



**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
Departamento de Bacteriología – Micología**

Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias y Helicobacter

***Neisseria meningitidis*: estudios de
amplificación de ácidos nucleicos y detección
de serogrupos en enfermos y portadores
cubanos**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MÁSTER EN
BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

AUTORA: Lic. Oderay Gutierrez González

**La Habana
2018**



**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Centro de Investigación Diagnóstico y Referencia
Departamento de Bacteriología – Micología**

Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias y Helicobacter

***Neisseria meningitidis*: estudios de
amplificación de ácidos nucleicos y detección
de serogrupos en enfermos y portadores
cubanos**

**TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MÁSTER EN
BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

AUTORA: Lic. Oderay Gutierrez González

TUTOR Dr. Rafael Llanes Caballero, MSc

ASESORES: Lic. Onelkis Feliciano Sarmiento, MSc
Dra. Isabel Martínez Motas, DrC

**La Habana
2018**

A mis dos grandes tesoros mis hijos: Abram y Adrian

Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

- *A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy.*
- *A mi esposo por su gran amor y apoyo incondicional*
- *A mis hermanas, cuñados, sobrinos y Tía por preocuparse, apoyarme en todo momento y ser parte de la familia tan maravillosa que tengo.*
- *A mis maestros por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios profesionales.*
- *Ami tutor Rafael y mi maestra asesora Isabel Martinez por su amistad y ayuda a lo largo de estos años.*
- *Al tribunal que formo parte del cumplimiento de este trabajo.*
- *A mis grandes amigos., que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora, seguimos siendo amigos Yanaika y José (pipo).*
- *A mis amigos del IPK que he molestado mucho y siempre han estado a mi lado ayudándome en todo momento Onelkis, Tati, Rosabel, Anabel , Jenny, Ana Margarita, , Odisney, Eduardito, Ana Maria, Tony, Profesor Carlos, Mayda, Nathali, Alinita,*
- *A Ruxana, Mirian, Misladis por molestarla cuando estaban trabajando.*
- *A mis otras compañeras de estudio de FATESA y de la maestría por todos los momentos felices y difíciles que pasamos juntos dándonos apoyos los unos a los otros (Misleydis, Grechen, Irina, Nathali, Daniela, Ley Fu y ZeXi tan).*

- *A Magilet y Luisito por su ayuda y el siiii en todo momento.*
- *A Islay, Angel y Ariel por soportarme y ayudarme.*
- *Al Chuchi que desde lejos se preocupó y me ayudo en la búsqueda bibliográfica*
- *A Marelys de la biblioteca por su gran ayuda desinteresada.*
- *A todo el departamento de Bacteriología-Micología por su apoyo.*
- *Al personal del tercer piso de parasitología por su ayuda cada vez que necesitaba hacer el PCR (Ana Margarita Montalvo, Xavier y otros...).*
- *A todos aquellos que con sus palabras de aliento me ayudaron a terminar este paso en mi vida, gracias.*
- *Y por ser los últimos son los primeros. A mis grandes amores mis hijos por apoyarme con un beso, una sonrisa y dame la felicidad más grande del mundo, su amor.*

.

El éxito en la vida consiste en seguir siempre adelante.

Samuel Johnson

RESUMEN

En Cuba, existen limitados estudios sobre el diagnóstico de *Neisseria meningitidis* por técnicas de amplificación de ácidos nucleicos. Se utilizaron dos sistemas de PCR a punto final y en tiempo real (rt-PCR) en líquidos cefalorraquídeos sin identificación por cultivo y en cultivos liofilizados de *Neisseria* spp. de la nasofaringe de portadores de Ciego de Ávila. La PCR a punto final que amplifica un fragmento del gen *ctrA* (523 pb) detectó cinco muestras positivas a *N. meningitidis* en 270 LCR. La rt-PCR cualitativa que amplifica el gen *sodC* de esta bacteria amplificó el ADN de la cepa de referencia de *N. meningitidis* y el de cinco muestras positivas de LCR. La PCR a punto final identificó como meningococo el 76 % de los ADN extraídos a las suspensiones celulares liofilizadas y la rt-PCR identificó el 100%. Predominó el serogrupo B de *N. meningitidis* en los LCR y en los cultivos de la nasofaringe. La identificación de este microorganismo por dos sistemas de amplificación de ADN en LCR de pacientes con meningoencefalitis bacteriana sin identificación por cultivo contribuye al fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica de esta enfermedad en Cuba. La utilidad de la rt-PCR implementada avala su futura aplicación en el país.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	2
I.1 Problema científico	5
I.2. Objetivos.....	5
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
II. 1 <i>Neisseria meningitidis</i> . Antecedentes históricos.....	7
II.2 Taxonomía y consideraciones microbiológicas de <i>N. meningitidis</i>	9
II.3 Estructura antigénica.....	11
II.4 Polisacárido capsular (PC)	11
II.5 Proteínas de la membrana externa (PME) y tipificación molecular	13
II.6 Lipopolisacárido (LOS) y fimbrias.....	14
II.7 Patogenia	15
II.8 Aspectos clínicos	15
II.9 Epidemiología	16
II.10 Diagnóstico de laboratorio.....	17
II.10.1 Pruebas convencionales	18
II.10.2 Pruebas moleculares	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
III.1 Diseño general	22
III.2 Aplicación de la prueba de PCR en muestras de LCR de pacientes con sospecha de MBAC sin confirmación diagnóstica por cultivo	22
III.2.1 Condiciones de amplificación de la PCR a punto final para el gen <i>ctrA</i> de <i>N. meningitidis</i>	22
III.3 Implementación de la rt-PCR cualitativa para el diagnóstico de <i>N. meningitidis</i> con el ADN de cepas controles, de referencia y LCR.....	23
III.3.1 Extracción del ADN	24
III.3.2 Evaluación de la concentración, calidad e integridad del ADN purificado.....	24
III.3.3 Mezcla, condiciones de amplificación e interpretación de la rt-PCR cualitativa que amplifica el gen <i>sodC</i> de <i>N. meningitidis</i>	25
III.3.4 Determinación del límite de detección	26

III.4 Aplicación de dos sistemas de PCR que amplifican el ADN de <i>N. meningitidis</i> en aislamientos de <i>Neisserias</i> spp. de portadores nasofaríngeos cubanos.....	26
III.4.1 Identificación microbiana	27
III.4.2 Prueba de aglutinación en partículas de látex para la determinación de los serogrupos	27
III.5 Determinación de serogrupos de <i>N. meningitidis</i> por PCR a punto final.....	27
III.5 Consideraciones éticas	28
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
IV.1. Identificación del fragmento de 523 pb del gen <i>ctrA</i> de <i>N. meningitidis</i> en LCR de pacientes con sospecha de MBAC sin confirmación diagnóstica por cultivo	30
IV.2 Implementación de la prueba de rt-PCR cualitativa que amplifica el gen <i>sodC</i> de <i>N. meningitidis</i> con el ADN de cepas controles, de referencia y muestras de LCR	32
IV.3 Aplicación de dos sistemas de PCR para la identificación de <i>N. meningitidis</i> a partir de aislamientos liofilizados de <i>Neisseria</i> spp. de portadores nasofaríngeos.....	36
IV.4 Determinación de los serogrupos de <i>N. meningitidis</i> a partir de muestras de LCR y de cultivos obtenidos de portadores nasofaríngeos	38
V. DISCUSIÓN GENERAL.....	42
VI. CONCLUSIONES	45
VII. RECOMENDACIONES.....	47
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

I. INTRODUCCIÓN

Neisseria meningitidis constituye uno de los principales agentes causales de meningoencefalitis bacteriana (MEB) de la comunidad y de sepsis en el mundo. Se distingue de otros microorganismos que provocan MEB por su potencial epidémico. Es un patógeno exclusivo del hombre, que puede colonizar la nasofaringe humana sin producir síntomas ni signos clínicos evidentes de enfermedad (1).

En el ámbito mundial, cada año se notifican alrededor de 500 000 a 614 000 casos de enfermedad meningocócica invasiva (EMI), con 50 000 fallecidos (2).

En Cuba, la EMI está catalogada como el principal problema de salud ocurrido durante la década de 1980, con una tasa de incidencia de $14,4 \times 10^5$ habitantes. En 1983 se notifican 1 422 enfermos, con una mortalidad de $2,1/10^5$ habitantes (212 fallecidos) (3) Esta situación epidémica conllevó al desarrollo, obtención y aplicación de la vacuna cubana antimeningocócica VA-MENGOC-BC®. Su introducción al Programa Nacional de Inmunización, controló la situación epidémica y redujo la incidencia de la EMI. En la actualidad esta enfermedad muestra incidencia de $0,1 \text{ casos} \times 10^5$ habitantes (4).

Según los datos de la vigilancia de las meningitis bacterianas adquiridas en la comunidad (MBAC), en 2011 y 2012 la confirmación diagnóstica por cultivo muestra cifras por debajo del 50 % (34,3 % y 39,3 %, respectivamente) (5, 6). En el 2013, se logra identificar el 50 % de los agentes causantes, con un predominio de *Streptococcus pneumoniae*, seguido de *N. meningitidis* y *Haemophilus influenzae* (7). Sin embargo, en el 2014-2015, el aislamiento de estos agentes muestra cifras de 45,3 % y 47,6 %, respectivamente (4, 8).

La EMI puede diagnosticarse por diferentes pruebas de laboratorio a partir de la obtención y el procesamiento de diversas muestras clínicas, entre las más comunes se encuentran el líquido cefalorraquídeo (LCR), la sangre y el material obtenido de petequias o equimosis. A partir de estas muestras se realiza el cultivo y la identificación del microorganismo, el examen directo por coloración

de Gram, la detección de antígenos específicos mediante la prueba de aglutinación con partículas de látex o la coagulación, así como la identificación molecular mediante las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, como la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final y en tiempo real (rt-PCR). Dentro de los procedimientos clásicos, la coloración de Gram del LCR es un método rápido, que precisa una concentración bacteriana mayor de 10^5 UFC/ml (unidades formadoras de colonias). La identificación de diplococos gram negativos constituye una prueba presuntiva que tiene valor en el diagnóstico etiológico. Sin embargo, su sensibilidad es del 75 % en las infecciones por *N. meningitidis* y disminuye en los pacientes que reciben tratamiento antibiótico previo. En estos casos, la detección de los antígenos bacterianos solubles es eficaz, pues permite detectar el antígeno capsular de los serogrupos A, B, C, Y y W135, sin necesidad de contar con bacterias viables. El cultivo es el método de diagnóstico microbiológico de confirmación y constituye aún el método de referencia. El aislamiento de *N. meningitidis* posibilita caracterizar las cepas circulantes, un elemento necesario para monitorear la resistencia a los antimicrobianos, el establecimiento de los datos epidemiológicos y la preparación y el desarrollo de vacunas. Los procedimientos microbiológicos clásicos (9) tienen especial importancia para el manejo clínico del paciente, mientras que las nuevas técnicas de microbiología molecular son fundamentales para la detección rápida y, sobre todo, la caracterización de cepas. Los hemocultivos son positivos en un 41 % de los casos de meningitis por meningococo, y siendo además útil debido a que los cultivos del LCR son negativos en el 20 % de los casos de MEB. Si bien el estudio microbiológico es fundamental para realizar la confirmación y notificación de los casos con una EMI, la valoración de los resultados del examen clínico, las pruebas de laboratorio clínico y los datos de la investigación epidemiológica aportan datos útiles y necesarios al diagnóstico de la enfermedad (10).

En los últimos años se han introducido tecnologías moleculares para mejorar el diagnóstico de laboratorio de la EMI y de los agentes causantes de MBAC (1). Debido a la sencillez de su ejecución y a los resultados confiables que aporta, las

pruebas de amplificación de los ácidos nucleicos tienen varias ventajas: se realizan en un corto periodo de tiempo, muestran excelente sensibilidad y especificidad, el resultado no se afecta por la administración previa de antimicrobianos al paciente; pero tienen como limitantes el requerimiento de equipos especializados y de personal calificado para su ejecución, así como el elevado costo de los insumos (11, 12).

El Laboratorio Nacional de Referencia de Neisserias y Helicobacter (LNRNH) del IPK normaliza en el año 2009, una PCR simple a punto final para el diagnóstico de *N. meningitidis* (gen *ctrA*) (13) siguiendo el protocolo descrito por de Souza y colaboradores (14) y posteriormente implementa una PCR múltiple a punto final para la detección de los tres principales agentes causales de MBAC: *S. pneumoniae* (gen *ply*), *H. influenzae* (gen *bex*) y *N. meningitidis* (gen *ctrA*) (Llanes R, datos no publicados 2015), según lo reportado por Tzanakaki y colaboradores (15). Este último es un gen conservado de meningococo que codifica para una proteína de la cápsula involucrada en la regulación de la adhesión de la bacteria a la célula blanco, amplifica una banda de 523 pb y se emplea con éxito en el diagnóstico molecular de la EMI (16). Sin embargo, el locus de la cápsula, incluyendo el gen *ctrA*, está sujeto a reordenamiento y en el 16 % o más de los meningococos aislados de la nasofaringe se demuestra la ausencia de este gen (17-19).

Por otro lado, el gen *sodC*, relacionado con la producción de la enzima superóxido-dismutasa de *N. meningitidis* mantiene su conservación, pero es menos sensible a la variación antigénica (20). No existen señalamientos sobre la ausencia del gen *sodC* en este microorganismo, ni de su hallazgo en otras especies de neisserias (20, 21). Eso sugiere su importancia para el diagnóstico de la EMI y la identificación de meningococo en los portadores nasofaríngeos, considerados la principal fuente de transmisión de *N. meningitidis* (18, 22).

