenotípica entre las cepas del serogrupo B, con un franco predominio del B:4:P1.15, resultado que coincidió con el de Pérez *et al.*, 2010^a, quienes en 202 cepas lo identifican en 64,3%. También, González de Aledo *et al.*, 2004, al analizar 79 cepas serogrupo B obtenidas de casos invasivos, en Cantabria, España, entre 1998 y 2003, refieren su predominio (67,8%), aunque señalan otras combinaciones detectadas en este estudio B: NT:P1.15 (6,3%) y B:2a:P1.5 (2,5%). Por otro lado, Lemos *et al.*, 2006, en Brasil, observan un franco predominio del fenotipo B: 4:P1.15 en cepas invasivas.

El resultado de esta tesis no coincidió con los trabajos de Martínez *et al.*, 2006^b, ni de Climent *et al.*, 2010, ambos declaran un predominio del fenotipo B:4:P1.19,15, con 66,69 y 82,99%, respectivamente. Mientras que, entre portadores de la etapa endémica, Martínez *et al.*, 2006^a refieren la prevalencia de cepas NA:NT:P1.NST (22,12%), detectando al fenotipo B:4:P1.19,15 (40,08%) como el más frecuente entre portadores del periodo epidémico, cifra que disminuye de forma significativa en la etapa posepidémica, descenso que pudiera vincularse a cambios en la circulación de cepas tras la inmunización sistemática con VA-MENGOC-BC[®].

Debido a la pobre inmunogenicidad del PC del serogrupo B, las estrategias de vacunación contra este serogrupo se dirigen a la obtención de vacunas compuestas por antígenos no capsulares, de ahí la importancia de la

caracterización de las PME. Las PorA y PorB, inducen la formación de anticuerpos bactericidas protectores que demuestran su efectividad en ensayos clínicos (Frasch, 1995). VA-MENGOC-BC[®], constituye un ejemplo de vacuna compuesta por PME y gracias a su obtención y aplicación sistemática, la EM no representa un problema de salud para Cuba (Pérez *et al.*, 2003).

Difieren también de esta trabajo los resultados obtenidos por Tapsall *et al.*, 2008, en Australia, donde en 1 279 aislamientos destacan a los fenotipos B:15. P1.7 y B:4:P1.4, no identificados en este trabajo.

En este trabajo se detectó al fenotipo B:2a:P1.5, en un bajo porcentaje. Es de destacar que este fenotipo no está descrito con anterioridad en Cuba (Martínez *et al.*, 2006^b; Núñez *et al.*, 2006; Valdés *et al.*, 2008; Climent *et al.*, 2010). Cepas pertenecientes al mismo emergen en España durante el año 2001, tras una epidemia por cepas C:2b:P1.5,2 que obliga a la aplicación de la vacuna A-C en las Comunidades Autónomas. La situación existente hizo pensar en un posible evento de “switching” (cambio) capsular, suceso que se presenta después de programas masivos de vacunación, capaces de provocar protección serogrupo específica (Alcalá *et al.*, 2004; Vázquez *et al.*, 2006, Castilla, 2009).

Entre los fenotipos detectados es este trabajo, solo uno perteneció al serogrupo C (C:2a:P1.5), un fenotipo hipervirulento en varias regiones (España, Canadá, Italia y Australia, entre otros) (Vázquez, 2006; Law *et al.*, 2006; Tapsall *et al.*, 2008; Fazio *et al.*, 2009. En Canadá, Tsang *et al.*, 2004 lo notifican en un brote de Edmonton (1999-2001). Las cepas C:2a se asocian también a casos invasivos entre jóvenes asiduos a las discotecas. Suecia, Australia, Argentina y Estados Unidos, notifican brotes de “disco fever”. La mayoría de los aislamientos se corresponden con los fenotipos C:2a:P1.5,2; C:2a:P1.5 y C:2a: P1.NST (Riesbeck *et al.*, 2000).

No se correspondieron con este trabajo los fenotipos detectados en Italia, donde señalan el ascenso de cepas B: 15:P1.4; C:2a:P1.5 y C:2b:P1.5, en 343 aislamientos de casos invasivos (Mastrantonio *et al.*, 2003); mientras que, en

Uruguay predominan las cepas B:4:P1.19,15, B:4:P1.16 y B:4:P1.7 (Pirez *et al.*, 2004). Tampoco se identificaron en este estudio los fenotipos epidémicos de Noruega (B: 15:P1.7,16), Chile (B:15: P1.3) ni Nueva Zelanda (B:4:P1.4) (Castillo *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 1998; Caugant, 2008).

Al comparar los fenotipos observados en este estudio, con los descritos en Cuba entre cepas perteneciente al serogrupo C, no hubo correspondencia con los resultados de Climent *al al.*, (2010), quienes detectan bajos porcentajes de los fenotipos C:NT:P1.15 (2,04%) y C:4:P1.19 (1,36), en 167 cepas invasivas. Mientras que, Martínez *et al.*, 2006^b), no detectan cepas del serogrupo C durante la etapa posepidémica.

V. 4 Susceptibilidad antimicrobiana

Si importantes son los esfuerzos destinados a identificar las cepas de *N. meningitidis* aisladas de enfermos y portadores, relevantes y necesarios son también los encaminados a vigilar su comportamiento frente a los fármacos empleados en la quimioprofilaxis y el tratamiento de la EM (Vázquez, 2007)

En estos momentos, el aumento de la resistencia constituye una amenaza para la salud pública mundial y *N. meningitidis* no escapa a esta problemática. La interpretación de los resultados del laboratorio, la determinación de los puntos de corte que pudieran predecir fallos terapéuticos, así como la definición de los niveles de susceptibilidad en cepas obtenidas de muestras clínicas (mediante el empleo de métodos moleculares), son puntos críticos para continuar la vigilancia de la resistencia de *N. meningitidis* a los antimicrobianos, aunque esto constituye aún un tópico controversial (Vázquez, 2007; Taha *et al.*, 2007).

N. meningitidis no es muy eficiente para desarrollar resistencia a los antimicrobianos, excepto para la resistencia a las sulfonamidas, presente en más de 25% de las cepas, Este microorganismo mantiene una sensibilidad aceptable frente a los antimicrobianos utilizados para el tratamiento y la quimioprofilaxis de la EM (Vázquez *et al.*, 2007).

En estos momentos, las sulfonamidas no se utilizan para el tratamiento ni la profilaxis de la EM, pero su estudio se mantiene, porque desde el punto de vista epidemiológico aporta datos importantes. Está bien documentado que las cepas invasivas y epidemiogénicas muestran porcentajes elevados de resistencia a estos fármacos. Desde 1937, momento de su introducción para el tratamiento de la EM, la mortalidad disminuye. Sin embargo, desde 1963, la emergencia de cepas resistentes, conduce a cambios en la terapéutica y profilaxis de la EM (Vázquez, 2007). Los rangos de resistencia oscilan desde 6,35 hasta 100%. Esta resistencia y el predominio de cepas sensibles a la rifampicina, justifica su abandono y la búsqueda de nuevos fármacos (minociclina, espiramicina, ofloxacina, rifampicina, ceftriaxona y ciprofloxacina).

