



Genotipos de *Neisseria meningitidis* aislados de pacientes con enfermedad meningocócica en Paraguay, 1996–2015

María Eugenia León,¹ Aníbal Kawabata,¹ Minako Nagai,¹ Liliana Rojas,¹ Gustavo Chamorro,¹ y Grupo del laboratorio VIMENE Paraguay²

Forma de citar León ME, Kawabata A, Nagai M, Rojas L, Chamorro G, Grupo del laboratorio VIMENE Paraguay. Genotipos de *Neisseria meningitidis* aislados de pacientes con enfermedad meningocócica en Paraguay, 1996–2015. Rev Panam Salud Publica. 2019;43:e10. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2019.10>

RESUMEN **Objetivo.** Describir las características fenotípicas y genotípicas de cepas de *Neisseria meningitidis* aisladas de enfermedad meningocócica en Paraguay entre 1996 y 2015.

Métodos. Se estudiaron por métodos microbiológicos convencionales y técnicas moleculares 114 aislamientos de *N. meningitidis* y 12 muestras clínicas sin aislamiento confirmadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que fueron remitidas por los diferentes centros centinelas y centros colaboradores de Paraguay.

Resultados. El grupo de edad más afectado fue el de menores de 1 año (19,0%), seguido por el de 1 a 5 años (17,5%). Un mayor porcentaje de las cepas se aisló de casos de meningitis (81,7%) y el serogrupo B se encontró en 60,3% de los casos. Los fenotipos más frecuentes fueron B:4:P1.14 (16,0%), B:15:P1.5, C:NT:NST y W:NT:P1.2 (10,5%), respectivamente. Los complejos clonales prevalentes fueron ST-11/ET37 complex 29,6% (8/27) con predominio del serogrupo W (6/8), ST-35 complex 18,5% (5/27) en el serogrupo B (4/4), y ST-32/ET5 complex 14,8% (4/16) en el serogrupo B (5/5).

Conclusiones. En Paraguay la enfermedad meningocócica es relativamente infrecuente. Los análisis de distribución de serogrupo muestran que el más frecuente es el B y en los últimos dos años aumentaron los casos de enfermedad meningocócica por C y W. Los complejos clonales encontrados se correlacionan con los hallados en la región del Cono Sur. Debido al alto nivel de virulencia de *N. meningitidis*, su vigilancia debe constituir una prioridad estratégica de los sistemas de salud pública nacionales y regionales para prevenir brotes epidémicos y apoyar la toma de decisiones en salud pública.

Palabras clave: *Neisseria meningitidis*; enfermedad meningocócica; reacción en cadena de la polimerasa; tipificación de secuencias multilocus; Paraguay.

¹ Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay. La correspondencia se debe dirigir a María Eugenia León. Correo electrónico: maruleonayala@hotmail.com

² Integrantes del Grupo: Dra. Gloria Gómez, Hospital Nacional de Itauguá, Dra. Noemí Zárate, Hospital General Pediátrico Niños de Acosta Ñu, Dra. Juana Ortellado, Hospital de Clínicas San Lorenzo, Dra. Mirian Leguizamón, Instituto de Previsión Social, Dra. Raquel Blasco, Hospital Regional Ciudad del Este, Dr. Juan Irala, Instituto

de Medicina Tropical, Dra. Rosana Ortiz, Bacteriología Asistencial (LCSP), Dr. Gustavo Rodríguez, Hospital de Trauma y Dra. Rossana Franco, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente (INERAM).

Neisseria meningitidis (meningococo) fue aislada por primera vez en 1887 por Anton Weichselbaum en líquido cefalorraquídeo (LCR) de un paciente e

identificada como causa de la meningitis (1). Es parte de la microbiota comensal en el tracto respiratorio superior del ser humano. Sin embargo, ocasionalmente puede invadir el torrente sanguíneo y causar meningitis y septicemia. Alrededor de 10% de las personas infectadas tiene un desenlace fatal y entre 15 y 19% sobrevive con secuelas graves (2). Los seres

humanos son el único reservorio conocido. Se transmite de persona a persona por la inhalación de secreciones respiratorias o por contacto directo. En torno a 10% de la población es portadora del meningococo en la nasofaringe (3) sin que cause enfermedad alguna y en otros casos es causante de la enfermedad invasiva grave con una tasa alta de morbilidad y mortalidad.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año se notifican aproximadamente 500 000 casos de meningitis en el mundo, con 50 000 muertos y 60 000 pacientes con secuelas permanentes, ya sea por casos endémicos o por epidemias limitadas y ello afecta tanto a los países desarrollados como en desarrollo. La mayor carga de enfermedad meningocócica (EM) corresponde a una zona del África subsahariana conocida como el «cinturón de la meningitis», que se extiende del Senegal al oeste hasta Etiopía al este. Es la causa más frecuente de meningitis bacteriana en el mundo occidental, sobre todo en aquellos países que han introducido la inmunización universal contra *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* tipo b (4).