En Cuba no existen trabajos publicados sobre el empleo de métodos moleculares para el diagnóstico de *N. meningitidis* en especímenes clínicos, lo que motiva la realización del presente estudio en muestras de LCR y en aislamientos de

Neisseria spp. obtenidos e identificados a partir de exudados nasofaríngeos de portadores durante la etapa de la epidemia de EMI en Cuba.

I.1 Problema científico

El gen *sodC* está presente en todos los aislamientos de *N. meningitidis* a diferencia del gen *ctrA*, por lo que puede emplearse en el diagnóstico de laboratorio del microorganismo en portadores nasofaríngeos asintomáticos y en pacientes con síntomas compatibles con la EMI.

I.2. Objetivos

1. Identificar el fragmento de 523 pb del gen *ctrA* de *N. meningitidis* en muestras de LCR de pacientes con sospecha de MBAC sin confirmación diagnóstica por cultivo.
2. Implementar la prueba de rt-PCR cualitativa que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis* con ADN de cepas controles, de referencia y LCR.
3. Aplicar dos sistemas de PCR para la identificación de meningococo en aislamientos de *Neisseria* spp. de portadores nasofaríngeos de la provincia Ciego de Ávila, recuperados entre 1988-1989.
4. Determinar el serogrupo de *N. meningitidis* en LCR y aislamientos de portadores nasofaríngeos cubanos.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. 1 *Neisseria meningitidis*. Antecedentes históricos

La EMI causada por *N. meningitidis* mantiene su importancia dentro de los problemas de salud pública en muchas regiones del mundo debido a la gravedad de las manifestaciones clínicas, así como la alta mortalidad y secuelas invalidantes que quedan en los pacientes que sobreviven. En la actualidad, la posibilidad del desarrollo de vacunas y la aplicación de nuevos métodos diagnósticos permiten una mejor comprensión de esta afección (9, 23).

La historia de la EMI refleja el desarrollo científico y tecnológico a través del tiempo. Cada avance, desde la observación microscópica temprana de *N. meningitidis* hace más de 200 años hasta el cultivo, el desarrollo y la aplicación de diferentes pruebas diagnósticas para la identificación y el perfeccionamiento de su caracterización, así como la utilización de modelos matemáticos, los estudios genéticos, y el desarrollo de las nuevas vacunas para su control mantienen la vigencia de todos los aspectos relacionados con este agente causal (23).

El primero en notificar un brote de EMI corresponde al físico inglés Tomas Willis, en el año 1684. No obstante, la historia atribuye este mérito al físico suizo Gaspar Vieusseux, quien en 1806 describe un brote de enfermedad meningocócica en Ginebra, Suiza. No es hasta 1884, que Marchiafava y Celli identifican a *N. meningitidis* como un micrococo oval dentro del citoplasma de los leucocitos, sin lograr cultivarlo. El cultivo y aislamiento de este microorganismo se logra en 1887, cuando el patólogo Anton Weichselbaum, lo recupera a partir de exudados meníngeos de casos posmortem y le nombra "*Diplococcus intracellularis meningitidis*". Se establece así la relación entre meningococo y la meningitis cerebroespinal epidémica. Luego, Albert Neisser lo denomina *N. meningitidis* después de la caracterización de *Neisseria gonorrhoeae* como patógeno (23).

Otro acontecimiento importante ocurre en 1893, cuando el físico alemán Quincke, realiza por primera vez una punción lumbar y recupera a *N. meningitidis* del LCR de pacientes con meningitis. Tres años después, en 1886, Kiefer obtiene el primer aislamiento de esta bacteria a partir de la nasofaringe. Este acontecimiento constituye un importante avance en el conocimiento de la dispersión y patogénesis de la EMI (23).

Entre 1900-1920, investigadores alemanes y norteamericanos logran el principal avance del siglo XX (1906), el primer antisuero antimeningocócico. Su obtención posibilita la aplicación del primer tratamiento racional de la EMI, basado en la inmunoterapia, con una reducción de la mortalidad en el 25 % de los casos. Se demuestra que después de la aplicación de la inmunoterapia a los animales se logra la protección contra *N. meningitidis*, lo que permite su administración a los humanos por vía intratecal. En esa etapa se desarrollan brotes importantes de EMI en el personal militar, sobre todo en los reclutas de nuevo ingreso a la I Guerra Mundial, lo que obliga a tomar medidas preventivas para lograr la reducción del estado de portador (9, 23).

La etapa comprendida entre 1921-1939, se caracteriza por brotes de EMI ocasionados por el serogrupo A, con epidemias severas en el África subsahariana. En 1935, se informa sobre la composición polisacáridica de la cápsula de meningococo y dos años después (1937), se describe a la sulfonamida como el primer fármaco terapéutico específico para la EMI. Este medicamento se convierte en el tratamiento de elección durante la II Guerra Mundial; con posterioridad, en 1940, las sulfonamidas se utilizan 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»; ese mismo año Millar y colaboradores publican la emergencia de cepas resistentes a las sulfonamidas (23). Sin embargo y desde aquel momento, la mortalidad por EMI se mantiene alta a pesar del adecuado tratamiento antimicrobiano y las actuales vacunas disponibles (24).

II.2 Taxonomía y consideraciones microbiológicas de *N. meningitidis*

La nueva clasificación de microorganismos basada en las secuencias genéticas del ARN ribosómico 16S, ubica al género *Neisseria* en la clase β del phylum Proteobacterias. Las bacterias pertenecientes a este phylum presentan una morfología, fisiología y metabolismo variables. La familia Neisseriaceae incluye a los géneros *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella*, *Bergeriella*, *Conchiformibius*, *Morococcus*, *Stenoxybacter*, *Uruburuella* y *Vitreoscilla* (CLASE I) (25).

Las especies del género *Neisseria* colonizan las membranas mucosas de los mamíferos. Entre ellas se describen aquellas capaces de colonizar al hombre: *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria subflava* (biovariedades *subflava*, *flava* y *perflava*), *Neisseria mucosa* (variedad *sicca*), *Neisseria cinerea* (biovariedad *flavescens*), *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria elongata* subespecies *elongata*, *glycolytica* y *nitroreducens*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria shayegani*, *Neisseria wadsworthii*, *N. gonorrhoeae* subespecie *kochii* (*Neisseria kochii*), endémica de Sudán con una estrecha relación fenotípica y genética con *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis*. De las especies antes mencionadas, *N. meningitidis* (meningococo) y *N. gonorrhoeae* (gonococo) son las patógenas para el hombre (25, 26).

Neisseria gonorrhoeae es siempre patógena en cualquier sitio anatómico de donde se aísla; sin embargo, *N. meningitidis* a pesar de ser el agente causal de la EMI, es capaz de colonizar la nasofaringe humana sin producir síntomas ni signos clínicos de enfermedad. Las especies de neisserias no patógenas integran la microbiota normal del tracto respiratorio superior, colonizan la nasofaringe y en determinadas ocasiones se comportan como patógenos oportunistas (27).

Neisseria meningitidis y otras especies del género *Neisseria* (excepto *N. elongata*, *Neisseria weaveri* y *Neisseria bacilliformis*, que tienen forma de bacilo), son diplococos gram negativos (0,6-0,8 μm de diámetro), con las caras

laterales adyacentes planas y cóncavas, que le dan la forma de grano de café o riñón. Son inmóviles, no esporuladas, aerobias estrictas y exigentes en sus requerimientos nutricionales. Crecen en los medios de cultivo enriquecidos, sobre todo los suplementados con sangre hemolizada. Su crecimiento óptimo lo obtienen a una temperatura entre 35-37 °C, con una atmósfera entre 5-10 % de CO₂, una humedad relativa del 50 % y un pH entre 7,2-7,4. *N. meningitidis* es un microorganismo quimioheterótrofo, productor de las enzimas citocromo-oxidasa, catalasa y gamma-glutamiltanspeptidasa (GGT) (27, 28).

En muestras estériles como el LCR, la sangre y otros líquidos biológicos, *N. meningitidis* se aísla en el medio de agar sangre. Para su recuperación a partir de sitios como la nasofaringe o la piel, se necesita la eliminación de la microbiota acompañante que incluye a las neisserias saprofitas y otras especies comensales, mediante la utilización de medios selectivos (Thayer Martin). A este medio se le adicionan antimicrobianos: colistina, nistatina, vancomicina y trimetoprim (VCNT). El crecimiento en el medio Thayer Martin constituye un método básico para la diferenciación de las neisserias patógenas y saprofitas, aunque *N. lactamica* y *N. polysaccharea* pueden crecer en este medio por su resistencia a la colistina (29).

La identificación y diferenciación de *N. meningitidis* de otras especies de neisseria se realiza a través de diferentes pruebas como la degradación de los azúcares y los perfiles enzimáticos. La producción de ácidos a partir de la glucosa y la maltosa, pero no de la lactosa, ni la sacarosa, permite su confirmación como especie. Las pruebas enzimáticas basadas en el cambio de coloración de sustratos cromogénicos por acción de las enzimas que poseen: gamma glutamil transpeptidasa (GGT), β-galactoxidasa (ONPG) y hidroxipropil aminopeptidasa (Pro-AMP) son de utilidad en la identificación rápida de las principales especies de neisserias patógenas para el hombre. Tiene especial interés la producción de la enzima GGT de forma casi exclusiva por *N. meningitidis*. Estas pruebas adicionales permiten la identificación adecuada de variantes tales como las cepas de meningococo que no producen ácido a partir

de la maltosa y que pueden identificarse de forma errónea como *N. gonorrhoeae* (30, 31).

II.3 Estructura antigénica

Neisseria meningitidis como todas las bacterias gram negativas posee una envoltura celular constituida por la cápsula polisacáridica, la pared celular (membrana externa, lipoproteínas y capa de peptidoglicano) y la membrana citoplasmática (32), insertadas en esta membrana aparecen proteínas con propiedades antigénicas (33).

Las proteínas de membrana externa de clase 2/3 (PorB) definen a los 20 serotipos de meningococo descritos, estas proteínas son mutuamente excluyentes y se expresan por números arábigos. La clase 1 (PorA) distingue a 11 subtipos, identificados con números, pero precedidos del prefijo P1 (34).

En la pared celular de *N meningitidis* se localiza el lipopolisacárido (LPS), otra de las estructuras antigénicas, que permite realizar su clasificación en 13 inmunitipos. Su identificación se hace con números arábigos, precedidos de la letra L (34, 35).

Neisseria meningitidis posee una cápsula polisacáridica que recubre la bacteria y las estructuras de la pared celular, con excepción de las fimbrias. Esta estructura es el principal determinante de patogenicidad y junto con las fimbrias, establece los contactos iniciales del microorganismo con el hospedador. Es además, una estructura hidratada que protege a la bacteria durante la transmisión aérea de persona a persona (32, 36).

II.4 Polisacárido capsular (PC)

El polisacárido capsular de *N. meningitidis* provee las bases para la agrupación de este organismo. La composición química del PC permite su clasificación antigénica en 13 serogrupos (A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K, L). Los más importantes serogrupos asociados con enfermedad en humanos son el A, B, C, Y, X y W135. Está bien documentado que los serogrupos A, B y C son los

responsables de la mayoría de los casos y brotes de EMI (37). Sin embargo, en los últimos años se notifica un aumento creciente del Y y W135. En Estados Unidos, Colombia e Israel señalan el ascenso creciente de casos producidos por el serogrupo Y. La emergencia del serogrupo W135 se identifica por primera vez en un brote ocurrido en Arabia Saudita en el año 2000, relacionado con la peregrinación realizada por los fieles musulmanes a La Meca (38).

En años posteriores, *N. meningitidis* W135 ha sido responsable de pequeños brotes en Europa y de una epidemia en Burkina Faso, con la notificación de más de 12 000 casos en el año 2002. Es por eso que, la vigilancia microbiológica de los cambios de incidencia de los serogrupos debe ser respuesta a la interrogante de que otros serogrupos no habituales aumenten o disminuyan su circulación en el futuro (39, 40).

El serogrupo parece condicionar parte del comportamiento epidemiológico temporal de las cepas de meningococo. Así, las del grupo B son casi siempre responsables de ondas epidémicas con periodos interepidémicos de duración variable, las del grupo C están más relacionadas con brotes y ondas de corta duración y las cepas del serogrupo A son las principales responsables de las grandes epidemias, que aparecen de una forma cíclica en los países subsaharianos, en el área conocida como “cinturón africano de la meningitis”. (37, 41).

La composición química del antígeno capsular del serogrupo A es un ácido N-acetil-O-acetil manosamina G-p (1-6). El polisacárido del antígeno del serogrupo B es un ácido N-acetil neuramínico (2-8), idéntico al polisacárido de *Escherichia coli* K1. Mientras que, el polisacárido C es un ácido N-acetil neuramínico O-acetil (2-9) (37, 42). La identificación y purificación de los PC de los serogrupos A, C, W135 y Y se utilizan para la producción de vacunas e inducen la formación de anticuerpos específicos (43, 44); en tanto que la cápsula del serogrupo B es poco inmunogénica y presenta reacciones cruzadas con componentes estructurales presentes en las membranas externas de las células neuronales del hospedero (34).

II.5 Proteínas de la membrana externa (PME) y tipificación molecular

Estas estructuras se reconocen desde etapas tempranas, tienen una amplia representación en *N. meningitidis* y según su peso molecular se identifican cinco clases de PME. Dos de ellas, la PorA (clase 1) y la PorB (clase 2/3) constituyen las bases para la subtipificación y serotipificación, respectivamente de este microorganismo (45, 46). Las PME PorB2 y PorB3 están codificadas por dos alelos mutuamente excluyentes del gen *porB*, cada cepa expresa en su membrana externa solo una de las dos clases. Desde el punto de vista funcional son porinas, que permiten el paso de los iones a través de la membrana celular, se expresan de forma constitutiva, y son la base del tipado de las cepas de *N. meningitidis*. En el modelo propuesto para las proteínas de clase 2/3 se predice la existencia de ocho bucles hidrofílicos expuestos en la superficie, con la observación de cuatro regiones variables (VR1, VR2, VR3 y VR4) localizadas en los bucles I, V, VI y VII. La asociación de un número restringido de serotipos con infecciones graves y el hecho de que en situaciones endémicas las cepas virulentas muestren una heterogénea distribución de serotipos, mientras que en situaciones epidémicas aparezca un serotipo como predominante, hacen de dicha variabilidad un marcador epidemiológico útil (47).