Este trabajo detectó un porcentaje elevado de cepas resistentes al cotrimoxazol. La resistencia a las sulfonamidas se señala en Cuba desde la etapa epidémica, confirmándose en 83,3 y 93,9% de los aislamientos recuperados de enfermos y portadores, respectivamente. Esto hace que, desde 1983, se selecciona a la rifampicina como quimioprofiláctico (Valcárcel *et al.*, 1991). Estudios posteriores confirman su efectividad y persiste como la alternativa más aceptable hasta estos momentos Martínez *et al.*, 2000; Valdés *et al.*, 2008; Arreaza *et al.*, 2000, en Galicia, detectan resistencia a las sulfonamidas (entre 86-92%), en cepas de portadores; sin embargo, estas exhiben una sensibilidad elevada a la rifampicina, la ciprofloxacina y la ceftriaxona. Ercis *et al.*, 2005, en Ankara, Turquía, identifican también resistencia a las sulfonamidas (54,4%), con 100% de sensibilidad a la rifampicina; mientras que, en Portugal, 47,3% de 118 aislamientos clínicos son resistentes a la sulfadiacina (Ferreira *et al.*, 2006). Porcentaje elevado al cotrimoxazol refieren Shabani y Siam 2009, y en Egipto (Thuling *et al.*, 2009), este último trabajo detecta 94% de resistencia al cotrimoxazol al estudiar cepas aisladas en 18 países africanos.

En esta tesis no se detectaron cepas resistentes a la rifampicina, pero para algunos la resistencia oscila entre 0-27% y la atribuyen a mutaciones en el gen

rpoB o variaciones en la permeabilidad de la membrana externa (Stefanelli *et al.*, 2001). En España, se describe una elevada sensibilidad (96,2%), aunque durante 1989-1992, detectan tres cepas con una CMI de 2 mg/L (SI), aisladas de casos clínicos. Otros refieren fallos en la prevención de la EM y en la reducción del número de portadores, responsabilizando a las cepas resistentes como las responsables de brotes (Pérez *et al.*, 2011). Uno de esos brotes se notifica en Uruguay y al igual que en este trabajo se utiliza el E-test. Los aislamientos obtenidos se corresponden al fenotipo B:2a:P1.5, asociación ausente en la colección de 408 cepas de *N. meningitidis* aisladas durante los últimos 10 años. Los aislamientos resistentes compartían un pulsotipo único, diferente al de otros dos aislamientos resistentes a la rifampicina (obtenidos en 2003 y 2007). Por lo tanto, ambos eventos de transmisión se debían a una única cepa resistente a la rifampicina, que podría haberse introducido al país desde otras regiones o haberse originado por un cambio del serogrupo C al B, como producto de la presión selectiva ejercida por vacunas administradas a la población (Pérez *et al.*, 2011).

A pesar del interés sobre la existencia de cepas resistentes a la rifampicina, su frecuencia es aún baja. Se sugiere que la propagación de la resistencia entre *N. meningitidis* no parece ser un mecanismo fácil de desarrollar. Se plantea que los cambios en el gen *rpoB* generan cepas resistentes a la rifampicina pero estas, por razones no bien comprendidas, no sobreviven con facilidad. Otro factor que podría dar respuesta a estos niveles bajos de resistencia, se relaciona con la baja presión selectiva al mismo, ya que la rifampicina no se utiliza usualmente en la comunidad, por estar reservada para tratamientos muy específicos.

Al analizar a la ciprofloxacina, cabe destacar que este fármaco constituye una buena alternativa como quimioproláctico y aunque la sensibilidad de *N. meningitidis* es aún elevada, estudios recientes informan cepas con SI o resistentes. Hasta 2008, aislamientos con SI se notifican en Grecia, Francia, Australia, España, Argentina, La India, Israel y Estados Unidos, entre otros (Shinghal *et al.*, 2007; CDC, 2008; Skoczynska *et al.*, 2008). La mayoría

pertenecen a los serogrupos A, B, C y Y. Los mecanismos de resistencia implicados en las quinolonas son tres: 1. Modificación enzimática de las subunidades de la ADN-girasa, considerado como el principal, y se debe a la aparición de mutaciones en los genes que codifican para estas subunidades; 2. Alteración de la permeabilidad de las porinas, por mutaciones en los genes que codifican para estos poros, probablemente debido a una alteración de los LPS de la pared, impidiéndose la entrada de estos compuestos dentro de la bacteria y 3. Aumento de la expulsión del antibiótico mediante bombas de flujo. A este mecanismo de expulsión activa se le concede cada vez más importancia. Varios de estos mecanismos pueden coexistir en la misma bacteria (Hooper y Rubinstein, 2003). El excesivo empleo de las quinolonas en las infecciones de la comunidad, particularmente en infecciones respiratorias agudas y sepsis urinarias, pudieran producir una fuerte presión selectiva para esta particular resistencia (Corso *et al.*, 2005; Vázquez, 2007).

En esta tesis no se detectaron cepas con SI, aunque hubo un porcentaje bajo de cepas con CMI dentro del rango de resistentes ($\geq 0,12 \mu\text{g/mL}$). Difieren de este trabajo, los resultados descritos en Cuba por Martínez *et al.*, 2000 y Valdés *et al.*, 2008, todos refieren 100% de sensibilidad a este fármaco. También, en un estudio realizado en Suecia por Hedberg *et al.*, 2010, en 717 cepas obtenidas entre 1995-2008, detectan 100% de sensibilidad a la ciprofloxacina.

Otro antimicrobiano investigado en esta tesis fue la ceftriaxona, una cefalosporina de tercera generación eficaz para el tratamiento de la EM y recomendada también para erradicar el estado de portador (Antignac *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos se correspondieron con los descritos por, Martínez *et al.*, 2000 y Valdés *et al.*, 2008. En la literatura consultada no se encontró ningún artículo que notificara el hallazgo de cepas con SI o resistentes a este fármaco.

Respecto al cloranfenicol, la mayoría de las cepas estudiadas fueron sensibles, muy pocas mostraron SI o resistencia. Sin embargo, desde 1951, fecha que marca el inicio de su aplicación para el tratamiento de la EM, describen sus efectos

secundarios, lo que junto a la detección de cepas resistentes en Francia y Vietnam (CMI > 64mg/L), por producción de cloranfenicol acetiltransferasa, hace que algunos países desarrollados no lo utilicen e inclusive alertan sobre la posible emergencia de cepas con características similares (Oppenheim, 1997; Galimand *et al.*, 1998; Shultz *et al.*, 2005). No obstante, por motivos económicos es una buena alternativa de tratamiento en el “cinturón de la meningitis” y en España, constituye una opción para los pacientes alérgicos a los β -lactámicos.

En África, donde el cloranfenicol constituye el tratamiento de elección, la mayoría de las cepas resistentes son del serogrupo A y los aislamientos de Francia y Vietnam pertenecen al serogrupo B. En Túnez, al estudiar 29 cepas invasivas aisladas entre 1998 y 2004, 8,7% son resistentes al cloranfenicol (Saguer *et al.*, 2006). Estudios realizados en Cuba, muestran 100% de sensibilidad frente a este fármaco. (Valdés *et al.*, 2008). A pesar de la resistencia descrita, se recomienda y justifica su vigilancia sistemática en las áreas donde lo aplican para el tratamiento y en aquellas regiones que notifican cepas con altos niveles de resistencia (Oppenheim *et al.*, 1997; Galimand *et al.*, 1998; Shultz *et al.*, 2000; Vázquez, 2007).