N. meningitidis se clasifica de acuerdo con la composición de su cápsula en 13 serogrupos. La mayoría de las EM son causadas por organismos pertenecientes a los serogrupos A, B, C, Y y W (2, 5). Las proteínas de la membrana externa son clave en la patogenia y en la clasificación inmunológica y permiten identificar serotipos y subtipos según sus proteínas Por B y Por A, respectivamente. La serotipificación es de gran importancia para el desarrollo de estrategias de vacunación. Los meningococos tienen la capacidad de intercambiar el material genético responsable de la producción de la cápsula y, por lo tanto, pueden experimentar cambio de serogrupo. Este fenómeno se observa en epidemias y no epidemias y, además, la bacteria utiliza otros mecanismos para lograr la variación antigénica (6).

Los serogrupos A, B, y C producen la mayoría de los casos a escala mundial y los serogrupos B y C son responsables de la mayor parte en Europa y América. El serogrupo B es causa de enfermedad endémica en los Estados Unidos de América (1). Los serogrupos A y C predominan en Asia y África. El serogrupo X está restringido a zonas del África subsahariana (7). En Colombia, Brasil, Uruguay, Argentina, Cuba y Chile el serogrupo B ha sido durante años el serogrupo prevalente y la

causa de brotes de EM (8–10). El serogrupo W ha sido causa de brotes en Arabia Saudita y en varios países europeos después de la peregrinación anual a la Meca (Hajj) en 2000 (11). En los últimos años, la enfermedad ha afectado a América Latina, especialmente a Argentina, Brasil, Chile y Uruguay (12). Las razones de la distribución de los serogrupos a nivel mundial no son muy conocidas, pero es posible que la inmunidad de la población y factores ambientales estén asociados con este fenómeno. Existen vacunas de polisacáridos capsulares contra los serogrupos A, C, Y y W que han demostrado eficacia de 75 a 90% en adultos y en niños en edad escolar (13). Según informes de la OMS, en el África subsahariana se redujo la incidencia de casos de EM por serogrupo A hasta 99% gracias al WHO-PATH Meningitis Vaccine Project (MenAfrivac) (14). Debido a que el polisacárido del grupo B es poco inmunogénico en humanos, las vacunas del grupo B no pueden basarse en polisacáridos capsulares. Los brotes del serogrupo B tienden a ser clonales, lo que ha permitido desarrollar vacunas de vesículas de membrana externa que se dirigen a la cepa del brote. Estas vacunas se han desarrollado y usado con éxito en Nueva Zelanda (MenZB) (15) y en Cuba (VA-MENGOC-BC) y esta última fue utilizada en el brote epidémico ocurrido en Uruguay (Santa Lucía-Canelones) en 2001 (12) y en Colombia (16) con muy buenos resultados. Recientemente se han introducido nuevas vacunas contra meningococo B (Bexsero y Trumemba), aunque no se han evaluado en brotes epidémicos.

Los pacientes con EM deben tratarse con antibióticos eficaces por la gravedad de la enfermedad. El uso masivo de antimicrobianos derivó en la aparición de resistencias bacterianas, sobre todo en pacientes pediátricos. En los últimos años la sensibilidad reducida a la penicilina G en aislamientos de *N. meningitidis* se ha informado en un gran número de países (17,18). Sin embargo, la resistencia completa solo se ha notificado en un reducido número de ellos.