La PME PorA se expresa por la mayoría de las cepas invasivas de meningococo, con diferencias en sus niveles de expresión. El gen *porA* que controla este proceso tiene una estructura resultante de progresivos sucesos de recombinación. La secuenciación de estas proteínas permite conocer la existencia de tres regiones variables definidas como VR1, VR2 y VR3, siendo las dos primeras las que presentan un mayor grado de polimorfismo y las que constituyen la base para el serosubtipado de las cepas (48).

En la actualidad, el tipado de las cepas de *N. meningitidis* se realiza mediante el ensayo inmunoenzimático o por *dotblot*, y emplea un panel de anticuerpos monoclonales que por regla general clasifica a siete serotipos (1, 2a, 2b, 4, 14, 15, 21) y 14 serosubtipos (P1.1, P1.2, P1.3, P1.4, P1.5, P1.6, P1.7, P1.9, P1.10, P1.12, P1.13, P1.14, P1.15, P1.16). Sin embargo, entre un 30 % y 60 % de los

aislamientos son no tipables (NT) o no serosubtipables (NST), o ambas categorías a la vez (49, 50).

Las proteínas de clase 4, están conservadas y presentes en todas las cepas de meningococo. Las de clase 5 son heterogéneas e intervienen en la adherencia. Las proteínas de clase 6 son termo-modificables y se expresan en algunos meningococos del serogrupo A, pero no en los pertenecientes a los serogrupos B ni C (51).

La utilización de técnicas de biología molecular como el *multilocus sequence typing*, (MLST) y la secuenciación de los genes de meningococo *fetA* y *fHbp*, permite la identificación de complejos clonales específicos relacionados con la EMI. Estas metodologías posibilitan la evaluación de la relación genética entre los clones de meningococo, la naturaleza de sus cambios evolutivos y su potencial para causar epidemias (31, 52).

II.6 Lipopolisacárido (LOS) y fimbrias

Esta estructura de la membrana externa tiene gran importancia en la patogenia de la EMI. Su heterogeneidad sirve para la determinación de los inmunotipos. La fracción del lípido A, llamada endotoxina (en oposición a las exotoxinas bacterianas), gobierna la inducción de las citocinas inflamatorias frecuentes en esta enfermedad (53). Tanto la morbilidad como la mortalidad de la bacteriemia meningocócica tienen una relación directa proporcional con la cantidad de endotoxina meningocócica circulante. La variabilidad en su composición antigénica permite la clasificación serológica de 13 inmunotipos diferentes (54, 55).

Los pili o fimbrias son proyecciones filamentosas, compuestas por subunidades polipeptídicas repetidas, que se extienden a partir de la superficie bacteriana. Su función es promover la adhesión a las células endoteliales y epiteliales. Está establecido que las fimbrias son el principal mecanismo de adhesión de las bacterias encapsuladas (56).

II.7 Patogenia

Neisseria meningitidis es uno de los principales agentes causales de meningitis bacteriana y sepsis en el mundo (57, 58). Se adquiere por el contacto directo con las secreciones provenientes del tracto respiratorio superior de los portadores asintomáticos o de enfermos (59). Durante los períodos endémicos coloniza la mucosa nasofaríngea en porcentajes que oscilan entre el 10-35 % de la población, pero este porcentaje es más alto en los adolescentes, adultos jóvenes y las poblaciones que habitan en condiciones de hacinamiento o espacios cerrados como las residencias estudiantiles y las unidades militares (28, 60).

La información relacionada con las condiciones que influyen en el equilibrio entre la presencia asintomática y la invasión bacteriana por *N. meningitidis* no están bien argumentadas. Según la literatura consultada es probable que intervengan diversos factores. Dentro de estos se señalan: la virulencia de la cepa, el estado nutricional y la situación inmunitaria específica y no específica del hospedador, la interferencia con infecciones víricas, y los factores ambientales como la contaminación atmosférica (polvo, humo), así como las condiciones climáticas. En el «cinturón de la meningitis», las epidemias suelen presentarse durante la estación seca (desde enero hasta marzo) y finalizan con el comienzo de las lluvias (mayo-junio). En los periodos entre las grandes epidemias, estas regiones son en general, hiperendémicas para la EMI, con la presentación de pequeños brotes y numerosos casos esporádicos. En los países de clima templado, el número máximo de casos endémicos de EMI se registra durante el invierno y la primavera (16).

II.8 Aspectos clínicos

Por lo general, la meningitis y la sepsis son las formas clínicas habituales de presentación de la EMI, ambas pueden aparecer de forma aislada o al unísono en el mismo paciente (57, 61). Entre los síntomas más frecuentes se incluyen: fiebre, cefaleas, toma del estado general, petequias y erupción maculopapular (57). Casi siempre, las lesiones cutáneas aparecen en las primeras 24 horas del inicio de la fiebre. Entre el 10-20 % de los casos pueden presentar una sepsis

fulminante con púrpura, hipotensión, disfunción miocárdica y fallo multiorgánico en pocas horas (síndrome de *Waterhouse Friderichsen*), con una alta mortalidad (62, 63).

Los pacientes con meningitis sin sepsis pueden presentar cefalea, vómitos, fotofobia, rigidez de nuca, alteración variable del nivel de consciencia (desde la obnubilación hasta el coma), en los lactantes se observa la fontanela abombada y el rechazo de los alimentos (57, 64). En los casos con meningitis, la aparición de lesiones cutáneas es menos frecuente. Es preciso tener presente que, en ocasiones, la sintomatología de la EMI es inespecífica en las primeras horas y puede confundirse con un proceso infeccioso de etiología viral (65, 66). *N. meningitidis* puede ocasionar otras formas clínicas poco frecuentes (artritis séptica, neumonía, endocarditis o pericarditis, uretritis y conjuntivitis) (63).

II.9 Epidemiología

La EMI tiene una distribución mundial y afecta a personas de todas las edades, con un predominio en los niños menores de cinco años. Su patrón y frecuencia varía en los países fríos, donde presenta una incidencia anual entre 1-10/100 000 habitantes, con tasas más elevadas durante el invierno. En las poblaciones no inmunes, como los grupos con una mayor sensibilidad a enfermar (pobreza, hacinamiento) o en aquellos donde existe una influencia genética, la EMI se presenta en períodos hiperendémicos, con una incidencia de hasta 20/100 000 habitantes, asociados con la expansión de clones virulentos (24, 66, 67). El clon ET-5 (tipo electroforético 5), que incluye sobre todo a cepas del serogrupo B, ha sido responsable de brotes en Cuba, Brasil, Chile, Noruega y Estados Unidos (10, 67).

En Cuba, en el período 1916-1976 (etapa preepidémica), la EMI muestra un comportamiento endémico, con la notificación de casos esporádicos y pequeños brotes. En 1976, se describe el primer brote intradomiciliario, hecho relacionado con el inicio de la epidemia. A partir de ese momento, los casos de EMI aumentan y en 1980 el Minsap considera a esta enfermedad como el principal

problema de salud (68). El pico de la epidemia ocurre en 1983 (14,4/100 000 habitantes), pero para los menores de un año, la cifra de incidencia fue más alta (20/100 000 habitantes) (69).

La colonización nasofaríngea conduce a la EMI en una pequeña proporción de casos. El periodo de incubación se extiende entre 2 y 10 días, aunque predomina el de 3-4 días. El periodo de transmisibilidad persiste mientras *N. meningitidis* permanezca en la nasofaringe de los enfermos o portadores. El estado de portador puede prolongarse durante semanas, meses o ser intermitente.

La enfermedad producida por *N. meningitidis* afecta sobre todo a los pacientes pediátricos, con dos picos de máxima incidencia, el primero en los niños menores de 5 años (más frecuente en los menores de 1 año), y el segundo, en los adolescentes y adultos jóvenes. La letalidad oscila entre el 10-15 %, aún en los casos con un tratamiento adecuado; además, el porcentaje de secuelas (alteraciones en el desarrollo psicomotor, sordera, entre otras), se presenta entre el 10-20 % de los sobrevivientes (47).

II.10 Diagnóstico de laboratorio

La interpretación y el rigor de los resultados microbiológicos dependen en gran medida de la calidad de la toma y el procesamiento de las muestras en el laboratorio de microbiología. Conocer el tipo de muestra, el momento adecuado de su obtención, conservación, transportación y procesamiento determinan la utilidad del resultado final, siendo imprescindible que la obtención de las muestras, siempre que sea posible, se realice antes de aplicar el tratamiento antimicrobiano (70).

El diagnóstico microbiológico de la EMI se sustenta en el estudio de las muestras obtenidas del paciente sobre todo el LCR y la sangre. Otros productos patológicos útiles son el material de las petequias, el suero, la orina y el pus proveniente de cavidades cerradas (líquido articular, aspirado pericárdico). En el caso de la meningitis, el LCR constituye la muestra más representativa, este pocas veces está turbio, aunque puede variar de aspecto según la concentración

de la bacteria. Otras características son la presión alta, el aumento en el contenido de proteínas y una baja concentración de glucosa, que es consumida por el meningococo (71, 72). Las pruebas diagnósticas de esta enfermedad pueden ser convencionales y moleculares.

II.10.1 Pruebas convencionales

El principal elemento para el diagnóstico de la EMI es el análisis del LCR obtenido por punción lumbar. Si el LCR tiene un aspecto turbio o purulento no se realiza la centrifugación del mismo, se le hace coloración de Gram, con posterior observación microscópica. Esta técnica sencilla y rápida permite el diagnóstico presuntivo del agente causal en un porcentaje que varía del 60-90 % de los casos de meningitis, con una especificidad de hasta 97 %. La sensibilidad variable se correlaciona con la concentración de microorganismos presentes en el LCR (> 100,000 UFC/mL) y la siembra directa (71). Sin embargo, en la mayoría de los casos, cuando se obtiene un LCR claro u opalescente se procede de la siguiente manera: 1) el LCR se centrifuga a 1 844 xg por 20 minutos, 2) el sedimento se emplea para realizar la coloración de Gram y el cultivo 3) el sobrenadante se utiliza para las pruebas de detección de antígenos. Para la ejecución de estas pruebas, las muestras de LCR no se pueden refrigerar, deben mantenerse a 37 °C hasta su envío al laboratorio (73).

El cultivo representa la prueba de referencia para el diagnóstico de la EMI y para establecer la etiología de la meningitis bacteriana; además de permitir la caracterización microbiológica del agente causal, posibilita la determinación de los patrones de susceptibilidad de los aislamientos frente a los antimicrobianos empleados en la terapéutica y quimioprofilaxis de esta enfermedad (74). Los cultivos de *N. meningitidis* requieren la presencia de una atmósfera de CO₂ entre (5-10 %), una temperatura de incubación que oscila de 35-37 °C y medios enriquecidos con suero de ternera al 5 %. Los medios recomendados son el agar Müeller Hinton, agar chocolate, agar Thayer Martín y agar sangre. Después de una incubación durante 18-24 horas, se observan colonias transparentes, convexas, no pigmentadas, no hemolíticas y de tamaño mediano

(73). Para la identificación del agente causal se realizan las pruebas de oxidasa y catalasa (positivas) y las pruebas enzimáticas y de utilización de los azúcares (glucosa y maltosa) al 1 % en medio Cistina Trypticosa Agar (CTA) (74).

II.10.2 Pruebas moleculares

Debido a la creciente necesidad de utilizar métodos diagnósticos más rápidos, el uso de las tecnologías de amplificación de ADN en las prácticas de laboratorio ha llevado rápidamente al desarrollo de nuevos formatos de PCR, entre los que se destaca la rt-PCR, que es una modificación de la prueba de PCR clásica que identifica el ADN con mayor sensibilidad y especificidad y en menor tiempo de reacción. La principal diferencia entre los dos métodos es el hecho de que la amplificación y la detección se realizan simultáneamente en un sistema cerrado, lo que reduce el riesgo de contaminación. Además de los cebadores, el sistema incluye un tercer oligonucleótido en la reacción, conocido como sonda, que aumenta la especificidad de la prueba (28, 31)

En comparación con los métodos convencionales (cultivo, examen directo y pruebas antigénicas), las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos no están en riesgo por la pérdida de viabilidad del microorganismo, presentan una alta sensibilidad y una especificidad comparable con el cultivo; además, el uso previo de antimicrobianos por el paciente no interfiere en la obtención de sus resultados (75). Sin embargo, la producción de falsos positivos debido a la contaminación del ADN debe evitarse mediante el estricto cumplimiento de los protocolos de trabajo (31). En el ámbito mundial la tendencia general ha sido la inclusión del PCR como técnica confirmatoria para la definición de los casos de EMI, aunque en la actualidad persisten divergencias en este aspecto. Por ejemplo, en la Unión Europea y en el Reino Unido, el 25 % de los casos son confirmados solo por la PCR, mientras que en los Estados Unidos, el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) la incluye como prueba confirmatoria (76).

Las pautas para el diagnóstico de la EMI señalan, que ya sea en el ámbito regional, provincial o en las instalaciones de referencia centralizadas pueden

implementarse las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos, siempre que los resultados se obtengan con rapidez y estén disponibles en cuestión de pocas horas. Sin embargo, aunque el costo de la PCR ha disminuido, su introducción en muchos países todavía está obstaculizada por la carencia de recursos y limitaciones del personal capacitado para su implementación. Las pautas internacionales recomiendan que la PCR se utilice para la confirmación siempre que sea posible, pero sin reemplazar el cultivo (considerada la técnica de oro) para lograr la recuperación de las cepas u otras pruebas diagnósticas convencionales (31).