La penicilina, descrita por Fleming en 1929, se generaliza 20 años después y tras 70 años de uso clínico, es muy utilizada en la atención médica primaria y en los centros hospitalarios. Por su escasa toxicidad, sustituye a la sulfadiacina sódica para el tratamiento de la EM y suministrada a altas dosis, es 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 SI a la penicilina, representa un problema creciente y universal en el mundo. Cepas con estas características se notifican en España, Portugal, Francia, Italia, Inglaterra, Grecia, Australia, Bélgica, Canadá, Suecia, Argentina y Estados Unidos, entre otras (Arreaza *et al.*, 2000; Stefanelli *et al.*, 2004; Tapsall *et al.*, 2008). Las cepas con SI a la penicilina se deben, en parte, a una disminución de su afinidad por la PBP2. Este descenso se encuentra también en *Neisserias* saprofitas y los

estudios de genética atribuyen su aparición a procesos de recombinación que sustituyen partes del gen *penA* de la PBP por las regiones correspondientes de este gen en *Neisserias* comensales (Stefanelli *et al.*, 2001). Por otro lado, la resistencia a la penicilina mediada por β -lactamasa es rara y se señala en casos muy aislados.

En esta tesis predominaron las cepas sensibles a la penicilina, aunque hubo aislamientos con SI y cepas resistentes. Otros trabajos realizados en Cuba con cepas de enfermos señalan una situación similar respecto a la SI, pero no señalan resistencia. (Martínez 2004), al analizar 283 aislamientos (enfermos y portadores), señala un ascenso significativo de las cepas con SI: 3,07-20,32%, respectivamente describen SI a la penicilina entre 111 aislamientos del período 1993-1999. Dentro de ellas, 35 cepas (31,5%) muestran SI, todas del serogrupo B y el fenotipo más frecuente corresponde al B: 4:P1.15 (77,5%).

Los resultados de este trabajo respecto a las cepas con SI a la penicilina no se correspondió con el descrito por Bertrand *et al.*, 2012, quienes en 1 933 aislamientos detectan 15,31% de cepas con estas características. Tampoco coincidió con Brown *et al.*, 2010, en Canadá, con 21,7% de SI en 363 cepas. Mientras que, en América Latina y el Caribe, Gabastoud *et al.*, 2008, así como Ibarz-Pavón *et al.*, 2012, señalan cifras de SI superiores a las de esta tesis (34,1 y 29,1%), respectivamente. Porcentajes más elevados (71%) describen en Egipto (Klena *et al.*, 2012).

En España Arreaza *et al.*, 2000, al investigar 901 aislamientos de enfermos y portadores (112 de enfermos y 789 de portadores), identifican SI a la penicilina en 55,3 y 39,0%, respectivamente, ambos porcentajes superiores a los de esta tesis. Se encontraron cepas resistentes a la penicilina, aunque cabe señalar que aislamientos con estas características no están descritos anteriormente en Cuba (Martínez *et al.*, 2004, Valdés *et al.*, 2008), situación que pudiera estar relacionada con la aplicación del nuevo punto de corte para este antimicrobiano (CMI \geq 0,5 μ g/mL), vigente y recomendado por el CLSI (2012).

Las cepas de *N. meningitidis* resistentes a la penicilina son pocas y se vinculan a la producción de β -lactamasa adquirida a través de plásmidos de resistencia de *Neisserias* comensales, incluso de *N. gonorrhoeae* (Dillon *et al.*, 1983). Sin embargo, recientemente, Gabastoud *et al.*, 2008 describen 0,2% de cepas resistentes. También Ibarz-Pavón *et al.*, 2012, detectan resistencia a la penicilina en cinco aislamientos, cuatro pertenecen a Uruguay y uno a México. Por otro lado, Abeysuriya *et al.*, 2010 notifican en Australia, un caso de bacteriemia por *N. meningitidis* serogrupo B resistente a este fármaco.

Después de analizar los diferentes informes relacionados con el comportamiento de *N. meningitidis* frente a la penicilina es importante señalar que no existe una uniformidad de criterios respecto a los puntos de cortes específicos para este microorganismo, esta situación hace que en algunos casos se dificulta el cálculo de las cifras reales de resistencia. (Vázquez 2007), resalta la heterogeneidad de métodos realizados y los puntos de cortes establecidos para definir esta resistencia, lo que dificulta la comparación de los datos obtenidos entre los diferentes países. Por ejemplo, los métodos recomendados son el método de microdilución con catión ajustado en AMH, más sangre de caballo lisada o el método de dilución en AMH con 5% de sangre de carnero, así como el E-test, este último muy utilizado en Europa, donde se demuestra un alto nivel de concordancia de las CMI cuando se compara con el método de dilución en agar (Vázquez, 2007).

A pesar de que existen aislamientos de *N. meningitidis* con SI a la penicilina, algunos señalan que su administración a altas dosis, constituye un tratamiento válido para los casos invasivos. 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 la CMI al 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 (Vázquez., 2007).

Por la emergencia de cepas con SI a la penicilina algunos 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 modifican el tratamiento empírico de esta enfermedad y sustituyen la penicilina por las cefalosporinas, β -lactámicos que penetran con facilidad el sistema nervioso central. Además, a esta justificación añaden el hecho de que el tratamiento con penicilina no erradica el estado de portador de *N. meningitidis*, algo que sí logran las cefalosporinas. De esa forma, prescinden de la administración de otros antimicrobianos para erradicar los portadores (Arreaza *et al.*, 2000).

Se puede 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 misma 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.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos garantizan una información microbiológica-epidemiológica oportuna, aportan datos a la prevención y control exitoso de la enfermedad meningocócica y permiten demostrar el impacto y la vigencia de la inmunización con VA-MENGOC-BC®.
- Se corrobora el predominio del fenotipo B:4:P1.19 y B:4:P1.15. La detección por primera vez en Cuba del fenotipo C:2a:P1.5, notificado como epidemiogénico en otras regiones del mundo, ratifica la necesidad del seguimiento de las cepas de *N. meningitidis* como sistema de alerta ante el aumento de un determinado perfil antigénico.
- La resistencia al cotrimoxazol está en correspondencia con los resultados descritos en la literatura. La resistencia a otros antimicrobianos (penicilina, cloranfenicol y ciprofloxacina), alertan sobre la posibilidad de que este comportamiento se convierta en un problema creciente en Cuba. Sin embargo, el predominio de cepas sensibles a la penicilina confirma que este fármaco se mantiene como tratamiento de elección para la enfermedad meningocócica