Laboratorios de referencia realizan la caracterización molecular de cepas de *N. meningitidis* utilizando la técnica de tipificación de secuencias multilocus (MLST) (en inglés, *multilocus sequence typing*), que actualmente es el enfoque más utilizado para estudiar la biología de poblaciones y la evolución de microorganismos. Este

método consiste en un esquema de tipificación basado en la secuenciación de fragmentos de ADN de siete genes conservados y su clasificación en linajes (secuencia tipo, ST). Las ST estrechamente relacionadas se denominan complejos clonales (CC) (19). Esta técnica ha ganado amplia aceptación para caracterizar los brotes y determinar si se deben a una única cepa que circula en la comunidad, así como para identificar cepas hipervirulentas (12). La vigilancia centinela de la enfermedad invasiva meningocócica se inició en Paraguay en 1996 como parte de la vigilancia de las enfermedades de notificación obligatoria. La naturaleza dinámica de esta enfermedad requiere una vigilancia constante, que proporciona datos para la formulación de vacunas y la monitorización del impacto de las vacunas después de su introducción.

El objetivo de este estudio fue describir las características fenotípicas y genotípicas de *N. meningitidis* causantes de enfermedad meningocócica en Paraguay en el periodo comprendido entre 1996 y 2015.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio observacional de corte transversal, que abarcó el período entre 1996 y 2015. Los centros centinela y los centros colaboradores de Paraguay remitieron 114 aislamientos de *N. meningitidis* y 12 muestras clínicas (de LCR y de sangre) sin aislamiento bacteriano y confirmadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Todas estas muestras analizadas fueron recolectadas a través del sistema de vigilancia centinela en los centros centinela y los centros colaboradores: Hospital Nacional de Itauguá (HNI), Instituto de Previsión Social (HCIPS), Instituto de Medicina Tropical (IMT), Hospital General Pediátrico (HGP), Hospital de Clínicas, Hospital Regional Ciudad del Este (HRCDE), Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente (INERAM), Hospital de Clínicas (H. Clínicas), Centro de Emergencias Médicas (CEM), Sanatorio La Costa, MeyerLab, Hospital Regional Pilar y Sanatorio Migone. El Laboratorio Central de Salud Pública participa en el Sistema de Redes de Vigilancia de los Agentes Bacterianos Responsables de Neumonías y Meningitis, SIREVA II, coordinado por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), para llevar a cabo la vigilancia de cepas

de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *N. meningitidis* en el laboratorio. El caso se define como el aislamiento de *N. meningitidis* de un fluido corporal normalmente estéril en pacientes de cualquier edad.

Las muestras de LCR y de sangre se sembraron en placas de agar sangre de carnero al 5% y en agar chocolate, se incubaron a 35 °C en una atmósfera enriquecida con CO₂ al 5% y se examinó el crecimiento típico de *N. meningitidis* a intervalos de 24, 48 y 72 horas. Las placas que no exhibían crecimiento típico se descartaron después de 72 h.

La identificación se efectuó por métodos microbiológicos de rutina con los procedimientos estándar del laboratorio (20), con coloración de Gram (Britania, Argentina), producción de citocromo-oxidasa (dihidrocloruro de N, N, N', N'-tetrametil-p-fenilendiamina, 1%, Becton Dickinson Microbiology Systems), catalasa y utilizando carbohidratos (glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, fructosa).

El serogrupo se determinó mediante aglutinación en portaobjetos con antisueños comerciales contra polisacáridos capsulares meningocócicos (DIFCO, Beckton Dickinson, USA) y PCR para todos los aislamientos.

La caracterización de los serotipos y serosubtipos de 19 cepas aisladas de LCR (11/19) y sangre (8/19) se realizó por la técnica de Dot Blot (21) con células enteras y anticuerpos monoclonales (Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil), incluyendo 6 serotipos (1, 2a, 2b, 4, 15 y 21) y 13 subtipos (P1.1, P1.2, P1.4, P1.5, P1.6, P1.7, P1.9, P1.10, P1.12, P1.13, P1.14, P1.15, P1.16). Las cepas que no mostraron reacción positiva frente a los anticuerpos monoclonales de serotipo y serosubtipo se clasificaron como no tipables (NT) y no subtipables (NST).

Todas las cepas viables confirmadas fueron sometidas a análisis de susceptibilidad *in vitro* para penicilina y ceftriaxona. Se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante el método de epsilometría (bioMérieux) según los estándares del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) vigentes (22).

La identificación por PCR de *N. meningitidis* se basó en la amplificación del gen *crgA* utilizando partidores específicos y empleando secuencias ya descritas (23). El *crgA* genera un producto de 230 pb (pares de bases) cuya presencia indica un

resultado positivo. Para caracterizar el serogrupo, se realizó una PCR múltiple con oligonucleótidos en el gen *siaD* (serogrupos B, C, Y y W) y en el gen *orf-2* requerido para la biosíntesis de la cápsula del serogrupo A (23). Los tamaños de los amplicones esperados para esta PCR múltiple son 400 pb (serogrupo A), 450 pb (serogrupo B), 250 pb (serogrupo C), y 120 pb (serogrupos Y y W). Para cada serogrupo se realizó una PCR adicional con objeto de confirmar el resultado y para discriminar los serogrupos W e Y para los cuales el tamaño del amplicón fue de 120 pb.

El estudio de caracterización genética se realizó por MLST, porque permite identificar y diferenciar los distintos linajes genéticos que componen la estructura poblacional en una base de datos (<http://pubmlst.org/>). Para *N. meningitidis* se analizaron 7 locis: *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdh* y *pgm* (24). Para las reacciones de secuenciación se utilizaron kits de secuenciación de ciclo BigDye Terminator (Applied Biosystems) y el secuenciador de ADN (analizador genético 3130, Applied Biosystems). Los cebadores, así como la designación de las secuencias tipo (ST) y complejos clonales (CC), se obtuvieron del sitio web PubMLST. Se caracterizaron en total 27 cepas correspondientes a los años del periodo comprendido entre 2009 y 2015 aisladas en LCR (n = 16) y en la sangre (n = 11).

Los datos obtenidos en el estudio se introdujeron en una base de datos en formato Excel y los análisis estadísticos se realizaron con el Programa Stata 11.0 (StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 11. College Station, TX: StataCorp LP), cuyo acceso estaba restringido únicamente a las personas directamente involucradas en la vigilancia. Luego se procedió a la limpieza de la base de datos, se controlaron todas las variables y se compararon con las fichas epidemiológicas de los participantes.

Este estudio se limita a la descripción de los datos y no incluye ningún análisis estadístico inferencial. Se realizaron los cálculos de proporciones de frecuencias absolutas y de porcentajes. Las variables analizadas fueron la edad y el sexo de los pacientes, código de identificación de la muestra, institución, tipo de muestra (LCR y sangre), fecha de toma de muestra, diagnóstico, microorganismo (confirmado fenotípica o genotípicamente como compatible con *Neisseria meningitidis*), serogrupo de *N. meningitidis* (A, B,

C, Y, W, X, Z), sensibilidad a la penicilina, sensibilidad a la ceftriaxona, y complejo clonal (linaje genético de la cepa de *N. meningitidis*).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Laboratorio Central de Salud Pública (CEI) con el dictamen CEI-LCSP N°: 45. La confidencialidad de los datos que consignan a la persona se respetaron en todo momento y únicamente los investigadores pudieron acceder a los datos referidos.

RESULTADOS

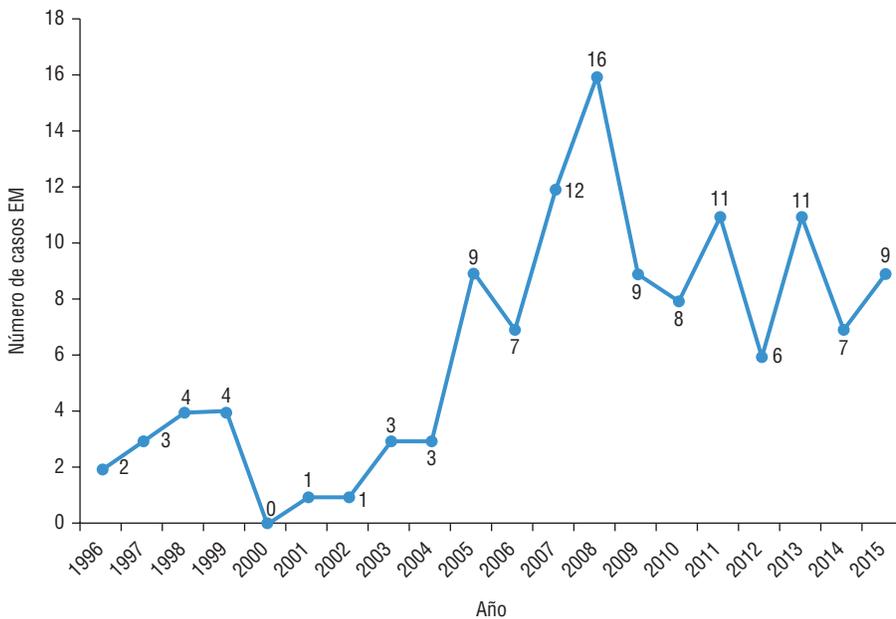
Durante el período de estudio comprendido entre 1996 y 2015 el Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP) confirmó un total de 126 casos de EM por *N. meningitidis*. El mayor número de casos se registró en 2008 (n = 16) (figura 1). Los casos positivos a EM se identificaron a partir de muestras clínicas de LCR (n = 86), sangre (n = 37) y en ambos fluidos (n = 3). El serogrupo B prevaleció en la mayoría de los años que abarca este estudio y en los dos últimos años (2014 y 2015) se vio un ligero aumento de los serogrupos W y C (cuadro 1). El 81,7% (103/126) de los casos se ha diagnosticado como MBA, 15,9% (20/126), como sepsis, y 2,4% (3/126), como MBA con sepsis simultáneamente (cuadro 2). Los servicios de salud que más casos de enfermedad meningocócica notificaron fueron el Instituto de Medicina Tropical de Asunción (31,8%), el Hospital Regional de Ciudad del Este (14,3%) y en el departamento Central, el Hospital de Clínicas (12,7%), el Hospital General Pediátrico (12,7%) y el Hospital Nacional de Itauguá (9,5%).

El mayor número de casos se observó en el grupo de 0 a 5 años, con 36,5% (n = 46) del total de casos notificados por grupos de edad, seguido por el grupo de 15 a 20 años (16,7%, n = 17) y el grupo de 46 a 50 años, con la menor frecuencia de la enfermedad (0,8%, n = 1). El 51,6% (65/126) de los casos de EM se diagnosticó en varones.

La mediana de la edad de los hombres fue 11, con valores intercuartílicos de 1 y 20 años. En las mujeres fue de 13 con valores comprendidos entre 1 y 29 años. La edad mínima en los hombres fue de 1 día y la máxima de 97 años y en las mujeres, de 1 mes y 69 años respectivamente.

El estudio de susceptibilidad se realizó en todos los aislamientos bacterianos

FIGURA 1. Distribución de los 126 casos de enfermedad meningocócica (EM) por año, Paraguay, 1996–2015



Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay.

viables (n = 112). La sensibilidad a la penicilina ascendió a 88,0% (n = 98), el 12,0% (n = 14) fue de sensibilidad intermedia y no hubo ningún aislamiento

resistente (cuadro 3). El 60,0 % (n = 9) de los aislamientos con sensibilidad intermedia a penicilina corresponden al serogrupo B y el 50,0% (7/14) fueron aislados

de pacientes pediátricos (menores de 5 años). Todos los aislamientos fueron sensibles a ceftriaxona (n = 112).

La caracterización fenotípica por Dot Blot mostró que 58,0% (11/19) de los aislamientos estudiados resultaron no tipables (NT), en los serogrupos B (4/11), C (3/11), Y (2/11) y W (2/11), 21,0% (4/19) correspondió al serotipo 4, y 11,0% (2/19), al serotipo 1 y al serotipo 15, respectivamente. Prevalció como subtipo el no subtipable (NST) con 37,0% (7/19), seguido por los subtipos P1.5 con 21,0% (4/19), P1.14 con 16,0% (3/19), P1.2 con 11,0% (2/19), y P1.2,5, P1.16 y P1.2,16 con 5,0% (1/19), respectivamente. Los fenotipos encontrados con mayor frecuencia fueron B:4:P1.14 con 16,0% (3/19), seguido de B:15:P1.5, C:NT:NST y W:NT:P1.2 con 10,5% (2/19), respectivamente.

Se determinó la secuencia tipo (ST) de 27 aislamientos de meningococo (n = 27), que se agruparon en 8 complejos clonales (CC) distintos: ST-11/ET37 complex, ST-32 complex/ET-5 complex, ST-35 complex, ST 41/44 complex/lineage 3, ST-103 complex, ST-167 complex, ST-865 complex y ST-12722. Los resultados del análisis por MLST indican que los CC prevalentes fueron ST-11/ET37 complex con 29,6% (8/27) y predominio de las

CUADRO 1. Distribución de los 126 casos de enfermedad meningocócica por año, tipo de muestra y serogrupo, Paraguay, 1996–2015

Año	Enfermedad meningocócica		Tipo de muestra						Serogrupo									
			LCR		Sangre		LCR y Sangre		B		C		W		Y		Sin datos	
	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1996	2	0,1	2	100	0	0	0	0	1	50,0	1	50,0	0	0	0	0	0	0
1997	3	0,1	2	66,7	1	33,3	0	0	3	100	0	0	0	0	0	0	0	0
1998	4	0,2	3	75,0	1	25,0	0	0	0	0	4	100	0	0	0	0	0	0
1999	4	0,2	4	100	0	0	0	0	3	75,0	0	0	0	0	0	0	1	25,0
2000	0	0	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2001	1	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0
2002	1	0	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0	0
2003	3	0,1	3	100	0	0	0	0	2	66,7	0	0	1	33,3	0	0	0	0
2004	3	0,1	2	66,7	1	33,3	0	0	2	66,7	0	0	1	33,3	0	0	0	0
2005	9	0,4	7	77,8	2	22,2	0	0	8	88,9	0	0	0	0	1	11,1	0	0
2006	7	0,3	4	57,1	2	28,6	1	14,3	6	85,7	1	14,3	0	0	0	0	0	0
2007	12	0,6	7	58,3	4	33,3	1	8,3	8	66,7	0	0	2	16,7	1	8,3	1	8,3
2008	16	0,8	11	68,8	4	25,0	1	6,3	6	37,5	1	6,3	6	37,5	3	18,8	0	0
2009	9	0,4	3	33,3	6	66,7	0	0	7	77,8	1	11,1	1	11,1	0	0	0	0
2010	8	0,4	6	75,0	2	25,0	0	0	7	87,5	0	0	1	12,5	0	0	0	0
2011	11	0,5	8	72,7	3	27,3	0	0	7	63,6	0	0	3	27,3	1	9,1	0	0
2012	6	0,3	3	50,0	3	50,0	0	0	3	50,0	0	0	1	16,7	2	33,3	0	0
2013	11	0,5	7	63,6	4	36,4	0	0	7	63,6	1	9,1	3	27,3	0	0	0	0
2014	7	0,3	5	71,4	2	28,6	0	0	2	28,6	3	42,9	2	28,6	0	0	0	0
2015	9	0,4	7	77,8	2	22,2	0	0	4	44,4	2	22,2	3	33,3	0	0	0	0
Total	126	6,3	86	68,3	37	29,4	3	2,4	76	60,3	14	11,1	26	20,6	8	6,3	2	1,6

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay.

CUADRO 2. Distribución de los 126 casos de enfermedad meningocócica por diagnóstico clínico y grupo de edad, Paraguay, 1996–2015

Grupo de edad (años)	Frecuencia (%)				Total
	Diagnóstico clínico				
	Meningitis bacteriana aguda	Sepsis	Meningitis bacteriana aguda/Sepsis		
< 1	15 (14,6)	8 (40,0)	1 (33,3)		24
1 - 5	18 (17,5)	3 (15,0)	1 (33,3)		22
6 - 14	15 (14,6)	2 (10,0)	0 (0,0)		17
15 - 20	17 (16,5)	3 (15,0)	1 (33,3)		21
21 - 25	6 (5,8)	2 (10,0)	0		8
26 - 30	11 (10,7)	1 (5,0)	0		12
31 - 35	3 (2,9)	0	0		3
36 - 40	2 (1,9)	0	0		2
41 - 45	3 (2,9)	0	0		3
46 - 50	1 (1,0)	0	0		1
>50	7 (6,8)	0	0		7
Sin datos	5 (4,8)	1 (5,0)	0		6
Total	103 (81,7)	20 (15,9)	3 (2,4)		126

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay.

CUADRO 3. Perfiles de susceptibilidad a la penicilina (según la CIM) en 112 aislamientos de *Neisseria meningitidis* por grupos de edad, Paraguay, 1996–2015

Edad	N	Sensible ^a		Intermedio ^a	
		(n = 98)	%	(n = 14)	%
<12 meses	20	15	75,0	5	25,0
12-23 meses	7	6	85,7	1	14,3
24-59 meses	11	10	90,9	1	9,1
5-14 años	15	14	93,3	1	6,7
15-29 años	35	32	91,4	3	8,6
30-49 años	10	9	90,0	1	10,0
50-59 años	3	3	100	0	0
>60 años	5	3	60,0	2	40,0
Sin datos	6	6	100	0	0
Total	112	98	87,5	14	12,5

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay.

Nota: se aislaron 114 cepas de *N. meningitidis* y dos de ellas no eran viables.

No se detectó ningún caso de resistencia.

^aSensible: CIM \leq 0,6 ug/mL; Intermedio: CIM 0,125 a 1,0 ug/mL; Resistente: \geq 2,0 ug/mL (22).

cepas de *N. meningitidis* serogrupo W (6/8), seguido del CC ST-35 complex con 18,5% (5/27) (5/5) y ST-32 /ET-5 complex con 14,8% (4/27). Ambos CC correspondientes en su totalidad al serogrupo B (4/4) y (5/5), respectivamente.

DISCUSIÓN

En Paraguay la enfermedad meningocócica es relativamente infrecuente. En un año se detectan como máximo 16 casos confirmados (2008). Sin embargo, según los datos disponibles en América Latina, se supone que existen subnotificación y subregistro de la EM. Si bien se ha mejorado la vigilancia de las enfermedades invasivas, es patente la necesidad de mejorar y establecer una

vigilancia más uniforme y de calidad en toda la zona. A partir de 2005, se observó un aumento de los casos de EM, con predominio del serogrupo "B" y un ligero aumento de casos de EM por serogrupos C y W. En Brasil, Argentina, Chile y Uruguay se han descrito tendencias crecientes similares por el serogrupo W desde 2002 (12). El mayor número de casos confirmados de EM se registró en niños de 0 a 5 años, especialmente en menores de 1 año, seguido por los diagnosticados en adolescentes y adultos jóvenes de 15 a 29 años, un fenómeno que se ha observado en varios países (25). La caracterización fenotípica de 19 cepas de *N. meningitidis* arrojó como fenotipos más frecuentes B:4:P1.14, seguido por B:15:P1.5, C:NT:NST y W:NT:P1.2. Estos

fenotipos difieren de los utilizados en las vacunas VA-MENGOC-BC, desarrollada con antígenos de membrana externa de la cepa epidémica tipo B:4:P1.15 combinado con polisacárido del serogrupo C (21), y en la vacuna 4CMenB, que tiene, entre otras proteínas, las de las vesículas de membrana externa tipo B:4:P1.7b,4 (26). No obstante, se trata de una submuestra y los resultados no son representativos. Las limitaciones encontradas en la caracterización fenotípica se basan en la dificultad de mantener un panel completo de anticuerpos monoclonales, y en el rendimiento de la prueba, porque puede dar lugar a un resultado incorrecto. (Un resultado negativo no implica la ausencia del antígeno, ya que estos pueden ser bloqueados por otros componentes de la membrana bacteriana.) Conocer la distribución de los fenotipos de *N. meningitidis* serogrupo B contribuirá a evaluar la posibilidad de incorporar estas nuevas vacunas basadas en proteínas de membrana externa.

La penicilina y las cefalosporinas de tercera generación son los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las EM. En los últimos años, se ha observado sensibilidad *in vitro* intermedia a la penicilina. La disminución de la sensibilidad es gradual y más frecuente en niños que en adultos, lo cual, posiblemente, esté relacionado con la amplia utilización de betalactámicos. Este patrón de susceptibilidad se presenta en otros países de América Latina (27). En este estudio no se registró ningún caso de resistencia total a este antimicrobiano. Todos los aislamientos fueron sensibles a cefalosporinas de tercera generación. No obstante, es importante mantener la vigilancia de la sensibilidad a los antibióticos de primera elección. El análisis genético de las cepas reveló que el complejo clonal ST-11/ET37 complex es el predominante en el serogrupo W (29,6%). ST-11 tiene clones hiperinvasivos que pueden expresar serogrupos C o W y, con menor frecuencia, B o Y. Estas cepas se asocian con tasas de mortalidad particularmente altas y causan brotes como los ocurridos en la década de los sesenta en los Estados Unidos de América por los serogrupos B y C, el brote del serogrupo W asociado al Hajj, que afectó a varios países, y el aumento de la EM endémica por serogrupo W en Brasil y en varios países del Cono Sur (28). Además, se hallaron ST-35 complex

CUADRO 4. Distribución de los 27 complejos clonales de *N. meningitidis* por serogrupos, Paraguay, 1996–2015

Complejos clonales	Serogrupo								Total	
	B		C		W		Y		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%		
ST11/ET37 complex	1	12,5	0	0	6	75,0	1	12,5	8	29,6
ST 32/ET5 complex	4	100	0	0	0	0	0	0	4	14,8
ST 35 complex	5	100	0	0	0	0	0	0	5	18,5
ST 41/44 complex/lineage 3	1	100	0	0	0	0	0	0	1	3,7
ST 103 complex	1	25,0	3	75,0	0	0	0	0	4	14,8
ST 167 complex	0	0	0	0	1	33,3	2	66,7	3	11,1
ST 865 complex	1	100	0	0	0	0	0	0	1	3,7
ST 12722	1	100	0	0	0	0	0	0	1	3,7
Total	14	51,9	3	11,1	7	25,9	3	11,1	27	100,0

Fuente: Laboratorio Central de Salud Pública, Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Asunción, Paraguay.

(18,5%) y ST-32/ET5 complex (14,9%), todos correspondientes al serogrupo B. Ambos CC se han encontrado en casos de EM y en portadores nasofaríngeos (29) y ST-32/ET5 fue causa de brotes en Cuba, Chile, Brasil y Argentina a partir de los años ochenta (30). La distribución clonal de los aislamientos de Paraguay se correlaciona con los datos encontrados en la región. Sin embargo, debido a los pocos aislamientos examinados, los datos deben interpretarse con cierta cautela, ya que una limitación fue no disponer de un secuenciador de ADN y, por ello, fue necesario enviar las cepas al Instituto de Salud Pública de Chile para su caracterización genética.

La incorporación de técnicas moleculares (PCR) en el Laboratorio Central de Salud Pública de Paraguay en 2011 ha sido una herramienta muy importante para confirmar los

casos de sospecha de EM. Sin embargo, es necesario implementar nuevas técnicas como la secuenciación de ADN de los genes *PorA*, especialmente en cepas no subtipables, tipificar secuencias multilocus, que son particularmente útiles para realizar el genotipado, caracterizar completamente los aislamientos de cepas circulantes en el país y ubicarlas en un contexto epidemiológico más amplio, y evaluar objetivamente las intervenciones preventivas disponibles. Se concluye que, debido a la diversidad genética y al alto nivel de virulencia de *N. meningitidis*, su vigilancia debe constituir una prioridad estratégica de los sistemas de salud pública nacionales y regionales para prevenir brotes epidémicos y apoyar la toma de decisiones en salud pública.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Dr. Jorge Fernández Ordenes, jefe

del Sub-departamento Genética Molecular del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), la caracterización molecular (MLST) realizada en su laboratorio, así como a todo el personal del Sub-departamento Genética Molecular del ISP.

Financiación. La realización de este trabajo fue apoyada por subvenciones del Fondo para la convergencia estructural del Mercosur (FOCEM)-Mercosur, convenio FOCEM N°03/11 Proyecto “Investigación, Educación y Biotecnologías Aplicadas a la Salud (COF 03/11).

Conflictos de interés. Los autores declaran que no tienen conflictos de interés.

Declaración. Las opiniones expresadas en este manuscrito son responsabilidad del autor y no reflejan necesariamente los criterios ni la política de la RPSP/ PA-JPH y/o de la OPS.

REFERENCIAS

- Crum-Cianflone N, Sullivan E. Meningococcal Vaccinations. *Infect Dis Ther.* 2016;5(2):89.
- Nadel S. Treatment of meningococcal disease. *J Adolesc Health.* 2016;59(2): 21–8.
- Giancchetti E, Piccini G, Torelli A, Rappuoli R, Montomoli E. An unwanted guest: *Neisseria meningitidis* - carriage, risk for invasive disease and the impact of vaccination with insight on Italy incidence. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2017;15(7):689–01.
- Hedari CP, Khinkarly RW, Dbaibo GS. Meningococcal serogroups A, C, W-135, and Y tetanus toxoid conjugate vaccine: a new conjugate vaccine against invasive meningococcal disease. *Infection and Drug Resistance.* 2014;7:85–99.
- Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S, eds. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.* 13th ed. Washington, DC: Centers for Disease Control and Prevention, Public Health Foundation; 2015.
- Bartley SN, Mowlaboccus S, Mullally CA, Stubbs KA, Vrieling A, Maiden MC, et al. Acquisition of the capsule locus by horizontal gene transfer in *Neisseria meningitidis* is often accompanied by the loss of UDP-GalNAc synthesis. *Sci Rep.* 2017;7:44442.
- Agnememel A, Hong E, Giorgini D, