

CARACTERIZACION DE CEPAS DE NEISSERIA MENINGITIDIS GRUPO B

Isabel Martínez Motas (1) Ana Sonia Patton Marisy (1) Franklin Sotolongo Padrón (2)
Alina Llop Hernández (1) Jorge Sosa Puente (1)

(1) Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo, Subdirección de Microbiología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", La Habana, Cuba.

(2) Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

RESUMEN

El Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" es el responsable de la vigilancia de la circulación de cepas de *Neisseria meningitidis*. En Cuba la misma se establece en base a diferentes marcadores epidemiológicos, siendo los más utilizados el serogrupo, el serotipo y la resistencia a la sulfadiazina. Se presenta la tipificación de cepas procedentes de enfermos, remitidas de los laboratorios de la red nacional, en los años comprendidos desde 1986 hasta 1992, utilizando para este fin la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE). El patrón electroforético predominante dentro de las cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B estudiadas, resultó ser el correspondiente al tipo 4, subtipo 15.

Palabras Claves: Neisseria meningitidis, Marcadores epidemiológicos, Electroforesis en geles de Poliacrilamida.

ABSTRACT

Characterization of *Neisseria meningitidis* Group B strains

The National Laboratory of Reference of Meningococcus of the Institute of Tropical Medicine "Pedro Kouri" is the one responsible for *Neisseria meningitidis* strains circulation surveillance. This is established in Cuba using different epidemiologic markers, being the serogroup, the serotype and the resistance to sulfadiazine the most common used. The typing of the strains from patients sent from the national network laboratories in the period between 1986 to 1992 using for this purpose the polyacrylamide gel electrophoresis technique is presented. The predominant electrophoretic pattern among the studied strains of *Neisseria meningitidis* group B was the type 4, sub-type 15.

Key Words: Neisseria meningitidis, epidemiologic

markers, polyacrylamide gel electrophoresis technique (PAGE).

INTRODUCCION

Neisseria meningitidis es uno de los agentes etiológicos más frecuentemente aislado en la meningitis cerebroespinal. Esta patología es una importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo, manifestándose de forma endémica y epidémica (1), aunque los niveles de infección meningocócica fluctúan de 1-3/100000 en Estados Unidos y de 10-25/100000 en muchos países desarrollados, esta enfermedad es notable por provocar grandes epidemias con tasas de ataque que pueden llegar hasta 500/100000 (2).

Se han identificado 12 serogrupos de meningococos por medio de la especificidad inmunológica de sus polisacáridos capsulares (3). Las cepas de los serogrupos A, B y C causan el 90% de casos de infección meningocócica en el mundo y el resto son producidas por cepas de los serogrupos Y y W 135 (4).

Durante muchos años la enfermedad meningocócica se convirtió en un agobiante problema de salud para nuestro país, afectado por una epidemia que comenzó en la década del 70. En 1976, el brote epidémico estaba causado principalmente por el serogrupo C. Después de una inmunización masiva con la vacuna francesa de polisacárido A - C, producida por el Instituto Mérieux, la incidencia continuó en ascenso, pero a expensas del serogrupo B. El pico de la epidemia ocurrió en 1983 con una tasa de 14,4/100000 (1).

En el año 1988, comienza la utilización de la vacuna cubana Vamengoc B-C, producida por el Instituto Finlay de Cuba, disminuyendo el número de casos hasta alcanzar en 1992 una tasa de 1,4/100000 (1).

En 1985 Frasch, propone un esquema de designación de cepas de *Neisseria meningitidis*, basado en las diferencias inmunológicas de sus antígenos celulares superficiales. Esta nomenclatura incluye polisacáridos

(serogrupo), las proteínas de la membrana externa (serotipo) y el lipopolisacárido (inmunotipo) (5).

Las diferencias de las proteínas de las clases 2 y 3, se utilizan para distinguir el serotipo y las diferencias en las proteínas clase 1, para determinar subtipos (5).

Se han desarrollado diferentes técnicas que permiten una caracterización más completa de las cepas (6, 7, 8, 9). La importancia de la tipificación, teniendo en cuenta las proteínas de la membrana externa, ha sido claramente demostrada y resulta de gran valor en los estudios epidemiológicos de la infección meningocócica (5).