RECOMENDACIONES

VII. RECOMENDACIONES

- Mantener los estudios de los marcadores fenotípicos e Incorporar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias Patógenas el estudio de los marcadores genotípicos de cepas de *N. meningitidis*, con el fin de identificar la circulación de nuevos clones virulentos.
- Insistir en el fortalecimiento y mejoramiento del actual Sistema de Vigilancia Nacional de las Meningitis Bacterianas en aras de garantizar el diagnóstico adecuado de la enfermedad meningocócica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdillahi H, Poolman JT. Whole-cell ELISA for typing *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies. *FEMS Microbiol Lett* 1987; 48: 367-71.
- Abeysuriya SD, Speers DJ, Gardiner J, Murray RJ. Penicillin-resistant *Neisseria meningitidis* bacteraemia, Kimberley region. *Commun Dis Intell* 2010; 34(3):342-4.
- Agudelo CI, Sanabria OM, Ovalle MV. Serogroup Y meningococcal disease, Colombia. *Emerg Infect Dis* 2008. <http://www.cdc.gov/eid/content/14/6/990.htm>.
- Ahmad K. Vaccination halts meningitis outbreak in Burkina Faso. *Lancet* 2004; 363:1290.
- Alcalá B, Salcedo C, de la Fuente L, Arreaza L, Uría MJ, Abad R, *et al.* *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to ciprofloxacin: first report in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53:409.
- 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.
- Almeida L, Franco C, Fernández L, Santos J. Enfermedad por meningococo, *Neisseria meningitidis*: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. *Salud Pública Mex* 2004; 46(5):438-50.
- 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.
- Apicella M. *Neisseria meningitidis*. En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, eds. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Vol. II. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone Publishers; 2005. Pp. 2498-513.

- Aspholm M, Aas FE, Harrison OB, Quinn D, Vik A, Viburiene R, *et al.* Structural alterations in a component of cytochrome c oxidase and molecular evolution of pathogenic *Neisseria* in humans. PLoS Pathog 2010; 19; 6(8).
- Arreaza L, de la Fuente L, Vázquez J. Antibiotic susceptibility patterns of *Neisseria meningitidis* isolates from patients and asymptomatic carriers. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1705-1707.
- Badolo O, Tiendrebeogo E, Novak R, Wu H, Djingarey M; Diomande F, *et al.* Surveillance of meningococcal disease in Burkina Faso; Proceedings of the 16th International Pathogenic *Neisseria* Meeting; Rotterdam, Netherlands 2008; 7(12): 234.
- Bae SM, Kang YH. Serological and genetic characterization of meningococcal isolates in Korea. Jpn J Infect Dis. 2008; 61(6):434-7.
- Barreiro G, Alonso J, Casanova A, de la Prieta R, Aguirre C. Infección meningocócica. Medicine 2002; 8(6):3520-27.
- Bertrand S, Carion F, Wintjens R, Mathys V, Vanhoof R. Evolutionary changes in antimicrobial resistance of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in Belgium during the period 2000-2010: Increasing prevalence of penicillin-non-susceptibility. Antimicrob Agents Chemother 2012; 30.
- Bilukha O, Rosenstein N. National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevention and control of meningococcal disease. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR Recomm Rep 2005; 54(7):1–21.
- Bohr V, Rasmussen N, Hansen B, Khersem H, Jessen O, Johnsen N *et al.* 875 cases of bacterial meningitis: diagnostic procedures and the impact of preadmission antibiotic therapy. J Infect 1983 7(3):193-202.
- Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Taha M, Jeanne I, Boubacar H, *et al.* Meningococcal meningitis: unprecedented incidence of serogroup X–related cases in 2006 in Niger. Clin Infect Dis 2007;44:657-63.

- Borrow R, Miller E. Development of vaccines. Surrogates of protection. *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management.* Edited by M. Frosch and M.C. J. Maiden. Copyright © 2006 WILEY.
- Bos M, Tefsen B, Geurtsen J, Tommassen J. Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(25):9417-22.
- Botha P. Penicillin resistant *Neisseria meningitidis* in Southern Africa. *Lancet* 1988; 1:54-55.
- Bourdoulous S, Nassif X. Mechanisms of Attachment and Invasion. In: Frosch M, Maiden MCJ, editors. *Handbook of Meningococcal Disease.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; Weinheim, Germany: 2006. p. 257-72.
- Brandtzaeg P, van Deuren M. Classification and pathogenesis of meningococcal infections. *Methods Mol Biol* 2012; 799:21-35.
- Brandtzaeg P. Pathogenesis and pathofiology of invasive meningococcal disease. *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management.* Edited by M. Frosch and M.C. J. Maiden. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p: 427-469.
- Brehony C, Joley K, Maiden M. Multilocus sequence typing for global surveillance of meningococcal disease. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:15-26.
- Brines J, Asensi F, Hernández R, Codoñer P, Diez J, Costa I et al. Cambios significativos de las meningitis bacterianas de los 90. XX Congreso Español Extraordinario de Pediatría. Málaga, Junio de 1998. Libro de Actas. Tomo II. p. 228-230.
- Brown EM, Fisman DN, Drews SJ, Dolman S, Rawte P, Brown S, Jamieson F. Epidemiology of invasive meningococcal disease with decreased

- susceptibility to penicillin in Ontario, Canada, 2000 to 2006. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):1016-21.
- Buckee C, Recker M, Watkins E, Gupta S. Role of stochastic processes in maintaining discrete strain structure in antigenically diverse pathogen populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(37):15504-9.
 - Castilla S, Vazquez J, Salcedo C, García M, García J, Irure J, Torroba L, *et al.* B: 2a:P1.5 Meningococcal Strains Likely Arisen from Capsular witching Event Still Spreading in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47(2):463–465.
 - 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 DA. Genetics and evolution of *Neisseria meningitidis*: importance for the epidemiology of meningococcal disease. *Infect Genet Evol* 2008; 8(5):558-65.
 - Caugant DA, Tzanakaki G, Kriz P. Lessons from meningococcal carriage studies. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:52-63.
 - Caugant DA, Maiden MC. Meningococcal carriage and disease--population biology and evolution. *Vaccine* 2009; 27(2):64-70.
 - Cartwright D. Historical aspects. *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management.* Edited by M. Frosch and M.C. J. Maiden. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p: 1-13.
 - Cardeñosa N. Quimioprofilaxis de la enfermedad meningocócica. Publicado en *Vacunas* 2006; 7(3):126-30.
 - Centers for Disease Control and Prevention Emergence of fluoroquinolone-resistant *Neisseria meningitidis*—Minnesota and North Dakota, 2007–2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2008; 57:173–5.