Por otra parte, la técnica de microarreglos de genes (*microarray* sigla en inglés) se emplea con éxito en el diagnóstico molecular de los tres principales agentes causantes de MEB: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* (77). Asimismo, la combinación de las pruebas de amplificación de ADN, como la PCR con la secuenciación de ácidos nucleicos se utiliza en la actualidad para llevar a cabo el diagnóstico de estos microorganismos, pudiéndose incluso realizar esta técnica a partir de las muestras procedentes del paciente (78)

Resulta necesario aclarar que a diferencia del diagnóstico convencional de la MEB y la bacteriemia por meningococo, las muestras clínicas empleadas en el diagnóstico molecular deben mantenerse refrigeradas, antes de su envío al laboratorio de microbiología (74).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Diseño general

Se realizó un estudio descriptivo observacional retrospectivo que abarcó dos períodos. El primer período comprendió desde enero de 2011 a diciembre de 2016, en el que se usaron muestras de LCR de enfermos con MBAC de todo el país. El segundo periodo abarcó desde septiembre de 2017 hasta febrero de 2018 y estudió aislamientos de *Neisseria* spp. de la nasofaringe de portadores asintomáticos de la provincia Ciego de Ávila, pertenecientes a la colección del LNRNH del IPK (1988-1989).

III.2 Aplicación de la prueba de PCR en muestras de LCR de pacientes con sospecha de MBAC sin confirmación diagnóstica por cultivo

Se estudiaron 270 muestras de LCR conservadas a -20°C , pertenecientes al LNRNH del IPK, que procedían de pacientes con sospecha clínica de MBAC, sin identificación por cultivo (anexo 1).

Para la extracción de ADN por el método de Chelex (75), se tomaron 100 μL de la muestra y se le agregó 300 μL del reactivo Chelex-100 al 10 % (SIGMA, EE.UU), luego se centrifugó a 10 000 $\times g$ durante 1 min y se puso en bloque térmico (Accublock, Labnet, EE.UU), a 100°C por 15 min, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se conservó a -20°C hasta su utilización.

III.2.1 Condiciones de amplificación de la PCR a punto final para el gen *ctrA* de *N. meningitidis*

La reacción de la PCR se realizó en un volumen final de 25 μL , compuesto por 0,5 μL de dNTP- Mix (10 nM), 2,5 μL de tampón 10X, 1,5 μL de MgCl_2 (25 nM), 0,5 μL de cada cebador (25 pM), 0,15 μL de *TaqDNA* polimerasa (estuche QIAGEN, Alemania) y 2,5 μL de ADN. Las secuencias de los cebadores empleados para la amplificación del gen *ctrA* fueron sentido 5'-TGCGGTGGCTGCGGTAGGT-3' y antisentido 5'-CCGGCGAGAACACAAACGACAAG-3', que amplifica un fragmento de 523 pb (14).

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador GeneQ (BIOER, China). El programa que se utilizó para la amplificación del gen *ctrA* consistió en la desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; seguido de 34 ciclos a 92 °C por 40 segundos, 56 °C durante 30 segundos y 72 °C por 20 segundos. Finalmente se realizó un paso de extensión a 72 °C durante 5 min. La reacción se mantuvo luego a 4 °C.

En cada una de las reacciones se utilizó como control positivo, el ADN extraído a la cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195 y como control negativo se empleó agua estéril, calidad PCR y libre de nucleasa (Promega, EE.UU).

La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 2 %, empleando una cámara de electroforesis submarina (Mupid One plus, Japón), a 70 V, durante 15 minutos. El producto de amplificación se detectó mediante electroforesis, siendo visualizado a través de un transluminador (Viber Loumat, Francia). La talla del producto amplificado se determinó comparándola con el marcador de peso molecular de ADN (100 pb DNA StepLadder, Promega) (14).

III.3 Implementación de la rt-PCR cualitativa para el diagnóstico de *N. meningitidis* con el ADN de cepas controles, de referencia y LCR

Se emplearon las siguientes cepas controles y de referencia: *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Haemophilus influenzae* H-33, *Streptococcus agalactiae* SptB-22, *N. meningitidis* ATCC 26195, *N. lactamica* ATCC 89494, *N. gonorrhoeae* ATCC 49226, *N. polysaccharea* ATCC 85322, *Moraxella catarrhalis* ATCC 81191, pertenecientes a la colección de cultivos del LNRNH y del Laboratorio Nacional de Referencia de Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas del IPK (anexo 1).

Las cepas controles y de referencia conservadas a -80 °C en caldo triptona-soya con glicerol al 20 % se subcultivaron en los medios de agar chocolate, agar sangre (BIOCEN, Cuba), enriquecido con 1 % de suplemento Vitox (OXOID, EE.UU) y agar Thayer Martin modificado: medio GC al que se le adicionó 10 % de sangre de carnero y los inhibidores VCNT (OXOID) con 1 % de suplemento Vitox. La

incubación de los medios se realizó a una temperatura de 36,5- 37 °C durante 18–24 horas, en una atmósfera con 5-10 % de CO₂ (1).

Como muestra clínica se utilizó 50 ADN de los 270 obtenidos a partir de los LCR (acápite III. 2), previamente identificados en el laboratorio por una PCR múltiple que detecta los tres principales agentes causantes de MBAC. Para la selección de la muestra se tomó el material genético que correspondía al 5 % de los casos de MEB que resultaron positivos a *N. meningitidis*, el 6 % de las positivos a *H. influenzae* y el 30 % de los positivos a *S. pneumoniae*, según reportes del Anuario Estadístico de Salud de Cuba (4). Para la selección de las muestras negativas, se realizó un muestreo aleatorio sistemático apoyado en el listado de los LCR y por cada 10 muestras de ADN se escogió una. Los datos de la identificación previa por PCR múltiple de estos microorganismos se tomaron de la base de datos Diagnóstico molecular de MEB del LNRNH.

III.3.1 Extracción del ADN

Para la extracción de ADN de las cepas controles y de referencia se tomó una asada de cultivo puro y joven (18-24 horas de crecimiento) en los medios selectivos anteriormente descritos y se empleó el estuche comercial *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 2).

III.3.2 Evaluación de la concentración, calidad e integridad del ADN purificado

La integridad del ADN se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 0,8 %, según lo recomendado por Sambrook y Russel (79). Para calcular la concentración de ADN se utilizó el sistema *QIAxpert* (QIAGEN) según el protocolo descrito por el fabricante.

III.3.3 Mezcla, condiciones de amplificación e interpretación de la rt-PCR cualitativa que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis*

La mezcla de la rt-PCR en un volumen final de reacción de 25 µL quedó compuesta por 7,5 µL de agua estéril calidad PCR libre de nucleasa (Promega), 12,5 µL *QuantiTectProbe* RT-PCR Master Mix (QIAGEN), 2,5 µL de ADN extraído y los cebadores (18) a una concentración final como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores y concentración final empleados para la amplificación del gen *sodC* por rt-PCR.

Designación de Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Concentración final (nM)	Talla del amplión (pb)
Nm <i>sodC</i> Dir 351	GCA CAC TTA GGT GAT TTA CCT GCA T	300	
Nm <i>sodC</i> Rev 478	CCA CCC GTG TGG ATC ATA ATA GA	600	127
Nm <i>sodC</i> Pb 387	(FAM)-CAT GAT GGC ACA GCA ACA AAT CCT GTT T-(BHQ1)	100	

Leyenda: Nm = *N. meningitidis*

Como control positivo de amplificación se utilizó el ADN extraído de la cepa de referencia de *N. meningitidis* la ATCC 26195 y como control negativo se empleó 2,5 µL de agua estéril calidad PCR libre de nucleasa (Promega). La reacción de amplificación se realizó en un equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN) con las siguientes condiciones: 2 min a 50 °C, 10 min a 95 °C, y 50 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 min a 60 °C (18).

La visualización de los resultados se realizó mediante el software RGQ versión 2.3.1.49. Para la interpretación de los mismos, se tuvo en cuenta los valores del ciclo umbral (*cycle threshold*, C_t , siglas del inglés). Aquellos valores de C_t menores de 35 se consideraron positivos y los mayores de 40 se consideraron negativos; los valores de C_t en el intervalo entre 36-40 fueron considerados equívocos. En caso de observarse resultados equívocos, se realizaron dos diluciones del ADN (1:4 y 1:10) para diluir posibles inhibidores de la reacción, que se evaluaron por

duplicado. Si el promedio C_t de la muestra diluida se ubicó por debajo de 35, se consideró como positiva; si el promedio de C_t de la muestra diluida permaneció en el rango 35-40, la muestra se consideró como negativa, según reporta Dolan (18).

III.3.4 Determinación del límite de detección

Para determinar el límite de detección se utilizó la cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195 con una concentración de ADN de $5,61 \times 10^{10}$ ng. Se realizó el protocolo descrito por Duque y colabores 2018 (80), utilizando diluciones seriadas de la muestra pura desde 10^{-3} hasta 10^{-9} . El ensayo de rt-PCR cualitativa se realizó por triplicado para determinar la menor dilución que puede detectarse en el 95 % de las réplicas, así como para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Como control negativo se utilizó 2,5 μ L de agua estéril calidad PCR libre de nucleasa (Promega) en cada uno de los ensayos.

III.4 Aplicación de dos sistemas de PCR que amplifican el ADN de *N. meningitidis* en aislamientos de *Neisserias* spp. de portadores nasofaríngeos cubanos

Se seleccionaron los aislamientos liofilizados de *Neisserias* spp. pertenecientes a la colección de cultivos del LNRNH recuperados de los exudados nasofaríngeos de portadores correspondientes a 1988-1989 de la provincia Ciego de Ávila (anexo 1). Se excluyeron las ampulas liofilizadas secas, hidratadas y de aspecto oscuro.

Las 50 ampulas liofilizadas que conformaron la muestra se reconstituyeron en 2 mL de agua destilada estéril. Un mililitro se subcultivó en los medios de agar chocolate enriquecido y agar Thayer Martin modificado (74). El otro mililitro se utilizó para realizar la extracción de ADN, siendo transferido a un vial de 1,5 mL, se centrifugó a $3\ 615 \times g$ por 5 min y al sedimento se le adicionó 180 μ L de tampón ATL. La purificación se realizó según lo descrito en el acápite III.3.1. El ADN purificado se cuantificó (acápite III. 3.2) y luego se evaluó en la prueba de PCR a punto final para la detección del gen diana *ctrA* y la rt-PCR cualitativa que detecta el gen *sodC* como se describió en los acápites (III.2.1 y III.3.3).

III.4.1 Identificación microbiana

La identificación de los aislamientos de *Neisseria* spp. se realizó mediante la ejecución de las siguientes pruebas: observación de las características morfológicas de las colonias, resultado de la coloración de Gram y los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y enzimáticas aplicadas. Se tuvieron en cuenta la positividad de las pruebas bioquímicas de oxidasa, catalasa y los resultados respecto a la utilización de los azúcares, así como los obtenidos con la aplicación de las pruebas enzimáticas de orto-nitrofenil-galactopiranosido (ONPG), hidroxiprolil-aminopeptidasa y gamma-glutamil-aminopeptidasa, empleando discos comerciales (Hardy Diagnostics, Canadá) (81). Como cepas controles de las diferentes pruebas se emplearon aquellas descritas en el acápite III.3.

III.4.2 Prueba de aglutinación en partículas de látex para la determinación de los serogrupos

La prueba de aglutinación en partículas de látex de los aislamientos identificados como *N. meningitidis* se realizó mediante la aglutinación de colonias bacterianas frente al antisuero policlonal para los serogrupos ACYW135 y el antisuero monoclonal para el serogrupo B. Se utilizó el estuche comercial *Wellcogen N. meningitidis* B/*E. coli* k1 (EE.UU), siguiendo las instrucciones del fabricante.

III.5 Determinación de serogrupos de *N. meningitidis* por PCR a punto final

La prueba de PCR se realizó a los LCR identificados como meningococo por ambos sistemas de PCR diagnósticos y a los aislamientos de esta especie que no pudieron tipificarse por aglutinación en látex. La mezcla de reacción de PCR se realizó según lo descrito en el acápite III.2.1. Se utilizó 25 pmol de cada cebador que amplifica un fragmento de los genes que codifican para los serogrupos de *N. meningitidis* (tabla 2). El programa consistió en la desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 min, la hibridación a 55 °C durante 40 segundos, seguido de 34 ciclos a 92 °C por 40 segundos y la extensión final a 72 °C por 30 segundos (82).

Tabla 2. Cebadores utilizados para la determinación de los serogrupos de *N. meningitidis*.

Designación de Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'	Talla del amplicón (pb)	Serogrupo
<i>orf-2(A)</i>	5'-CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3' 5'-CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	400	A
<i>siaD (B)</i>	5'-GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA-3' 5'-GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	450	B
<i>siaD (C)</i>	5'-TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3' 5'-CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	250	C
<i>siaD (Y)</i>	5'-CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3' 5'-CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	120	Y
<i>siaD (W)</i>	5'-CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA-3' 5'-CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	120	W135

En cada una de las reacciones se utilizó como control positivo el ADN extraído a las cepas de referencia: *N. meningitidis* 385/83 del serogrupo B (Instituto Finlay), *N. meningitidis* del Instituto Pasteur de los serogrupos A, C, Y, W135 y como control negativo se empleó agua estéril, calidad PCR y libre de nucleasa (Promega, EE.UU). La corrida electroforética y la visualización de los productos se realizó según lo descrito en el acápite (III.2.1).

III.5 Consideraciones éticas

Se cumplió con las siguientes resoluciones nacionales vigentes: Resolución No. 8 de 2000 y Resolución No. 103 CITMA, 2002 de seguridad biológica en el manejo del material biológico y Resolución No. 38 CITMA, 2006 del listado de agentes biológicos. La investigación se aprobó por el Comité de Ética Institucional del IPK (CEI-IPK 92-17).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Identificación del fragmento de 523 pb del gen *ctrA* de *N. meningitidis* en LCR de pacientes con sospecha de MBAC sin confirmación diagnóstica por cultivo

Entre 2011 y 2016 se notificaron por el subsistema de Enfermedad de declaración obligatoria (EDO) 1 981 casos de MBAC en Cuba, de ellos 1 136 no se identificaron por cultivo (57,3 %) (figura 1).

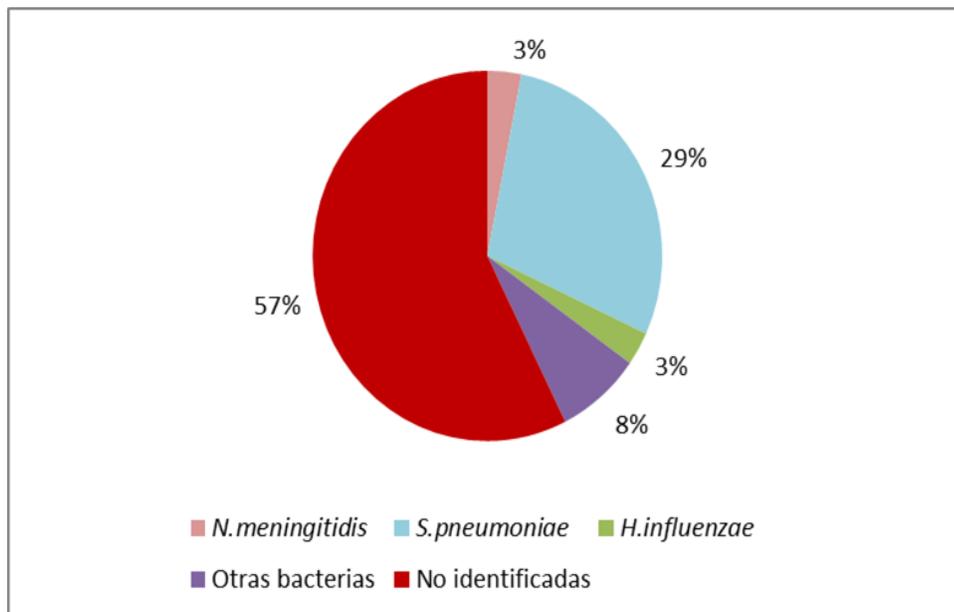


Figura 1. Notificación de meningoencefalitis de la comunidad en Cuba por el subsistema de EDO, 2011-2016. Fuente: Anuarios estadísticos (2011-2017)

A partir de una indicación de la dirección del Programa Nacional de Control de los Síndromes Neurológicos Infecciosos del MINSAP (83), los laboratorios de los Centros Provinciales de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) del país envían al LNRNH-IPK, los LCR procedentes de los casos de MBAC sin identificación del agente causal por cultivo. El objetivo de esta estrategia es identificar las principales bacterias que producen MBAC: *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae* a través de una prueba de PCR múltiple (13). De las 270 alícuotas de LCR recibidas en este laboratorio entre los años 2011 y 2016,

se produjo la amplificación del fragmento de 523 pb del gen *ctrA* correspondiente a *N. meningitidis* en cinco muestras (1,9 %) (figura 2).

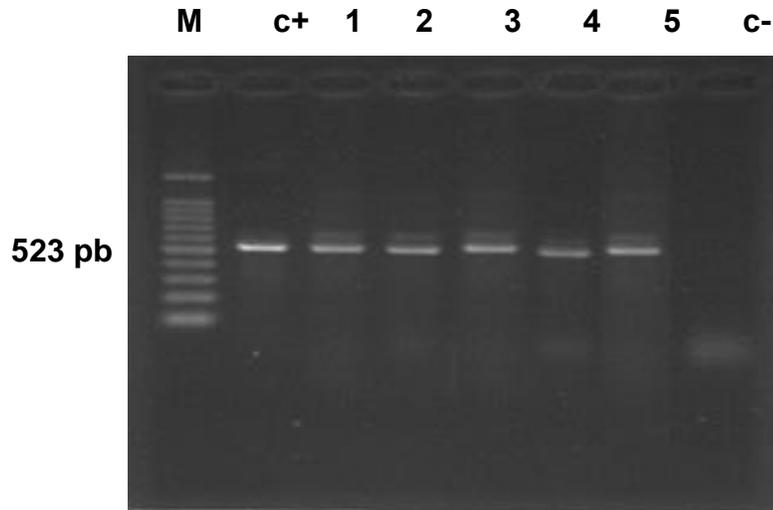


Figura 2. Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación del fragmento del gen *ctrA* (523 pb).

Leyenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; c+: control positivo ADN de cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195, carriles del 1 al 5 ADN de las muestras de LCR; c-: control negativo.

Los resultados del presente estudio contribuyen al fortalecimiento de la vigilancia nacional de las MBAC en Cuba, ya que incrementa el porcentaje de identificación de *N. meningitidis* en casos de meningitis reportados sin identificación por el cultivo. Es necesario mencionar que la vacuna antimeningocócica de producción nacional VA-MENGOC-BC® fue introducida en el Esquema Nacional de Inmunización de Cuba en 1991, lo cual ha impactado de forma positiva en la reducción del número de casos y de muertes por EMI $<0,1 \times 10^5$ habitantes (4, 84). Esto pudiera explicar el actual porcentaje de detección de *N. meningitidis* en la presente investigación.

Sachi y colaboradores, del Laboratorio Nacional de Referencia de Meningitis de Brasil, realizan una prueba de PCR en 452 muestras de LCR en pacientes con un resultado negativo o desconocido del cultivo bacteriológico, que incrementa el porcentaje de detección de *N. meningitidis* a un 87,5%, cuando se emplea en

combinación con otras pruebas convencionales como la aglutinación con partículas de látex y el examen directo (85).

IV.2 Implementación de la prueba de rt-PCR cualitativa que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis* con el ADN de cepas controles, de referencia y muestras de LCR

La implementación de la prueba de rt-PCR cualitativa que amplificó el gen *sodC* solo produjo la amplificación con el ADN de la cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195, con un rango de valor promedio de C_t de 15,19 (31 copias del genoma) (figura 3).

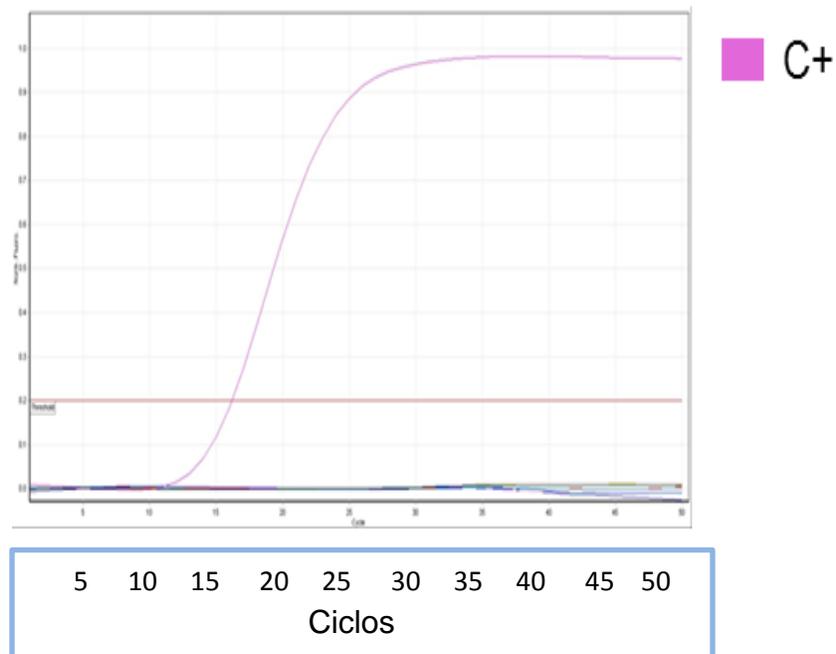


Figura 3. Resultado de la rt-PCR que amplifica el gen *sodC* con el ADN de la cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195, con un valor de C_t menor de 35.

El límite de detección (sensibilidad analítica) de la rt-PCR implementada fue de 10^{-5} UFC/mL. La curva estándar reveló un límite inferior promedio de detección de 71 copias del genoma, el valor del ciclo umbral (C_t) fue de 34, con un coeficiente de regresión promedio (R_2) de 0,9969. Estos parámetros demostraron la eficiencia

promedio de la reacción si tenemos en cuenta que el rango de UFC/mL en una muestra de LCR oscila entre 10^3 - 10^5 (18).

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los descritos por Seib y colaboradores en Australia, al evaluar cepas patógenas de *N. meningitidis* y *N. gonorrhoeae* y de especies de Neisseria comensales, informan que el gen *sodC* está presente solo en cepas de meningococo, en donde desempeña un papel en la protección contra el estrés oxidativo (86). Asimismo, Dolan y colaboradores, en EUA, al estudiar 244 lisados celulares de otras especies diferentes a *N. meningitidis*, señalan que no se produce la amplificación con el gen *sodC* (18). Estos resultados permiten confirmar la utilidad que tiene este gen para la identificación del meningococo por métodos moleculares.

La implementación de la prueba de rt-PCR en 50 ADN obtenidos de LCR en pacientes con síntomas compatibles con una MBAC, identificados previamente mediante una PCR-múltiple, produjo la amplificación solo en aquellas muestras que fueron positivas a *N. meningitidis* (gen *ctrA*) (tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la implementación de la prueba de rt-PCR que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis* en 50 muestras de LCR identificadas por una PCR múltiple.

Muestras	Total	PCR - <i>ctrA</i>	rt-PCR <i>sodC</i>
<i>S. pneumoniae</i> *	15	Negativas	Negativas
<i>H. influenzae</i> **	3	Negativas	Negativas
<i>N. meningitidis</i>	5	Positivas	Positivas
Negativas	27	Negativas	Negativas

* Amplificación con el gen *ply* (Tzanakaki *et al*, 2003)

** Amplificación con el gen *bexA* (Tzanakaki *et al*, 2003)

Las muestras positivas tuvieron un valor de C_t inferior a 35 (figura 4A). Sin embargo, tres de las 27 muestras de LCR que resultaron negativas por la PCR múltiple (11,1 %), mostraron un valor de C_t entre 36-40, por lo que fueron inicialmente interpretadas como resultados equívocos. Con la finalidad de eliminar posibles inhibidores de la reacción de rt-PCR, se realizaron dos diluciones (1:4 y 1:10) al ADN de estas muestras, lo que produjo un promedio de C_t que permaneció en el rango de 36-40, siendo considerado el resultado final como negativo, de acuerdo a la descripción de Dolan (18) (figura 4B).

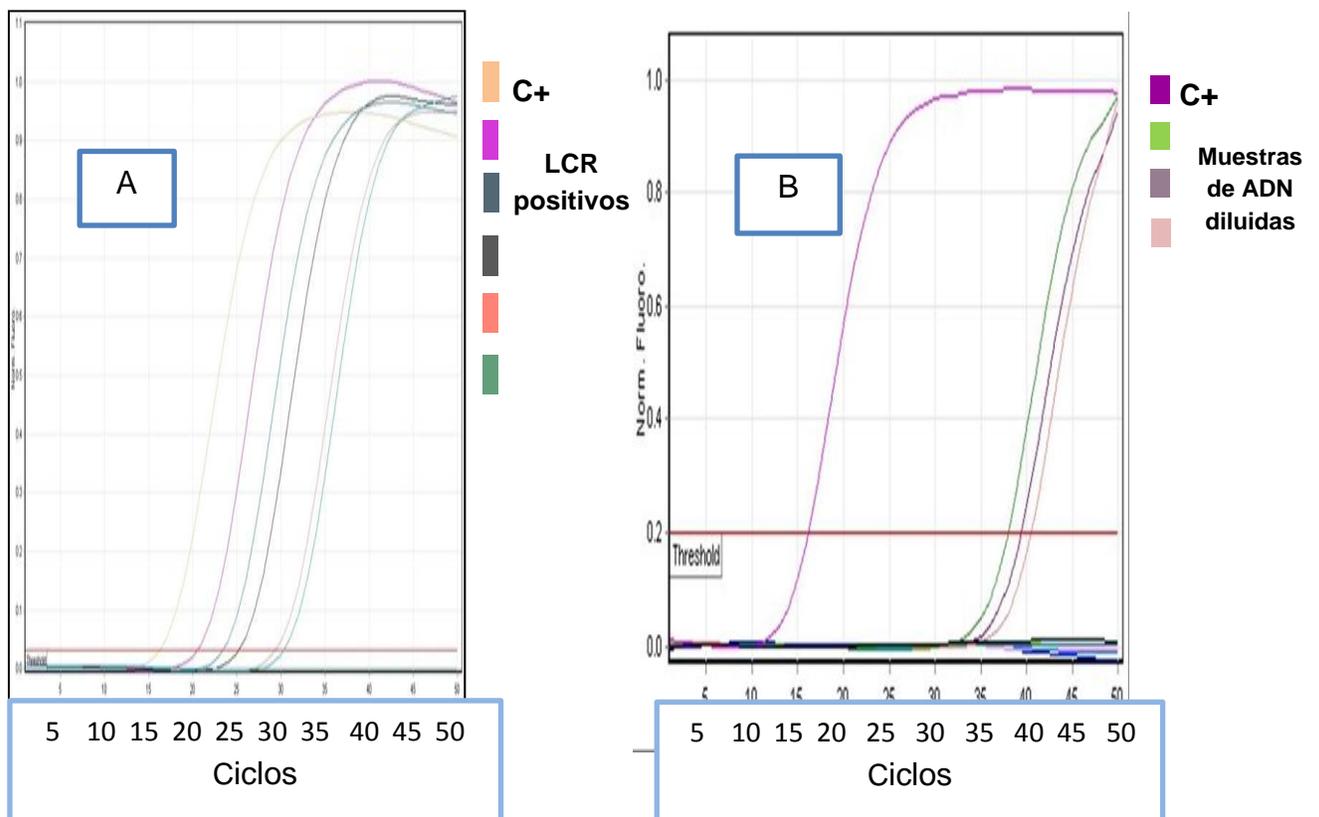


Figura 4. Resultado de la rt-PCR cualitativa que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis* en el LCR. A. Curvas con un valor de C_t menor de 35. B. Curvas con valores de C_t entre 36-40 y las muestras fueron diluidas.

Leyenda: c+: ADN de cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195, 5 LCR positivos a *N. meningitidis*, 3 muestras de ADN de los LCR que fueron diluidas 1:4 y 1:10.

En el presente estudio ambos sistemas de PCR identificaron las cinco muestras como *N. meningitidis* en pacientes con sospecha de MBAC. Dolan y colaboradores en EUA realizan una comparación entre dos métodos de rt-PCR que amplifican los genes *ctrA* y *sodC*, para mejorar la detección de *N. meningitidis* en 157 muestras de suero y LCR. El uso del gen *sodC* detecta un mayor número de muestras positivas a meningococo (15,9 %) que el gen *ctrA* (13,4 %), en especial en los LCR (18). Sin embargo Takenori y colaboradores en Brasil, al llevar a cabo una investigación similar describen que la prueba de rt-PCR que amplifica el gen *sodC* resulta 7,5 % menos sensible que aquella que amplifica el gen *ctrA* en fluidos corporales estériles (22).

Estudios realizados en España y Turquía, en los que utilizan el gen *ctrA* para el diagnóstico de *N. meningitidis* en muestras de LCR, detectan una alta sensibilidad y especificidad de esta prueba, sobre todo, cuando el resultado del examen microscópico directo y el cultivo son negativos, como consecuencia del tratamiento antimicrobiano del paciente previo a la toma de muestras (87, 88). El Servicio de Referencia Microbiológica de España (89) sugiere el empleo de la prueba de PCR que amplifica el gen *ctrA* para mejorar el diagnóstico de los casos con EMI.

Nemescu y colaboradores en Rumania, al evaluar los resultados de la prueba de rt-PCR que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis* con tres métodos diagnósticos convencionales en muestras de LCR de pacientes con sospecha de MBAC, encuentran que el método molecular incrementa el porcentaje de detección de la bacteria en el 20,4 % de los casos investigados (90). Otros estudios realizados por Vázquez y colaboradores, en España (29), así como por Diallo y colaboradores, en Burkina Faso (91), recomiendan el empleo del gen *sodC* como una herramienta molecular útil para el diagnóstico rápido de *N. meningitidis*.

IV.3 Aplicación de dos sistemas de PCR para la identificación de *N. meningitidis* a partir de aislamientos liofilizados de *Neisseria* spp. de portadores nasofaríngeos

Los resultados del cultivo efectuado a las suspensiones de 50 ampulas liofilizadas identificadas previamente como *Neisseria* spp, permitió recuperar solo 10 aislamientos (20 %), que fueron identificados como *N. meningitidis*. La literatura especializada describe que las condiciones óptimas de conservación de los cultivos liofilizados de especies del género *Neisseria* son: 1) temperatura de refrigeración (2-8 °C) o de congelación (-30 -70 °C) (92) 2) protegidos de la acción de la luz, debiéndose utilizar ampulas para liofilizar color ámbar, 3) colocados en un ambiente sin humedad, dada la naturaleza higroscópica del producto liofilizado (2, 93, 94). La conservación de las bacterias liofilizadas en estas condiciones produce una buena estabilidad genética del producto, con una longevidad que oscila de 4 a 40 años (95). En el presente estudio las ampulas liofilizadas tenían 30 años de conservación, estaban guardadas a temperatura ambiente, no protegidas de la luz, lo que pudiera explicar el bajo porcentaje de recuperación de los cultivos.

La medición de la concentración de ADN a las suspensiones celulares de las 50 ampulas liofilizadas, reveló que todas tenían un valor óptimo (por encima de 1ng/μL).

La prueba de PCR a punto final que amplifica el gen *ctrA* de *N. meningitidis* resultó positiva en el 76 % de las suspensiones celulares investigadas (38/50). Es importante destacar que el cultivo promovió el crecimiento de meningococo en una de las 12 muestras que no amplificaron este gen (figura 5: carril 3).

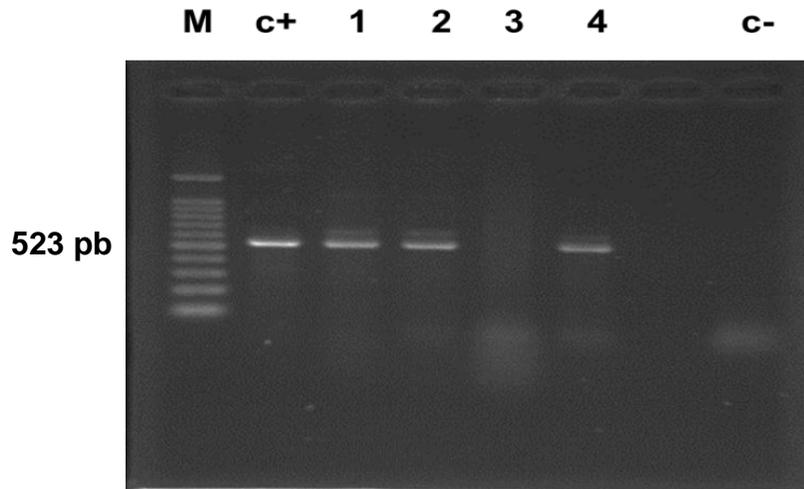


Figura 5. Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 % de los productos de amplificación del fragmento del gen *ctrA* (523 pb).

Leyenda: M: marcador de peso molecular de 100 pb; c+: control positivo ADN de cepa de referencia de *N. meningitidis* ATCC 26195, carriles del 1 al 4 ADN de las suspensiones liofilizadas de portadores; c-: control negativo.

Estos resultados son similares a los notificados por Esposito y colaboradores en Italia y por Gioia y colaboradores en Brasil, que al investigar la presencia de *N. meningitidis* en exudados nasofaríngeos de portadores asintomáticos mediante el cultivo y la prueba de PCR que amplifica el gen *ctrA*, no se produce la amplificación en algunas muestras identificadas como meningococo por cultivo (96, 97).

Existen varios factores que condicionan la no amplificación del ADN en las pruebas de PCR a punto final, entre las que se mencionan la cantidad y calidad del material genético y la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. En el presente estudio la concentración de ADN resultó adecuada y se utilizó agua calidad PCR para realizar las suspensiones celulares. La ausencia de amplificación del gen *ctrA* en el 24 % de las suspensiones obtenidas del material liofilizado sugiere que pudiera deberse a la naturaleza no capsulada de algunos aislamientos de *N. meningitidis* obtenidos de portadores nasofaríngeos (17, 18).

Resulta necesario destacar que la totalidad de las suspensiones realizadas a los productos liofilizados de *Neisseria* spp. obtenidos de la nasofaringe de portadores asintomáticos amplificaron el gen *sodC*, por lo que fueron identificadas como *N. meningitidis* mediante la prueba de rt-PCR con un valor de C_t menor de 35 (figura 6), lo que resalta la capacidad que tiene este sistema de PCR y el gen *sodC* en la identificación definitiva de meningococo en portadores nasofaríngeos de esta bacteria patógena (18, 98).

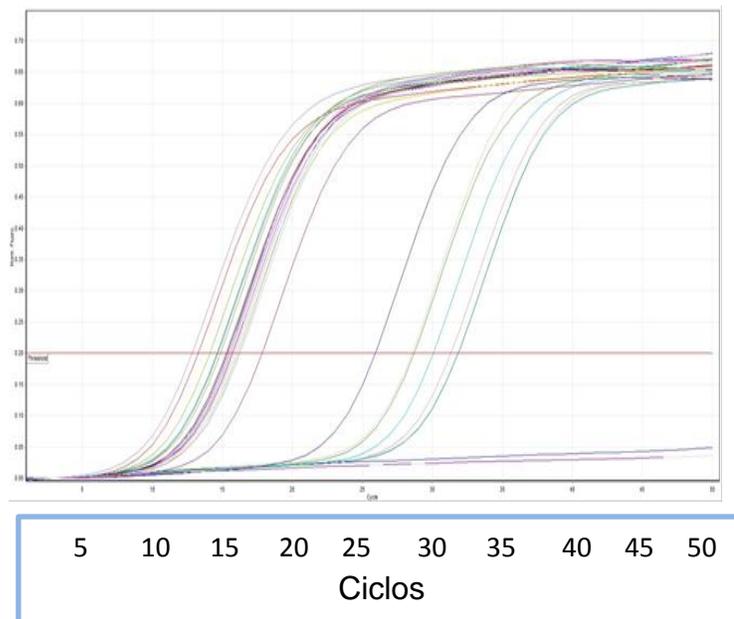


Figura 6. Resultado de la rt-PCR que amplifica el gen *sodC* de *N. meningitidis* produjo la amplificación en las 50 muestras de cultivos liofilizados de portadores nasofaríngeos con un valor de C_t menor de 35.

IV.4 Determinación de los serogrupos de *N. meningitidis* a partir de muestras de LCR y de cultivos obtenidos de portadores nasofaríngeos

La determinación de los serogrupos de *N. meningitidis* a las cinco muestras de LCR que resultaron positivas a esta especie demostró que todas pertenecían al serogrupo B (figura 7).

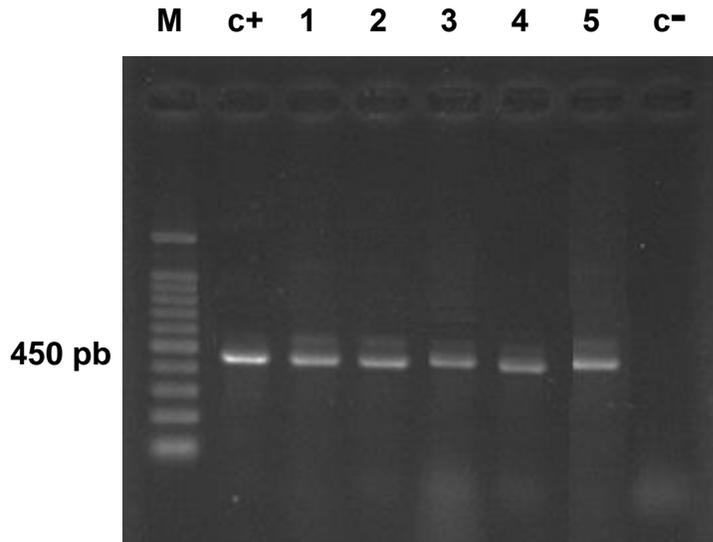


Figura 7 Electroforesis submarina en gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación del fragmento del gen *siaD* (450 pb) de *N. meningitidis* del serogrupo B.

Leyenda: M: marcador de peso molecular 100 pb; c+: control positivo (ADN de cepa de referencia de *N.meningitidis* 385/83 serogrupo B, Instituto Finlay); carriles del 1 al 5 muestras de ADN de los LCR positivos al serogrupo B y c-: control negativo.

En el caso de los 10 cultivos identificados como *N. meningitidis*, obtenidos de la nasofaringe de portadores asintomáticos de la provincia Ciego de Ávila durante la epidemia de EMI, nueve de los 10 aglutinaron con el antisuero correspondiente al serogrupo B y un aislamiento no aglutinó con ninguno de los antisueros que clasifican los meningococos en serogrupos. A este aislamiento se le realizó la prueba de PCR que identifica los principales serogrupos de *N. meningitidis*: A, B, C, Y, X y W135, no produciéndose la amplificación con ninguno de los genes diana utilizados, siendo finalmente clasificado como no aglutinable (NA).

La determinación de los serogrupos circulantes de *N. meningitidis* puede condicionar el comportamiento epidemiológico temporal de este microorganismo. El serogrupo B aumenta su circulación a partir de la década de los años 90 del siglo pasado en las Américas, Europa y Asia. En la región de las Américas se notifican

brotos o epidemias causadas por este serogrupo en Cuba, Estados Unidos, Brasil, Chile, Argentina y Uruguay (99, 100).

En Cuba, durante los primeros tres años de la epidemia de EMI, *N. meningitidis* serogrupo B se aísla en 93,6 % de las cepas investigadas, seguido por el C (3,6 %) (68). Martínez y colaboradores, en un estudio longitudinal realizado a 728 cepas de *N. meningitidis* correspondientes a enfermos y portadores de la etapa epidémica y posepidémica, detectan un predominio del serogrupo B durante la fase de epidemia tanto en enfermos (96,77 %) como en portadores asintomáticos (67,30 %). Sin embargo, en la etapa posepidémica, todas las cepas invasivas eran del serogrupo B (100 %), pero en los portadores predominan las NA (70,77 %) (50). Recientemente, una publicación del LNRNH del IPK en 162 aislamientos de *N. meningitidis* procedentes de pacientes con EMI, estudiados entre los años 1996-2015, revela un franco predominio del serogrupo B (159/162) sobre el serogrupo C (3/162) (101).

En la actual investigación, el predominio del serogrupo B de *N. meningitidis* en muestras de LCR procedentes de pacientes con EMI en los años 2011 y 2016 y de portadores nasofaríngeos en la provincia con la mayor tasa de morbimortalidad durante la etapa epidémica de esta enfermedad se corresponde con los resultados de estudios anteriores y actuales llevados realizados en el país (9, 99, 101).

Diversas investigaciones en portadores nasofaríngeos destinadas al estudio de los principales serogrupos de *N. meningitidis* revelan el predominio de las cepas NA y del serogrupo B, en Brasil (49) y Colombia (102). En Europa se notifica una mayor prevalencia de las cepas de meningococo pertenecientes a los serogrupos B (27 %), X (14 %), Y (13 %) y las NA (67 %), en adolescentes y adultos jóvenes (48). Otra situación presenta África, un continente donde la incidencia de EMI es muy elevada, sobre todo en el denominado “cinturón de la meningitis”. En esa zona, las epidemias son tradicionalmente ocasionadas por el serogrupo A, sin embargo en los últimos años prevalecen los serogrupos Y y W135 (103).

V. DISCUSIÓN GENERAL

El uso de diversas variantes de la prueba de: PCR a punto final y rt-PCR en el LNRNH del IPK, para mejorar la identificación de *N. meningitidis* y sus principales serogrupos, en muestras de LCR de enfermos y aislamientos liofilizados de portadores nasofaríngeos, contribuye al fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad meningocócica en Cuba.

La indicación dada al IPK por la Dirección del Programa Nacional de Control de SNI del Minsap, de investigar por técnicas moleculares los LCR de pacientes con sospecha de MBAC, sin identificación por el cultivo, permitió detectar cinco muestras positivas a meningococo, por dos pruebas de PCR estudiadas. La proporción de LCR identificados como *N. meningitidis* pudiera relacionarse con el éxito logrado tras la aplicación sistemática de la vacuna antimeningocócica de producción nacional a la población cubana en las últimas tres décadas (84, 104).

El estudio de portadores nasofaríngeos de *N. meningitidis* pudiera predecir el comportamiento futuro de casos y brotes epidémicos de EMI (50). Los datos sobre los serogrupos y serotipos de los agentes causantes de MBAC resultan de utilidad para monitorear el impacto real de las vacunas sobre las características de las cepas circulantes y las fallas de vacunas (9). Ambos ensayos de PCR realizados a cultivos liofilizados de *Neisseria* spp. en portadores nasofaríngeos identificaron a *N. meningitidis*, lo que demuestra la mayor sensibilidad de las tecnologías moleculares (86). Como refiere la literatura internacional (18), la prueba de rt-PCR que amplifica el gen *sodC* de meningococo detectó un mayor porcentaje de muestras positivas que la PCR que utiliza como diana el gen *ctrA*, en cultivos de exudados nasofaríngeos de portadores, lo que avala su utilidad en investigaciones en este tipo de muestras.

La rt-PCR implementada mostró excelentes parámetros de sensibilidad y especificidad analítica y dada sus ventajas tecnológicas y el menor tiempo de detección que la PCR múltiple y el cultivo (85, 105), sugieren su empleo para

mejorar la identificación de *N. meningitidis* en muestras de LCR y en exudados nasofaríngeos.

En el presente trabajo se emplea con éxito dos sistemas de PCR para la detección y el estudio de los serogrupos de *N. meningitidis* lo que aporta a la vigilancia de salud pública en enfermos y portadores cubanos de esta infección. Las futuras investigaciones implicarán el uso de enfoques moleculares novedosos que podrían proporcionar el diagnóstico de una gama más amplia de patógenos causantes de MBAC, como *H. influenzae* y *S. pneumoniae*. A pesar del éxito de este programa para aumentar la proporción de casos de meningitis meningocócica detectados en el laboratorio, todavía existe un número considerable de casos de meningitis piógena sin un diagnóstico etiológico.

La elevada frecuencia del serogrupo B de *N. meningitidis* en cultivos de portadores nasofaríngeos de la etapa epidémica y en LCR del período actual, ratifica la estabilidad en la circulación de este serogrupo tras la inmunización con la vacuna VA-MENGOC-BC[®], lo que impacta de forma favorable en el Programa de Control de los Síndromes Neurológicos Infecciosos en Cuba.

VI. CONCLUSIONES

- La PCR que amplifica un fragmento del gen *ctrA* de *N. meningitidis* detecta muestras positivas en LCR de pacientes con sospecha de MBAC, sin identificación por cultivo, lo que contribuye al fortalecimiento de la vigilancia epidemiológica de la enfermedad meningocócica invasiva en Cuba.

- Se implementa una rt-PCR cualitativa para *N. meningitidis* en LCR de pacientes con MBAC y se demuestra su utilidad en la detección del gen *sodC* con relación al gen *ctrA*, en cultivos de *Neisseria* spp. de portadores nasofaríngeos, lo que avala su futura aplicación en muestras clínicas de enfermos y portadores en nuestro medio.

- El predominio del serogrupo B de *N. meningitidis* en cultivos de portadores nasofaríngeos de la etapa epidémica y en muestras de LCR del período actual, confirma su persistencia tras la inmunización con VA-MENGOC-BC[®], lo que impacta de forma favorable en el Programa Nacional de Control de los Síndromes Neurológicos Infecciosos en Cuba.

VII. RECOMENDACIONES

- Evaluar la utilidad de la rt-PCR para el diagnóstico de *N. meningitidis* en exudados nasofaríngeos de portadores y en otras muestras clínicas de enfermos como sangre y petequias.

- Realizar nuevas investigaciones dirigidas a identificar mediante una rt-PCR múltiple las tres principales bacterias causantes de meningitis piógenas adquiridas en la comunidad en casos sin confirmación diagnóstica por cultivo.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rizek CF, Luiz AM, Assis GR, Costa SF, Levin AS, Lopes MH. Comparison of methods to identify *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 2016;58:60.
2. MINSALUD. Bogota: MINSALUD. 2016. [09/01/2018]. Available from: <http://dx.doi.org.ez.urosario.edu.co/10.4067/50716-10182015000600003>.
3. Rico CO, Jimenez BR, Pereira CC, Alonso FA. La estacionalidad de la enfermedad meningocócica en menores de 1 año: Cuba, 1983-1990. Revista Cubana de Medicina Tropical. 1995;47:108-13.
4. Pública Mds. Anuario Estadístico de Salud. 2015. La Habana: Dirección de registros médicos y estadísticas de Salud; 2016 [cited 2018 15]. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
5. Pública MdS. Anuario Estadístico de Salud. 2011. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud; 2012 [cited 2018 14]. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
6. Pública MdS. Anuario Estadístico de Salud. 2012. La Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud 2013 [cited 2018 15]. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
7. Pública MdS. Anuario Estadístico de Salud. 2013. La Habana 2014 [cited 2018 15]. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
8. Pública MdS. Anuario Estadístico de Salud. 2014. La Habana 2015 [cited 2018 15]. Available from: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>.
9. Suárez NN, Martínez MI, Feliano SO, Gutiérrez O, Valdés MJ, Villasusa PI, et al. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* causantes de enfermedad invasiva en Cuba. Panorama Cuba y Salud. 2014;9(1):13-9.
10. Martínez MI. *Neisseria meningitidis*: Contribución al transporte-conservación y caracterización de cepas aisladas en Cuba (1982-2002) [Doctor en Ciencias Médicas]. Ciudad de La Habana 2004.

11. Diggle MA, Clarke SC. Molecular methods for the detection and characterization of *Neisseria meningitidis*. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2006;6(1):79-87.
12. Strachan T, Lea AP. Sección 1. In: Wiley J, editor. *Génética Molecular Humana* Sons Inc.; 1999.
13. Barreras GG. Diagnóstico molecular y determinación de serogrupos de *Neisseria meningitidis* a partir de líquido cefalorraquídeo [Diploma]. Ciudad de la Habana 2009: Universidad de La Habana; 2009.
14. de Souza AL, Sztajnbok J, Marques SM, Romano CC, Alkmin M, Duarte AJ, et al. Compartmentalization of interleukin-6 response in a patient with septic meningococcal peritonitis. *Clinical and Vaccine Immunology* : CVI. 2006;13(11):1287-90.
15. Tzanakaki G, Tsolia M, Vlachou V, Theodoridou M, Pangalis A, Foustoukou M, et al. Evaluation of non-culture diagnosis of invasive meningococcal disease by polymerase chain reaction (PCR). *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2003;39(1):31-6.
16. World Health O. Epidemic meningitis control in countries of the African meningitis belt, 2016. *Weekly Epidemiological Record*. 2015;8(13):57-68.
17. Claus H, Maiden MC, Maag R, Frosch M, Vogel U. Many carried meningococci lack the genes required for capsule synthesis and transport. *Microbiology (Reading, England)*. 2002;148(Pt 6):1813-9.
18. Dolan TJ, Hatcher CP, Satterfield DA, Theodore MJ, Bach MC, Linscott KB, et al. sodC-based real-time PCR for detection of *Neisseria meningitidis*. *PloS One*. 2011;6(5):e19361.
19. Dolan-Livengood JM, Miller YK, Martin LE, Urwin R, Stephens DS. Genetic basis for nongroupable *Neisseria meningitidis*. *Journal of Infectious Diseases* 2003;187(10):1616-28.
20. Wilks KE, Dunn KL, Farrant JL, Reddin KM, Gorringer AR, Langford PR, et al. Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. *Infection and Immunity*

1998;66(1):213-7.

21. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. Nucleic Acids Research. 2009;37(Database issue):D26-31.

22. Takenori HF, Fukasawa LO, Goncalves MG, Salgado MM, Lemos AP, Harrison LH, et al. Use of *sodC* versus *ctrA* for real-time polymerase chain reaction-based detection of *Neisseria meningitidis* in sterile body fluids. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2013;108(2):246-7.

23. Cartwright K. Historical Aspects. In: Frosch M, Maiden MCJ, editors. Handbook of Meningococcal Disease Infection Biology, Vaccination, Clinical Management: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2006. p. 1-13.

24. Caugant DA, Maiden MC. Meningococcal carriage and disease population biology and evolution. Vaccine. 2009;27 Suppl 2:B64-70.

25. Adeolu M, Gupta RS. Phylogenomics and molecular signatures for the order Neisseriales: proposal for division of the order Neisseriales into the emended family Neisseriaceae and Chromobacteriaceae fam. nov. Antonie van Leeuwenhoek. 2013;104(1):1-24.

26. Bennett JS, Jolley KA, Maiden MC. Genome sequence analyses show that *Neisseria oralis* is the same species as '*Neisseria mucosa* var. heidelbergensis'. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2013;63 (10):3920-6.

27. Murray PR, Baron EJ, American Society for Microbiology. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: ASM Press; 2003.

28. Roupael NG, Stephens DS. *Neisseria meningitidis*: Biology, Microbiology, and Epidemiology. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2012;799:1-20.

29. Koneman EW, Allen SK. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas en Color. Médica Panamericana; 2008.

30. Saez-Nieto JA, Fenoll A, Vazquez J, Casal J. Prevalence of maltose-negative *Neisseria meningitidis* variants during an epidemic period in Spain. Journal of Clinical Microbiology. 1982;15(1):78-81.

31. Vazquez JA, Taha MK, Findlow J, Gupta S, Borrow R. Global Meningococcal Initiative: guidelines for diagnosis and confirmation of invasive meningococcal disease. *Epidemiology and Infection*. 2016;144(14):3052-7.
32. Garrido Estepa M. Evaluación de la efectividad vacunal de la vacuna conjugada contra el meningococo C en España. [Doctoral]. España: Universidad Autónoma de Madrid; 2015.
33. Buckee CO, Gupta S, Kriz P, Maiden MC, Jolley KA. Long-term evolution of antigen repertoires among carried meningococci. *Proceedings Biological Sciences*. 2010;277(1688):1635-41.
34. Ochoa AR, Menéndez HJ, editors. Prevención de la enfermedad meningocócica. 1ra ed. La Habana: Finlay Ediciones; 2010.
35. Brandtzaeg P, van Deuren M. Classification and pathogenesis of meningococcal infections. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, NJ). 2012;799:21-35.
36. Diaz Romero J, Outschoorn IM. Current status of meningococcal group B vaccine candidates: capsular or noncapsular? *Clinical Microbiology Reviews*. 1994;7(4):559-75.
37. Harrison OB, Claus H, Jiang Y, Bennett JS, Bratcher HB, Jolley KA, et al. Description and nomenclature of *Neisseria meningitidis* capsule locus. *Emerging Infectious Diseases*. 2013;19(4):566-73.
38. Toros B, Jacobsson S. Is the Emergence of the *Neisseria meningitidis* Serogroup W ST-11 Hajj Outbreak Unraveling in the New Era of WGS? *EBioMedicine*. 2015;2(10):1294-5.
39. Bethea J, Makki S, Gray S, MacGregor V, Ladhani S. Clinical characteristics and public health management of invasive meningococcal group W disease in the East Midlands region of England, United Kingdom, 2011 to 2013: *European Communicable Disease Bulletin*. 2016;21(24).
40. Gutiérrez GE, Martínez SE, Amillategui dos Santos R, Cano PR. Enfermedad meningocócica en España. Análisis de la temporada 2015-2016. *Boletín Epidemiológico Semanal* 2017; Vol. 25(Núm. 5):57-72.

41. Steindl G, Liu YL, Schmid D, Orendi U, Kormann-Klement A, Heuberger S. Epidemiology of invasive meningococcal disease in Austria 2010. Wiener klinische Wochenschrift. 2011;123 Suppl 1:10-4.
42. Jolley KA, Wilson DJ, Kriz P, McVean G, Maiden MC. The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. Molecular Biology and Evolution. 2005;22(3): 562-9.
43. Borrow R, Miller E. Long-term protection in children with meningococcal C conjugate vaccination: lessons learned. Expert Review of Vaccines. 2006;5(6): 851-7.
44. Harris SL, Donald RG, Hawkins JC, Tan C, O'Neill R, McNeil LK, et al. *Neisseria meningitidis* Serogroup B Vaccine, Bivalent rLP2086, Induces Broad Serum Bactericidal Activity Against Diverse Invasive Disease Strains Including Outbreak Strains. The Pediatric Infectious Disease Journal. 2017;36(2):216-23.
45. Peak IR, Jennings CD, Jen FE, Jennings MP. Role of *Neisseria meningitidis* PorA and PorB expression in antimicrobial susceptibility. Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2014;58(1):614-6.
46. Tommassen J, Vermeij P, Struyve M, Benz R, Poolman JT. Isolation of *Neisseria meningitidis* mutants deficient in class 1 (porA) and class 3 (porB) outer membrane proteins. Infection and Immunity. 1990;58(5):1355-9.
47. López-Gigosos RM, Salleras L, Muñoz C. Vacunas frente a la enfermedad meningocócica invasora. Vacunas. 2014;15:170-82.
48. van Ravenhorst MB, Bijlsma MW, van Houten MA, Struben VMD, Anderson AS, Eiden J, et al. Meningococcal carriage in Dutch adolescents and young adults; a cross-sectional and longitudinal cohort study. Clinical microbiology and infection : 2017;23(8):573.e1-.e7.
49. Coch Gioia CA, Silva de Lemos AP, Outeiro Gorla MC, Mendoza-Sassi RA, Ballester T, Von Groll A, et al. Detection of *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers in a university hospital from Brazil. Revista Argentina de Microbiología. 2015;47(4):322-7.

50. Martínez Motas I, Sierra González G, Núñez Gutiérrez N, Izquierdo Pérez L, Climent Ruíz Y, Mirabal Sosa M. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de portadores en Cuba durante 20 años. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2006;58:124-33.
51. Poolman JT. Development of a meningococcal vaccine. *Infection Agents Disease*. 1995;4(1):13-28.
52. Brehony C, Rodrigues CMC, Borrow R, Smith A, Cunney R, Moxon ER, et al. Distribution of Bexsero(R) Antigen Sequence Types (BASTs) in invasive meningococcal disease isolates: Implications for immunisation. *Vaccine*. 2016;34(39):4690-7.
53. Bos MP, Tefsen B, Geurtsen J, Tommassen J. Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(25):9417-22.
54. Hooda Y, Shin HE, Bateman TJ, Moraes TF. Neisserial surface lipoproteins: structure, function and biogenesis. *Pathogens and Disease*. 2017;75(2):1-14.
55. Pedersen MO, Pedersen DS, Pedersen M, Penkowa M. [*Neisseria meningitidis*. The pathophysiological role of lipopolysaccharides in association with meningococcal disease and septic shock]. *Ugeskrift for Laeger*. 2008;170(6):421-6.
56. Alfaro C. Patogénesis de *Neisseria meningitidis*. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr Carlos Sáenz Herrera*. 2005;40:73-80.
57. Gil A, Barranco D, Batalla J, Bayas JM, Campins M, Gorrotxategi P, et al. Prevención de la enfermedad meningocócica por el serogrupo B mediante una vacuna de cuatro componentes. *Revista Pediátrica Atención Primaria*. 2014;16(108):55-74.
58. Pizza M, Rappuoli R. *Neisseria meningitidis*: Pathogenesis and Immunity. *Current Opinion in Microbiology*. 2015;23:68-72.
59. Ahmed SS, Oviedo-Orta E, Mekaru SR, Freifeld CC, Tougas G, Brownstein JS. Surveillance for *Neisseria meningitidis* Disease Activity and Transmission Using Information Technology. *PloS One*. 2015;10(5):e0127406.

60. Valdés HM, Martínez MI, Villasusa PI, Guancho HM. Enfermedad meningocócica. Comportamiento epidemiológico y efecto de la vacunación. *Panorama Cuba y Salud*. 2017;12(3):60-5.
61. Guzmán HD, Llanes CR, Martínez MI, Valdés RE, Sosa PJ. Primer reporte de *Neisseria polysaccharea* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 1999;51:133-4.
62. Instituto de Salud Pública de Chile. Vigilancia de laboratorio enfermedad invasora *Neisseria meningitidis* 2012-2016. *Boletín de laboratorio y vigilancia al día*. 2017;7(2):1-16.
63. Rodrigo BD. Meningitis bacteriana aguda. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2014;25(3):534-40.
64. Almeida-González L, Franco-Paredes C, Pérez LF, Santos-Preciado JI. Enfermedad por meningococo: perspectiva epidemiológica, clínica y preventiva. *Salud Pública de México*. 2004;46(5):13.
65. Van den Bruel A, Haj-Hassan T, Thompson M, Buntinx F, Mant D. Diagnostic value of clinical features at presentation to identify serious infection in children in developed countries: a systematic review. *Lancet (London, England)*. 2010;375(9717):834-45.
66. Visintin C, Mugglestone MA, Fields EJ, Jacklin P, Murphy MS, Pollard AJ. Management of bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in children and young people: summary of NICE guidance. *BMJ (Clinical research ed)*. 2010;340:c3209.
67. Harrison LH, Shutt KA, Schmink SE, Marsh JW, Harcourt BH, 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. *The Journal of Infectious Diseases*. 2010;201(8):1208-24.
68. Valcarcel M, Rodríguez R, Ferry H. La enfermedad meningocócica en Cuba. *Cronología de una epidemia*. 1ra. ed. Ciudad Habana: ECIMED; 1991. 319-97 p.
69. Sotolongo PF. *Neisseria meningitidis*: Aspectos teórico-prácticos sobre el diagnóstico, clasificación y valoración de la respuesta inmune. Editorial Finlay; 1996. p. 30.

70. Sanchez-Romero MI, Garcia-Lechuz Moya JM, Gonzalez Lopez JJ, Orta Mira N. Collection, transport and general processing of clinical specimens in Microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*. 2018.
71. Juárez Velázquez GE. Métodos diagnósticos de laboratorio clínico para meningitis bacteriana. *Evidencia Médica e Investigación en Salud*. 2013.
72. Trombetta L, Poustis G, Bocassi A, Bava AJ. CSF in patients with AIDS associated cryptococcosis. *Clín Latinoam*. 2008;42(1).
73. Sanabria OM. Guía para la vigilancia por laboratorio de meningitis bacteriana aguda (MBA). en: Salud Ind, editor. Colombia: Dirección de Redes en Salud Pública; 2014. p. 22.
74. Pública. MdSP. *Neisseria meningitidis* 2011-2015. 2015;5(10):17.
75. Bryant PA, Li HY, Zaia A, Griffith J, Hogg G, Curtis N, et al. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(7):2919-25.
76. Folaranmi T, Rubin L, Martin SW, Patel M, MacNeil JR. Use of Serogroup B Meningococcal Vaccines in Persons Aged >10 Years at Increased Risk for Serogroup B Meningococcal Disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices, 2015. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2015;64(22):608-12.
77. Ben RJ, Kung S, Chang FY, Lu JJ, Feng NH, Hsieh YD. Rapid diagnosis of bacterial meningitis using a microarray. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2008;107(6):448-53.
78. Clark SA, Doyle R, Lucidarme J, Borrow R, Breuer J. Targeted DNA enrichment and whole genome sequencing of *Neisseria meningitidis* directly from clinical specimens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2018;308(2):256-62.
79. Sambrook JF, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
80. Duque CM, Sánchez DM, Gómez B, Carmona JA, Cifuentes D, Gaviria AM, et al. Evaluación de una técnica de PCR en tiempo real para determinar colonización

por *Streptococcus agalactiae* en mujeres gestantes de Medellín que consultan en Dinamica IPS. *Infection Agents Disease*. 2018;22:26-9.

81. LLanes CR, Feliciano SO, Gutierrez GO. Diagnóstico de laboratorio de las infecciones gonocócicas. En: LLanes CR, Fernández MC, Rodríguez PN, Rodríguez GI, Perurena LM, et.al, editors. *Manual de técnicas diagnósticas de las infecciones del tracto reproductivo*. La Habana: Editorial de ciencias Médicas; 2009. p. 33-44.

82. Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38(2):855-7.

83. Pérez AE, Dickinson FO, Rodriguez M. Community acquired bacterial meningitis in Cuba: a follow up of a decade. *BMC infectious diseases*. 2010;10:130.

84. Ochoa-Azze RF. Cross-protection induced by VA-MENGOC-BC(R) vaccine. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(5):1064-8.

85. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of Real-Time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil. *PloS One*. 2011;6(6):e20675.

86. Seib KL, Tseng HJ, McEwan AG, Apicella MA, Jennings MP. Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. *The Journal of Infectious Diseases*. 2004;190(1):136-47.

87. Meningitis y otras infecciones que requieren ingreso hospitalario (II). 2006. En: XII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. España: Espec Congr; [211-16].

88. Baspinar EO, Dayan S, Bekcibasi M, Tekin R, Ayaz C, Deveci O, et al. Comparison of culture and PCR methods in the diagnosis of bacterial meningitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017;48(2):232-6.

89. Fernandez-San Jose C, Moraga-Llop FA, Codina G, Soler-Palacin P, Espiau M, Figueras C. The use of polymerase chain reaction in the diagnosis of invasive meningococcal disease. *Anales de pediatria:Barcelona*. 2015;82(3):139-43.

90. Nemescu R, Ursu R, Dorobăț C, Iancu LS. The efficiency of *sodC* gene / *Neisseria meningitidis* detection in comparison with the classical methods for the diagnosis of meningococcal infection / Evaluarea eficienței Real Time PCR TaqMan utilizând gena *sodC*. 2015;40:2-7
91. Diallo AO, Soeters HM, Yameogo I, Sawadogo G, Ake F, Lingani C, et al. Bacterial meningitis epidemiology and return of *Neisseria meningitidis* serogroup A cases in Burkina Faso in the five years following MenAfriVac mass vaccination campaign. PloS One. 2017;12(11):e0187466.
92. Kirsop BE. Maintenance of Yeast. Kirsop and Doyle A Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells A Manual of Laboratory Methods. 2 ed. London: Academic Press; 1991. p. 161-82.
93. Burguet-Lago N, Sierra-Prado N, C. Brito-Godoy L. Conservación de cepas microbianas por el método de liofilización para el control microbiológico en Laboratorios Liorad. Revista CENIC Ciencias Biológicas,. 2012;43(3):1-4.
94. del Puerto CA, Iglesias E, Morales T, Baños N, Nocado MD, Carnota G, et al. Organización y manejo de la colección de cepas de referencia del Instituto Finlay. Vaccimonitor. 2009;18:20-4.
95. Gherna RL. Culture preservation. In: P.Gerhardt R. G, E Murray, W. A. Wood, N. R. Krieg, editors. Methods for general and molecular bacteriology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology; 1994. p. 278-92.
96. Coch Gioia CA, Silva de Lemos AP, Outeiro Gorla MC, Mendoza-Sassi RA, Ballester T, Von Groll A, et al. Detection of *Neisseria meningitidis* in asymptomatic carriers in a university hospital from Brazil. Rev Argent Microbiol. 2015;47(4):322-7.
97. Esposito S, Zampiero A, Terranova L, Montinaro V, Peves Rios W, Scala A, et al. Comparison of posterior pharyngeal wall and nasopharyngeal swabbing as a means of detecting the carriage of *Neisseria meningitidis* in adolescents. European Journal Of Clinical Microbiology & infectious Diseases. 2013;32(9):1129-33.
98. Silva Simões Moura AR. Caracterização genética de cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de portadores assintomáticos de 11 a 19 años de idade residentes em Salvador, Bahia [Maestría]. Salvador-Bahia: Fundação Oswaldo Cruz Instituto Gonçalo Moniz; 2017.

99. Climent Y, Yero D, Martinez I, Martin A, Jolley KA, Sotolongo F, et al. Clonal distribution of disease-associated and healthy carrier isolates of *Neisseria meningitidis* between 1983 and 2005 in Cuba. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(3):802-10.
100. Suárez NN, Martínez MI, Feliano SO, Gutiérrez O, Valdés HM. Caracterización de cepas de *Neisseria meningitidis* causantes de enfermedad invasiva en Cuba. *Panorama Cuba y Salud*. 2014;9(1):13-9.
101. Llanes R, Gutiérrez O, Feliciano O. Situación de la vigilancia, la referencia y el diagnóstico de laboratorio de la enfermedad meningocócica invasiva en Cuba [Investigativo]. In press 2017.
102. Moreno J, Sanabria O, Saavedra S, Rodríguez K, Duarte C. Caracterización fenotípica y genotípica de *Neisseria meningitidis* serogrupo B aisladas en Cartagena, Colombia, 2012-2014. *Biomédica*. 2014;35(1).
103. Estruch-de la Guardia R, Barrera-Suarez BA, Mirabal-Sosa M, Armesto-del Río M, García-Sánchez HM, Cedré-Marrero B. Seguridad, reactogenicidad e inmunogenicidad de una nueva vacuna de polisacáridos meningocócicos en adultos jóvenes cubanos. *VacciMonitor*. 2017;26(1):17-23.
104. Rodríguez M, Pérez A, Llanes R, Dickinson F, Cuevas IE, Pérez K. Características epidemiológicas y microbiológicas en casos confirmados de enfermedad meningocócica en Cuba, 1998-2007. *Vaccimonitor*. 2013;22:1-8.
105. Salgado MM, Goncalves MG, Fukasawa LO, Higa FT, Paulino JT, Sacchi CT. Evolution of bacterial meningitis diagnosis in Sao Paulo State-Brazil and future challenges. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*. 2013;71(9b):672-6.