Esta investigación comprende un período de 7 años (1986 - 1992) de cepas de *Neisseria meningitidis*, aisladas de enfermos durante este período; las mismas se clasificaron en serogrupos, serotipos y subtipos.

MATERIAL Y METODOS

Cepas: Fueron estudiadas 1077 cepas de *Neisseria meningitidis* grupo B, procedentes de las 14 provincias de Cuba y el municipio especial Isla de la Juventud, recibidas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Meningococo del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", durante los años 1986 - 1992. Todas fueron estudiadas mediante pruebas de citocromooxidasa, fermentación de carbohidratos, actividad de la Beta galactosidasa y seroagrupamiento por aglutinación en lámina con antisueros específicos para confirmar el diagnóstico.

Extracción del antígeno serotipo específico (STA): Para la extracción del STA, se sembraron las cepas en agar Mueller Hinton enriquecido con suero de ternera al 7,5%, incubándose durante 18 - 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. El crecimiento así obtenido, previa comprobación de pureza, se sembró en 100 ml de caldo Soya Tripticasa y se incubó 24 horas a 37°C en una zaranda incubadora a 150 rpm. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 4000 rpm a 4°C, durante una hora. El sedimento se resuspendió en 5 ml de una solución 0,2 Molar de Cloruro de Litio en 0,1 Molar de Acetato de Sodio, pH 5,8; manteniéndose en agitación en baño de María a 50°C durante 2 horas, en frascos plásticos con perlas de cristal de 4 mm de diámetro. Este material se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 20 minutos y el sobrenadante se ultracentrifugó a 100.000 g durante 2 horas (10).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE): Se obtuvieron mediante geles de poliacrilamida - SDS al 12,5%, según métodos descritos (11). Los patrones electroforéticos que correspondieron a las proteínas de

clase 1 y de clase 2/3 en el SDS - PAGE, fueron comparados con los patrones conocidos de las cepas estandar. Se utilizaron como controles las siguientes cepas: (B4 P1: 15); H 355 (B15 P1:15); 44/76 (B15 Pi: 16); B2 (B16 B6) y B4.

RESULTADOS Y DISCUSION

El número de cepas aisladas en Cuba, ha ido disminuyendo paulatinamente, en concordancia con el número de enfermos notificados (gráfico 1). A finales del año 1988 se inició la vacunación con Vamengoc - BC, observándose una apreciable baja de la incidencia del número de casos y de las cepas aisladas a partir de esa fecha. En 1992 sólo se reportaron 94 casos y se recibieron 59 aislamientos.

La distribución del total de cepas por serogrupos en el período analizado (tabla No. 1), arroja que *N. meningitidis* serogrupo A se aisló solamente en 1986 (1,2%) y 1987 (1,0%). Este serogrupo, históricamente, ha sido la principal causa de las mayores epidemias y pandemias en el mundo (2).

En Cuba no se comportó como predominante durante estos años epidémicos (1). No sucede así en países como Brasil, Nepal, China y Africa, donde ha provocado grandes epidemias (2). En el Africa Sub-Sahariana éstas se producen en forma periódica, a intervalos de 8 - 14 años, en un área endémica clásica denominada "cinturón de la meningitis", muy susceptible a este serogrupo (12).