- Costa I. Estudio clínico y microbiológico de las meningitis en la edad pediátrica en el Hospital Universitario de Valencia, Tesis Doctorado 2006.
- Codina MG, de Cueto M, Vicente D, Echevarría JE, Prats G. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011;29 (2):127-34.
- Chiavetta L, Ruzic A, Mollerach M, Regueira M. Vigilancia de *Neisseria meningitidis* en Argentina, 1993-2005: distribución de serogrupos, serotipos y serosubtipos causantes de enfermedad invasiva. *Rev Argentina Microbiología* 2007 1(39): 21-27.
- Chiou C, Liao J, Liao T, Li C, Chou C, Chang H, Yao S, Lee Y. Molecular epidemiology and emergence of worldwide epidemic clones of *Neisseria meningitidis* in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2006; 6(15): 25.
- Chu Y, Cheung T, Tung V, Tiu F, Lo J, Lam R, *et al.* A blood isolate of *Neisseria meningitidis* showing reduced susceptibility to quinolones in Hong Kong. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:94–5.
- Claus H, Maiden MC, Wilson DJ, McCarthy ND, Jolley KA, Urwin R, *et al.* Genetic analysis of meningococci carried by children and young adults. *J Infect Dis* 2005;15: 1263-71.
- Climent Y, Urwin R, Yero D, Martinez I, Martín A, Sotolongo F, Maiden M, *et al.* The genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in Cuba before and after the introduction of a serogroup BC vaccine. *Infect Genet Evol* 2010; 10(4):546-54.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. CLSI document M 100-S20. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.
- Corso A, Faccone D, Miranda M, Rodriguez M, Regueira M, Carranza C, *et al.* Emergence of *Neisseria meningitidis* with decreased susceptibility to ciprofloxacin in Argentina. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:596–7.

- Crawford S, Fulcher L, Glennen A, Harrington S, Swenson J, Lynfield R, Murray P, *et al.* Susceptibility Testing of *Neisseria meningitidis* Isolates. *J Clin Microbiol* 2006; 44(5): 1744–1754.
- Daley AJ. Meningococcal disease. *Aust Fam Physician* 2003; 32:597-601.
- 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.
- Dillon JR, Pauze M, Yeung KH. Spread of penicillinase-producing and transfer plasmids from gonococcus to *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 1983; 1:779-81.
- Domínguez F, Menéndez J, Ochoa R. An effective serogroup B meningococcal vaccine. *Vaccine* 2006; 24:7025-6.
- du Plessis M, von Gottberg A, Cohen C, de Gouveia L, Klugman K. *Neisseria meningitidis* Intermediately Resistant to Penicillin and Causing Invasive Disease in South Africa in 2001 to 2005. *J Clin Microbiol* 2008; 46(10): 3208–3214.
- Enriquez R, Abad R, Salcedo C, Perez S, Vazquez JA. Fluoroquinolone resistance in *Neisseria meningitidis* in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61:286–90.
- Enríquez R, Abad R, Salcedo C, Vázquez J. Nalidixic Acid Disk for Laboratory Detection of Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(2): 796–797.
- Ercis S, Koseoglu O, Salmazadeh-Ahrabi, Ercis M, Akin L, Hascelik C. The prevalence of nasopharyngeal *Neisseria meningitidis* carriage, serogroup distribution and antibiotic resistance among healthy children in Cankaya municipality schools of Ankara province. *Mikrobiyol Bul* 2005;39:411-20.
- Fauci A, Braunwald E, Kasper D, Hauser S, Longo D, Jameson J, *et al.*, editors *Harrison's Principles of internal medicine*. 7ma Ed. New York:

McGraw-Hill 2008.<http://blue/bvs1/libros-folletos/harrison2008/harrisons17>.
Chm.

- Fazio C, Neri A, Tonino S, Carannante A, Caporali MG, Salmaso S, Mastrantonio P, *et al.* Characterisation of *Neisseria meningitidis* C strains causing two clusters in the north of Italy in 2007 and 2008. *Euro Surveill* 2009; 23: 14-16.
- Farron F, Cheseaux JJ, Pelet B. Meningococcémie chronique et déficit en IgA chez un adolescent. *Arch Pédiatr* 1996; 3:149-51.
- Ferreira E, Dias R, Caniça M. Antimicrobial susceptibility, serotype and genotype distribution of meningococci in Portugal, 2001–2002. *Epidemiol Infect* 2006; 134(6): 1203–1207.
- Fontanals D, Van Ezzo D, Pons I, Pineda V, Sanfeliu I, Mariscal D. Estudio de la prevalencia de portadores de *Neisseria meningitidis* en la población de Cerdanyola (Barcelona). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995; 13:398-405.
- Flores M. Artículo de revisión. *Neisseria meningitidis*: caracterización y susceptibilidad a la penicilina. Situación actual de la Enfermedad Meningocócica Enfermedades Infecciosas Farmacología .Revista Electrónica de PortalesMedicos.com. Publicado: 6/07/2009 [http://www.portalesmedicos.com./publicaciones/Articulos/Enfermedades Infecciosas/](http://www.portalesmedicos.com./publicaciones/Articulos/EnfermedadesInfecciosas/).
- Fraser A, Gafer–Gvili A, Paul M, Leibovici L. Profilactic use of antibiotics for prevention of meningococcal infections: systematic review and metanalysis of randomised trials. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005.
- Frasc C, Zollinger W, Poolman J. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and a proposed scheme for designation of serotypes. *Rev Infect Dis*. 1985; 7: 504-510.
- Frosch M, Maiden M. Handbook of Meningococcal Disease Infection Biology, Vaccination, Clinical Management. Weinheim, Germany. Ed. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.

- Gabastou J, Agudelo C, de Cunto Brandileone M, Castañeda E, Silva de Lemus A, *et al.* Caracterización de aislamientos invasivos de *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *N. meningitidis* en América Latina y el Caribe: SIREVA II, 2000-2005. *Rev Panam Salud Publica* 2008; 24 (1).
- 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. 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.
- Gray SJ, Trotter CL, Ramsay ME, Guiver M, Fox AJ, Borrow R *et al.* Epidemiology of meningococcal disease in England and Wales 1993/94 to 2003/04: contribution and experiences of the Meningococcal Reference Unit. *J Med Microbiol* 2006; 55 (7): 7 887-896.
- Goldman L, Ausiello D. Editores Cecil Medicine. 23ra ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007. Disponible en http://blue/bvs1/libros_folletos/cecil2007/cm23.chm.
- González Á, Vilorio L. Serosubtipos de meningococo B causantes de enfermedad invasiva en Cantabria y concordancia con la cepa de la vacuna cubana. Publicado en *Gac Sanit.* 2004; 18(1):45-9.
- Gorla M, de Lemos A, Quaresmab M, Vilasboasc R, Marquesd O, de Sác M, *et al.* Caracterización fenotípica y molecular de *neisseria meningitidis* del serogrupo c asociada con un brote en bahía, Brasil. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30(2):56–59.
- Hansen L, Christensen JJ, Breum L. Chronic meningococemia. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 418-9.

- Harrison L, Shutt K, Schmink S, Marsh J, Harcourt B, Wang X, *et al.* Population structure and capsular switching of invasive *Neisseria meningitidis* isolates in the pre-meningococcal conjugate vaccine era--United States, 2000-2005. *J Infect Dis* 2010 15; 201(8):1208-24.
- Harrison LH, Trotter CL, Ramsay ME. Review Global epidemiology of meningococcal disease *Vaccine*. 2009; 27(2): 51-63.
- Hannah C, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter C. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. Published Online November 12, 2010 DOI: 10.1016/S1473- 3099(10)70251-6.
- Hedberg S, Per Olcèn, Fredlund H, Unemo M. Antibiotic susceptibility of invasive *Neisseria meningitidis* isolates from 1995 to 2008 in Sweden—the meningococcal population remains susceptible. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2010; 42: 61–64.
- Hill D; Griffiths N; Borodina E; Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118(9):547-64.
- Hoang LM, Thomas E, Tyler S, Pollard AJ, Gustafson L, McNabb A, *et al.* Rapid and fatal meningococcal disease due to strain of *Neisseria meningitidis* containing *capsule null locus*. *Clin Infect Dis*. 2005; 40:38-42.
- Hooper DC, Rubinstein E. Mechanisms of quinolone resistance. *Quinolone antimicrobial agents*. 3rd ed. Washington: American Society for Microbiology Press; 2003. p. 41.
- Holst J, Martín D, Arnold R, Huergo CC, Oster P, O'Hallahan J, *et al.* Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009; 27 Suppl 2:3-12.
- Ibarz-Pavón, MacLennan J, Andrews N, Gray S, Urwin R, Clarke S, Walker A *et al.* Changes in Serogroup and Genotype Prevalence Among Carried Meningococci in the United Kingdom During Vaccine Implementation *The Journal of Infectious Diseases* 2011;204:1046–53.

- Ibarz-Pavón A, Morais L, Sigaúque B, Mandomando I, Bassat Q, Nhacolo A, Quintó L, Soriano M, Alonso PL, Roca A. Epidemiology, molecular characterization and antibiotic resistance of *Neisseria meningitidis* from patients ≤15 years in Manhíça, rural Mozambique. *PLoS One* 2011; 6(6):19717.
- Ibarz-Pavón A, Lemos A, Gorla M, Regueira M, SIREVA II Working Group, *et al.* Laboratory-Based Surveillance of *Neisseria meningitidis* Isolates from Disease Cases in Latin American and Caribbean Countries, SIREVA II 2006–2010. *PLoS ONE* 2012; 7(8): e44102. doi:10.1371/journal.pone.0044102.
- Jolley KA, Gray SJ, Suker J, Urwin R. Methods for typing of meningococci. *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management.* Edited by M. Frosch and M.C. J. Maiden. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p: 37-51.
- Jones A, Georg M, Maudsdotter L, Jonsson A. Endotoxin, Capsule, and Bacterial Attachment Contribute to *Neisseria meningitidis* Resistance to the Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Journal of bacteriology* 2009 ;191(12): 3861–3868 .
- Jordens Z, Williams J, Jones G, Heckels J. Detection of Meningococcal Carriage by Culture and PCR of Throat Swabs and Mouth Gargles. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(1):175–79.
- Jorgensen J, Crawford S, Fiebelkorn K. Susceptibility of *Neisseria meningitidis* to 16 antimicrobial agents and characterization of resistance mechanisms affecting some agents. *J Clin Microbiol* 2005; 43:3162-3171.
- Jorgensen J. Multilaboratory Evaluation of Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing of *Neisseria meningitidis* Isolates .*J Clin Microbiol.* 2006 May; 44(5): 1744–1754.
- Klena JD, Wasfy MO, Nada RA, Ahmed SF, Maksoud MA, Marfin A, Pimentel G. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates from Egypt

- using multilocus sequence typing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012;106(5):309-14.
- Kris P. La vigilancia de las infecciones invasivas meningocócicas en la República Checa. *Euro Surveill* 2004; 9(11):37-9
 - Kugelberg E, Gollan B, Farrance C, Bratcher H, Lucidarme J. The Influence of IS1301 in the Capsule Biosynthesis Locus on Meningococcal Carriage and Disease. *PLoS ONE* 2010; 5(2): 9413.
 - Lappann M, Vogel U. Biofilm formation by the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Med Microbiol Immunol* 2010; 199(3):173-83.
 - Law D, Lorange M, Ringuette L, Dion M, Henderson A, Stoltz J, Zollinger W, *et al.* Invasive Meningococcal Disease in Quebec, Canada, Due to an Emerging Clone of ST-269 Serogroup B Meningococci with Serotype Antigen 17 and Serosubtype Antigen P1.19 (B:17:P1.19) *Journal of clinical Microbiology* 2006; 44(8): 2743–2749.
 - Lee H, Harrison MD. The Epidemiology of Meningococcal Disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2010 1; 50: 2-37.
 - Lemos A, Brandao A, Gorla M, Paiva M, Simonsen V. Melles CEA. Phenotypic characterization of *Neisseria meningitidis* strains isolated from invasive disease from Brazil from 1990 to 2001. *J Med Microbiol* 2006; 55:751-7.
 - Lemos A, Harrison L, Lenser M, Sacchi C. Phenotypic and molecular characterization of invasive serogroup W135 *Neisseria meningitidis* strains from 1990 to 2005 in Brazil. *J Infect* 2010;60(3):209-17.
 - Lepe J, Aznar J. Antibiótico y resistencia antibiótica en la quimioprofilaxis de la enfermedad meningocócica. *Salud y Ciencia* 2009; 17 (1):17-19.
 - Lepe J, Salcedo C, Alcalá B, Vázquez J. Evolución de la sensibilidad de *Neisseria meningitidis* a diversos antimicrobianos en el curso de intervenciones con quimioprofilaxis durante un brote epidémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24(10):608-12.

- Lin L, Ayala P, Larson J, Mulks, M, Fukuda M, Carisson S, *et al* The *Neisseria* type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol Microbiol* 1997; 24: 1083-1094.
- Livorsi D, Stenehjem E, Stephens D. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib. Microbiol* 2011; 17:31-47.
- MacFaddin. Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica. 3ª edición. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2006. P.236-253.
- Manchanda V, Gupta S, Bhalla P. Meningococcal disease: History, epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, antimicrobial susceptibility and prevention. *Indian J Med Microbiol* 2006; 24:7-19.
- Martínez I, García D, Sotolongo F, Gutiérrez M, Matute I, Núñez N, *et al*. Susceptibilidad a agentes antimicrobianos de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas en portadores. *Vaccimonitor* 2000; 9(2): 7-13.
- Martínez-Boné M. Estudio descriptivo de 101 casos de meningitis bacterianas (1986-2000). *Acta Pediatr Esp* 2004; 62: 401-408.
- Martínez I. *Neisseria meningitidis*: Contribución al transporte-conservación y caracterización de cepas aisladas en Cuba (1982-1992). Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Médicas. Instituto Finlay. Ciudad de La Habana, 2004.
- Martínez I, Sierra G, Núñez N, Izquierdo L, Climen Y, Mirabal M. Caracterización fenotípica de cepas invasivas de *Neisseria meningitidis* aisladas en Cuba durante 20 años *VacciMonitor 2006^a*; 15(1).
- Martínez I, Sierra G, Núñez N, Izquierdo L, Climent Y, Mirabal M. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores en Cuba durante 20 años. *Rev Cubana Med Trop* 2006^b; 58(2):12-16.

- Martínez I, López O, Sotolongo F, Mirabal M, Bencomo A. Portadores de *Neisseria meningitidis* en niños de una escuela primaria. REV cubana med trop 2003; 55(3):162-8.
- 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.
- 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.
- Memish ZA, Alrajhi AA. Meningococcal disease. Saudi Med J 2002; 23:259-64.
- 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.
- Mueller J, Sangaré L, Njanpop B, Tarnagda Z, Traoré Y, Yaro S, *et al.* Molecular Characteristics and Epidemiology of Meningococcal Carriage, Burkina Faso, 2003. Emerging Infectious Diseases 2007• www.cdc.gov/eid • Vol. 13, No. 6.
- Muhamed T, Zarantonelli M, Neri A, Enriquez R, Vázquez J, Stefanelli P. Interlaboratory Comparison of PCR-Based Methods for Detection of Penicillin G Susceptibility in *Neisseria meningitides*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(3): 887–892.
- Nakayama A, Takahashi H, Ohkusa K, Yamanaka K, Shintani C, Hayakawa S, *et al.* A case of sepsis and meningitis caused by probable travel-related *Neisseria meningitidis* serogroup B infection: the first report of *N. meningitidis* ST-4893 in Japan. Jpn J Infect Dis 2011; 64(1):61-2.
- Nassif, X. Interactions between encapsulated *Neisseria meningitidis* and host cells. Internatl Microbiol 1999; 2: 133-136.

- Neri A, Mignogna G, Fazio C, Giorgi A, Schininà M, Stefanelli P. *Neisseria meningitidis* rifampicin resistant strains: analysis of protein differentially expressed. BMC Microbiol 2010; 10: 246.
- Núñez N, Martínez I, Izquierdo L, Mirabal M, Sierra G. Prevalence and dynamics of asymptomatic carriers of *Neisseria meningitidis* in university students at a military school in the City of Havana Rev. Panam Infectol 2006; 8(1):9-17.
- Ochoa R, Sierra G, Martínez I, Cuevas I. Prevención de la Enfermedad Meningocócica Serie monográfica .Cuba .Ciudad de la Habana .Ediciones Finlay. Instituto Finlay.2010.
- OMS .Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública en el mundo en desarrollo. Medicina y laboratorio 2009; (15) 3-4.
- Oppenheim BA. Antibiotic resistance in *Neisseria meningitidis*. Clin Infect Dis 1997; 24:98-101.
- Ortiz PL, Pérez AE, Rivero A, León N, Díaz M, Pérez A. Assessment of Human vulnerability to climate variability and change in Cuba. Environmental Health Perspectives. 2006; 114:1942-9.
- Panchón J, López. Meningitis y otras infecciones del Sistema Nervioso Central. En: Garcia-Rodriguez JA, Picazo JJ (Eds). Microbiología Médica (II). Microbiología Clínica. Madrid. Harcourt Brace. 1998. p. 195-211.
- Pollard AJ, Nadel S. Course of disease and clinical management. *Handbook of Meningococcal Disease. Infection Biology, Vaccination, Clinical Management*. Edited by M. Frosch and M.C. J. Maiden. Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. p: 481-507.
- Pedersen M, Pedersen D, Pedersen M, Penkowa M. Review *Neisseria meningitidis*. The pathophysiological role of lipopolysaccharides in

- association with meningococcal disease and septic shock. *Ugeskr Laeger*. 2008; 170(6):421-6.
- Pérez 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.
 - Pérez A, Dickinson F, Llanes R. Invasive Meningococcal Disease. Cuba, 1983- 2006. *VacciMonitor 2010^a*; 19 (3).
 - Pérez A, Dickinson F, Rodríguez M. Community acquired bacterial meningitis in Cuba: a follow up of a decade. *BMC Infectious Diseases* 2010^b; 10:130. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/130/prepub>.
 - Pérez G, García Gabarrot G, Alfonso A, Pujadas M, Camou T. Detección de cepas de *Neisseria meningitidis* resistentes a rifampicina en el Uruguay. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(6):540–4.
 - Pérez A, Rodríguez M, Toledo I, Molina N, de la Fuente L, Abad Y, *et al*. Connotación de la Meningitis Bacteriana sin especificar agente en la población cubana, 1998-2007. Informe Científico-Técnico. IPK. 2008.
 - Perkins-Balding D, Ratliff-Griffin M, Stojiljkovic I. Iron transport systems in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68:154-71.
 - Pérez C, Picón T, Galazka J, Rubio I, Montano A, Ferrari A. Control de un brote epidémico de enfermedad meningocócica por *N. meningitidis* serogrupo B. *Rev Med Uruguay* 2004; 20.
 - Popovic T, Kin CH, Schmink, S, Ajello G. Evaluation of silica gel for transport of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 1998; 3:1765-66.
 - Quintana I, Sotolongo F, Llop A, Cuevas I, Martínez N, Velázquez JC, *et al*. Programa Nacional de Prevención y Control de los Síndromes Neurológicos Infecciosos. Habana, Cuba 1999.
 - Racloz VN, Silva JD. Artículo de revisión. Epidemiología del serogrupo B. *BMC Infectious Diseases* 2010, 10:175.

- Raghunathan PL, Jones JD, Tiendrebeogo SR, Idrissa I, Sangaré L, Kouanda S, *et al.* Predictor's immunity after a mayor serogroup W-135 meningococcal disease epidemic, Burkina Faso, 2002. *J Infect Dis* 2006; 193:607-16.
- Rainbow J, Cebelinski E, Bartkus J, Glennen A, Boxrud D, Lynfield R. Rifampin-resistant meningococcal disease. *Emerg Infect Dis* 2005; 11:977-9.
- Rentero Z, Romero M. Enfermedad meningocócica invasiva por *Neisseria meningitidis* del serogrupo Y. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2011; 29(7):550-559.
- 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 por A gene sequencing. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1638-40.
- Rodríguez M, Pérez A, Dickinson F, Toledo I, Feliciano O, Gutiérrez O. Meningitis bacteriana en Cuba, enero-junio de 2009 y 2010. Informe preliminar de los datos reportados en las encuestas recibidas. *BolIPK* 2010; 20 (39): 305.
- Rosenstein N, Perkins B, Stephens D, Popovic T, Hughes J. Meningococcal disease. *N Engl J Med* 2003, 344(18):1378-1388.
- Roupheal N, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology. *Methods Mol Biol* 2012; 799:1-20.
- Rusniok C, Vallenet D, Floquet S, Ewles H, Mouzé C, Brown D, *et al.* NeMeSys: a biological resource for narrowing the gap between sequence and function in the human pathogen *Neisseria meningitidis*. *Genome Biol* 2009; 10(10):110.
- Ryan K, Ray C, Sherris. *Microbiología Médica* (4^a ed.). McGraw Hill. (2004); 329-333.

- Saguer A, Smaoui H, Kechrid A. Phenotyping and antibiotic susceptibility's study of *Neisseria meningitidis* strains isolated at the "Hôpital d'Enfants" of Tunis. *Tunis Med* 2006; 84(11):730-3.
- Sacchi CT, Lemos AP, Popovic T, de Moraes JC, Whitney AM, Melles CE, *et al.* Serosubtypes and PorA types of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolated in Brazil during 1997-1998: Overview and implications for vaccine development. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2897-903.
- Sadarangani M, Pollard A. Serogroup B meningococcal vaccines-an unfinished story. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 112–24.
- Sáfadi M, Cintra O. Epidemiology of meningococcal disease in Latin America: current situation and opportunities for prevention. *Neurol Res* 2010; 32(3):263-71.
- Sanchén A, Rodríguez O, Torres L, Cordero M. Caracterización epidemiológica y microbiológica de las meningoencefalitis bacterianas. *Archivo Médico de Camagüey* 2010; 14(3).
- Schielke S, Frosch M, Kurzai O. Virulence determinants involved in differential host niche adaptation of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Med Microbiol Immunol.* 2010; 199(3):185-96.
- Shabani L, Siam R. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of bacterial meningitis in Egypt. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2009; 8: 26.
- Shultz T, Tapsall J, White P, Newton P. An invasive isolate of *Neisseria meningitidis* showing decreased susceptibility to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1116.
- Shultz T, White P, Tapsall J. In vitro assessment of the further potential for development of fluoroquinolones resistance in *Neisseria meningitidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1753–60
- Singhal S, Purnapatre KP, Kalia V, Dube S, Nair D, Deb M, *et al.* Ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1614–6.

- Skoczynska A, Alonso J, Muhamed T. Ciprofloxacin Resistance in *Neisseria meningitidis*, France. *Emerg Infect Dis* 2008 August; 14(8): 1322–1323.
- Sotolongo F, González N. VA-MENGOC-BC[®], una década de experiencia. *Avances Médicos de Cuba* 1999; 18:8-12.
- Sotolongo F. *Neisseria meningitidis*. Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Serie monográfica. Ciudad de la Habana: Ediciones Finlay; 1995. p. 321-324.
- Sotolongo F, Campa C, Casanueva, Fajardo E, Cuevas I, González N. Cuban Meningococcal BC Vaccine: Experiences & Contributions from 20 Years of Application. *MEDICC Review* 2007; 9, 16-22.
- Soult J, Muñoz M. Enfermedad meningocócica invasora. *An Pediatr* 2005; 62(4):297-303.
- Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, *et al*. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008; 46:155-164.
- Sperandeo P, Dehò G, Polissi A. The lipopolysaccharide transport system of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1791(7):594-602.
- 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. *Expert Rev Anti Infect Ther*. Emerging resistance in *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9(2):237-44.
- Stefanelli P. Emergence in Italy of a *Neisseria meningitidis* clone with decreased susceptibility to penicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48:3103–3106.

- Steindl G; Liu Y; Schmid D; Orendi U; Kormann A; Heuberger S. Epidemiology of invasive meningococcal disease in Austria. *Wiener Klinische Wochenschrift* 2010; 123(1): 10-14.
- Stephens D, Greenwood B, Brandtzaeg P. Epidemic meningitis, meningococemia and *Neisseria meningitidis*. *Lancet* 2007;369(9580):2196-210
- Stephens D. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009; 27(2): 71–B77.
- Stephens D. Conquering the meningococcus. *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:3-14.
- Strahilevitz J, Adler A, Smollan G, Temper V, Keller N, Block C, *et al.* Ciprofloxacin-resistant *Neisseria meningitidis*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis* 2007; 13:1614–6.
- Szeto TH, Dessen A, Pelicic V. Structure/function analysis of *Neisseria meningitidis* PilW, a conserved protein that plays multiple roles in type IV pilus biology. *Infect Immun* 2011; 79(8):3028-35.
- Taha M, Vázquez, J; Hong E, Bennett D, Bertrand S, Bukovski S, *et al.* Target Gene Sequencing to Characterize the Penicillin G Susceptibility of *Neisseria meningitides*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(8): 2784–2792.
- Tapsall J. Australian Meningococcal Surveillance Programme. Annual report of the Australian Meningococcal Surveillance Programme, 2007. *Commun Dis Intell* 2008; 32(3):299-307.
- Tsang R, Tsai C, Zhu P, Ringuette L, Lorange M, Law D. 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.

- 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 benzyl penicillin. *J Med Microbiol* 2002; 51:855-60.
- Thuling S, Fredlund H, Nicolas P, Caugant D, Olcén P, Unemo M. Antibiotic Susceptibility and Characteristics of *Neisseria meningitidis* Isolates from the African Meningitis Belt, 2000 to 2006: Phenotypic and Genotypic Perspectives. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(4): 1561–1566.
- Trivedi K, Tang C, Exley R. Mechanisms of meningococcal colonisation. *Trends Microbiol* 2011; 19(9):456-63.
- Valdés J, Martínez I, Sierra G, Camaraza M, Cuevas I, Mirabal M, *et al.* Portadores de *Neisseria meningitidis*, caracterización de las cepas aisladas y respuesta inmune basal a VA-MENGOC-BC. *VacciMonitor* 2008; 17(2).
- Valcárcel NM, Rodríguez CR, Molinert HT. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. Editorial Ciencia Médicas, Ciudad Habana, Cuba, 1991.
- 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.
- Vázquez J. Vacunas frente a meningitis bacterianas: ¿realidad o mito? *Atención Primaria* 2002; 30(10):643-47.
- Vázquez J, Berrón S. Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22:113-20.
- Vázquez J. Portadores de meningococo: un enigma a finales del siglo XX. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000; 18:352-5.
- Vázquez J. Resistance testing of meningococci: the recommendations of the European Monitoring Group of Meningococci. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; 31:97-100.

- Vázquez J. Situación actual de la epidemiología de la enfermedad meningocócica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006; 24 (1): 14 – 18.
- Vázquez J, Enríquez R, Abad R, Alcalá B, Salcedo C, Areaza L. Antibiotic resistant meningococci in Europe: any need to act? *FEMS Microbiol Rev* 2007; 31:64-70.
- Verma R, Fisher MC. Bacterial Meningitis Vaccines: Not Just for Kids. *Current Infectious Disease Reports* 2009; 11:302-8.
- Vienne P, Ducos 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. Pathogenic neisseriae: surface modulation, pathogenesis and infection control *Nature Reviews Microbiology* 2009; 7:274-286.
- Vogel U, Claus H, Frosch M. Capsular operons. *Methods Mol Med* 2001; 67:187-201.
- Vyse A, Wolter J, Chen J, Soriano M. Meningococcal disease in Asia: an under-recognized public health burden. *Epidemiol Infect* 2011; 139, 967–985.
- Weidlich L, Baethgen L, Mayer L, Moraes C, Klein C, Nunes L, *et al.* High prevalence of *Neisseria meningitidis* hypervirulent lineages and emergence of W135:P1.5, 2:ST-11 clone in Southern Brazil. *J Infect* 2008; 57(4):324-31.
- World Health Organization. The Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 12-13 December 2007. Safety of meningococcal B vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2008; 83:42-3.
- World Health Organization. Initiative for vaccine research: bacterial infections. Geneva: WHO; 2009.
- Wu H, Harcourt B, Hatcher C, Wei S, Novak R, Wang X, *et al.* Emergence of Ciprofloxacin-Resistant *Neisseria meningitidis* in North America. *J Med* 2009; 360:886-892.

- Zollinger W, Mandrell R. Type-specific antigens of group A *Neisseria meningitidis*: lipopolysaccharides and heat-modifiable outer membrane proteins. *Infect Immun* 1980; 28:451-458.

ANEXOS

Anexo 1. Flujograma para la identificación y confirmación de los aislamientos de *N.meningitidis* remitidos al LNRN-IPK, Cuba (2002-2011).