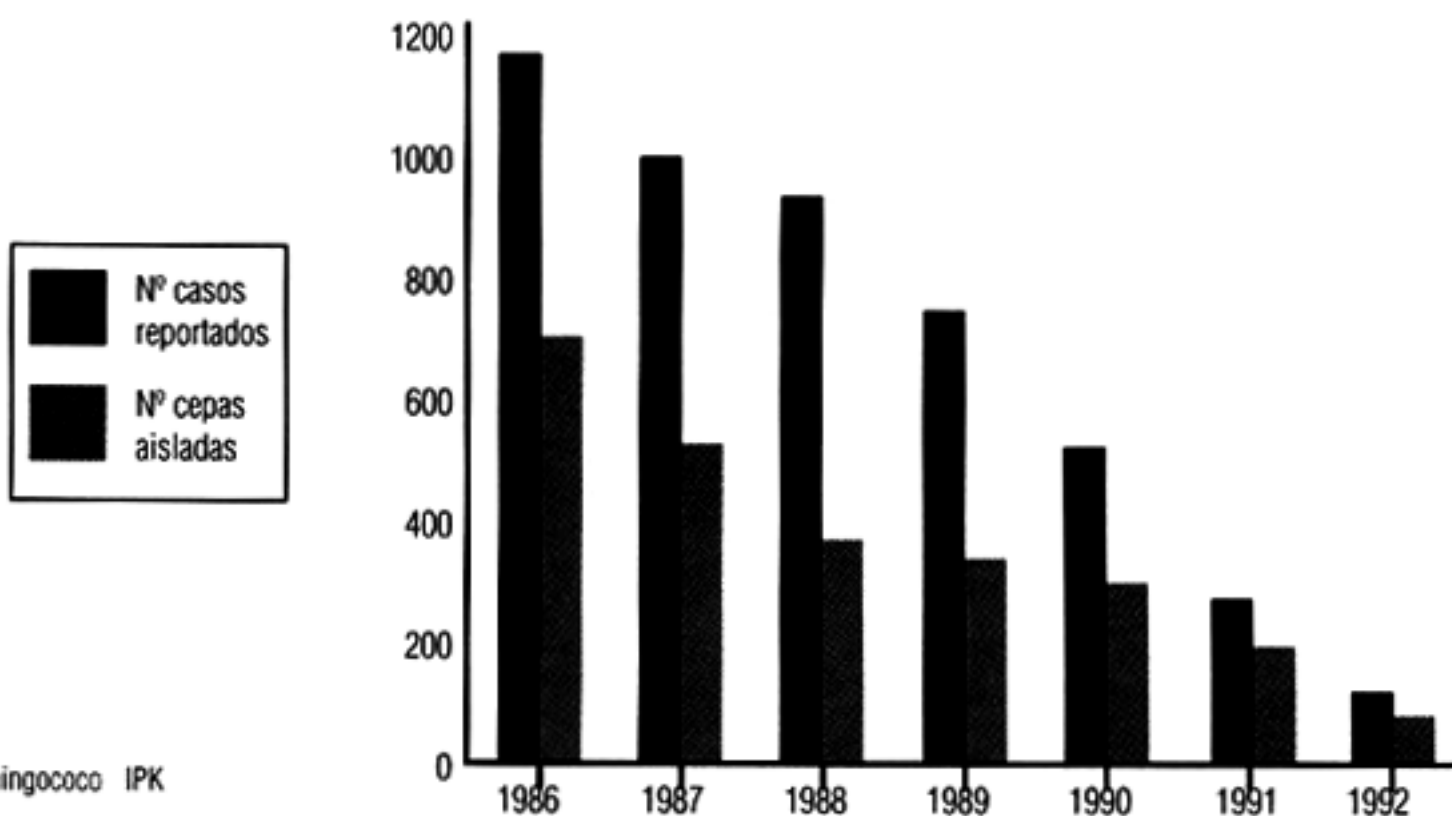
No tuvimos aislamientos de *N. meningitidis* serogrupo C, que ha sido implicado en epidemias, pequeños brotes y casos esporádicos (2).

N. meningitidis serogrupo B, ha predominado durante los años estudiados, manteniéndose por encima del 98%. Su aislamiento aumenta en Cuba, después de la aplicación masiva de la vacuna francesa de polisacárido A - C y se ha comportado como el principal agente etiológico de la enfermedad meningocócica (1).

El serogrupo B ha sido generalmente asociado con casos esporádicos y brotes localizados en países desarrollados, pero a comienzos de 1970, epidemias causadas por cepas de este serogrupo, han ocurrido en diferentes países de Europa incluyendo Noruega, Bélgica, Gran Bretaña, Dinamarca, Holanda, Islandia y España, así como muestra también un claro predominio en diferentes países de América y Asia (2, 6, 13, 14).

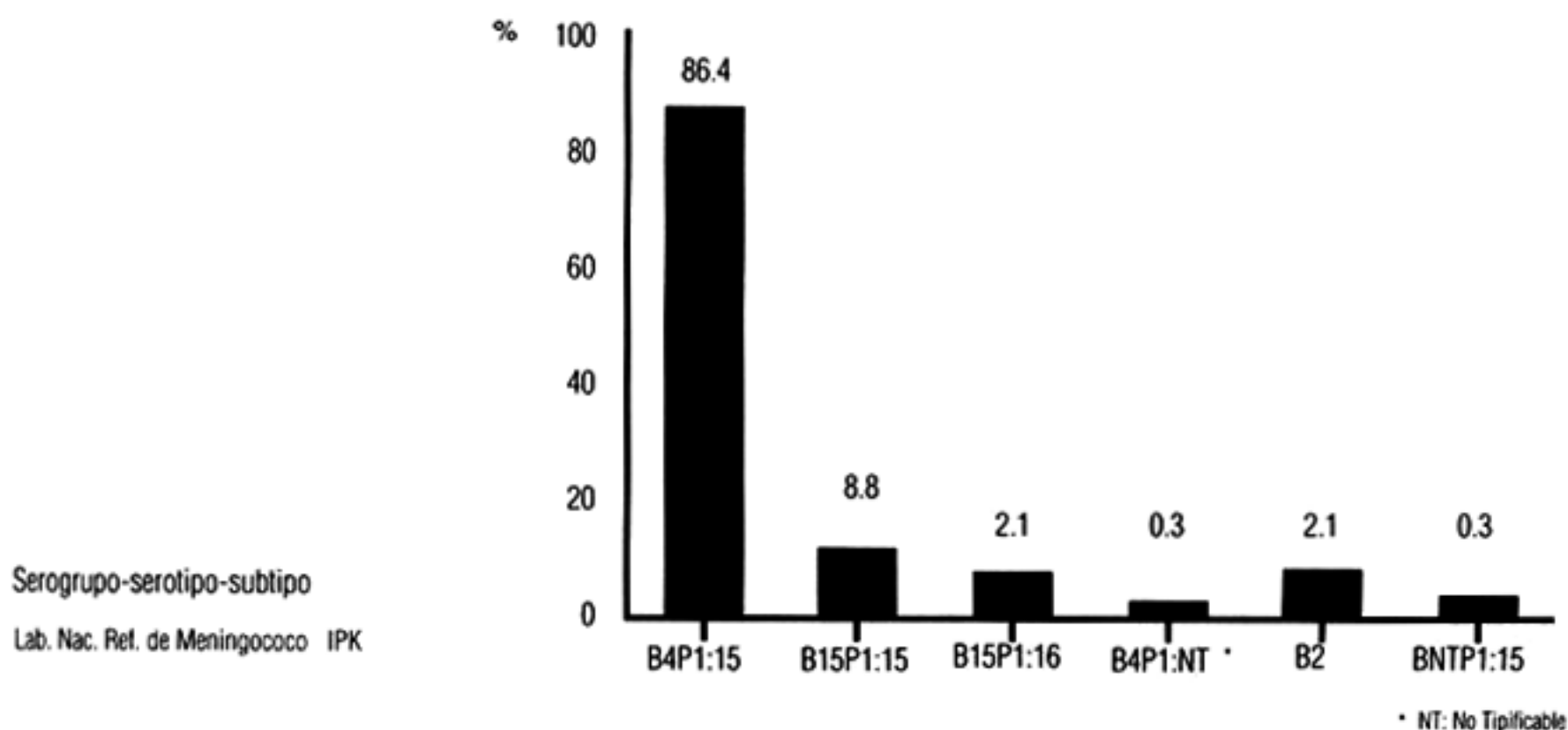
Dentro del serogrupo B de *N. meningitidis*, el serotipo y subtipo más frecuente (gráficos 2 y 3), resultó ser el B4 P1:15 (86,4%). Esta cepa predomina en nuestro

GRAFICO 1 CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE LCR y/o SANGRE 1986-1992



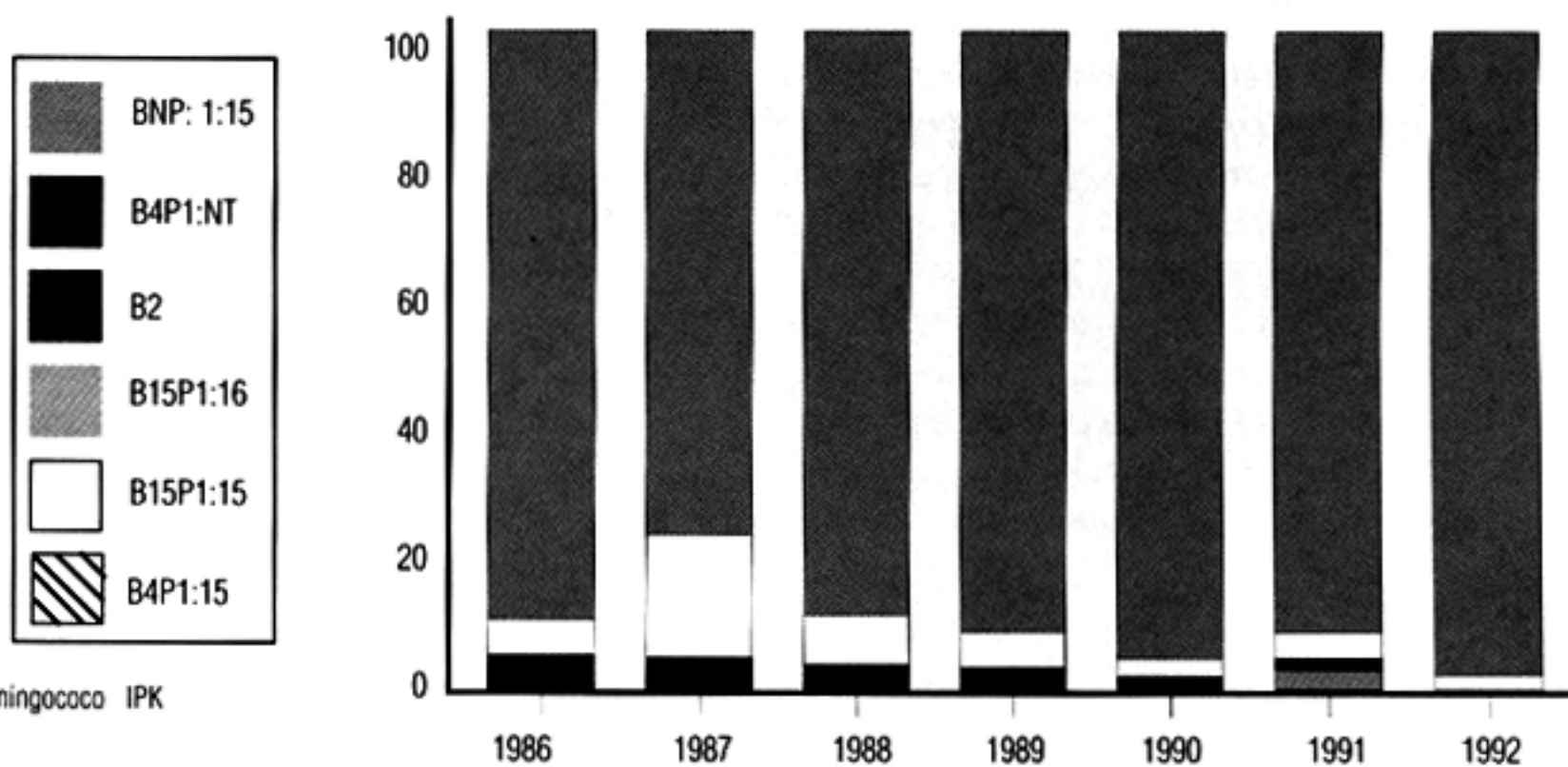
Lab. Nac. Ref. de Meningococo IPK

GRAFICO 2 PATRONES ELECTROFORETICOS EN 1077 CEPAS DE MENINGOCOCO B. 1986-1992



Serogrupo-serotipo-subtipo
Lab. Nac. Ref. de Meningococo IPK

GRAFICO 3 SEROTIPOS Y SUBTIPOS DE CEPAS DE MENINGOCOCO B. 1986-1992



Lab. Nac. Ref. de Meningococo IPK

TABLA No. 1
SEROGUPOS DE MENINGOCOCO AISLADOS DE LCR Y/O SANGRE
(1986 - 1992)

Serogrupos	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992
A	1.2	1.0	0	0	0	0	0
B	98.8	99.0	100	100	100	100	100
C	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Lab. Nac. Referencia de Meningococo, IPK

país desde finales de la década del 70 y en otros estudios realizados muestra también su prevalencia en portadores (1).

El uso de marcadores epidemiológicos cada vez más sofisticados, ha permitido demostrar, que con frecuencia un solo clon es responsable de una epidemia y que éste puede dispersarse a otras áreas del mundo (6).

Las cepas B4 P1:15 fueron clasificadas por electroforesis de enzimas multilocus como pertenecientes al complejo ET5. Este clon es responsable de brotes en varios países europeos y se ha difundido a otras partes del mundo que incluyen a Cuba, Chile, Brasil y Estados Unidos (15).

Otros serotipos encontrados fueron: B15 P:15 (8,8%), B15 P1:16 (2,1%), B2 (2,1%), B4 P1:NT (0,3%) y B NT P1:15 (0,3%).

Durante los años estudiados no se observaron cambios en las cepas circulantes. No se comprobó variación en el serogrupo ni en los serotipos de *N. meningitidis* aislados.

Este estudio ha permitido establecer la historia microbiológica de la epidemia que ha azotado a Cuba y ha contribuido a la vigilancia epidemiológica de la enfermedad meningocócica.

(aceptado para publicación el 11-04-94)

BIBLIOGRAFIA

- 1 Valcárcel, Novo, M; Rodríguez, Cruz, R. y Terry, Molinert, H. 1990. La enfermedad meningocócica en Cuba. Cronología de una epidemia. Editorial Ciencias Médicas, Habana, Cuba.
- 2 Schwartz, B.; Moore, P. S. and Broome, C. V. Global Epidemiology meningococcal disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989. 2: S 118 - 124.
- 3 Jawetz, E.; Melrich, J. L. and Adelberg, E. A. 1992. Microbiología Médica. Decimocuarta edición. Ed. Manual Moderno, S. A. de C. V. México, D.F.
- 4 Peltola, H.; Kataya, J. M. and Makela, P. H. 1982. Shift in the age distribution of meningococcal disease as a predictor of an epidemic. *Lancet.* 595 - 597.
- 5 Frasch, C. E.; Zollinger, W. D. and Poolman, J. T. 1985. Serotype antigens of *Neisseria meningitidis* and scheme for designation of serotypes. *Rev. Infect. Dis.* 7 (4) 504 - 510.
- 6 Caugant, D. E.; Mocca, L. F.; Zollinger, W. D. and Selander, R. K. 1986. Intercontinental spread of genetically distinctive complex of clones of *Neisseria meningitidis* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad.* 83: 4927 - 4931.
- 7 Wedege, E. E.; Hoiby, E. and Froholm, L. O. 1990. Serotyping and subtyping of *Neisseria meningitidis* isolates by coagglutination, dot-blotting and Elisa. *J. Medical. Microbiol.* 31: 195 - 201.
- 8 Bygraves, J. A. and Maiden, J. C. J. 1992. Analysis of clonal relationships between strains of *Neisseria meningitidis* by pulsed field gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 138: 531 - 532.
- 9 Abdillahi, H. and Poolman, J. A. 1987. Typing of group B *Neisseria meningitidis* with monoclonal antibodies in the Whole - Cell Elisa. *Feems. Microbiol. Lett.* 48: 367 - 371.
- 10 Frasch, C. E. and Chapman, S. S. 1972. Classification of *Neisseria meningitidis* group B into distinct serotypes II: Extraction of type - specific antigens for serotyping by precipitating techniques. *Infect. Immun.* 6: 127 - 133.
- 11 Laemli, V. K. and Farve, M. 1973. Maturation of the head Bacteriophage T4. DNA packagen events. *J. Mol. Biol.* 80: 575 - 599.
- 12 Moore, P. S.; Plikaytis, B. D.; Bolan, G. A.; Oxtoby, M. J.; Yada, A.; Zoubga, A. Reingood, A. and Broome, C. 1992. Detection of meningitis epidemics in Africa: A population based analysis. *Internat. J. Epidemiol.* 21: 155 - 162.
- 13 Saez Nieto, J. A.; Marcos, C. y Casal, J. 1988. Diez años de meningitis meningocócica en España (1978 - 1987). Actividad del Laboratorio de Referencia de Meningococo y comentarios epidemiológicos sobre la onda actual. Monografía. Instituto Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.
- 14 Stroffolini, T. and Carbonari, P. 1989. Meningococcal disease in Italy. *Eur. J. Epidemiol.* 1982, 8: 114 - 116.
- 15 Caugant, D. A.; Froholm, L. O.; Bovre, K.; Holten, E.; Frasch, C. E.; Mocca, L. F.; Zollinger, W. D. and Selander R. K. 1987. Intercontinental spread of *Neisseria meningitidis* clones of the ET5 complex. *Antoine Van Leeuwenhoek. J. Microbiol.* 53: 359 - 394.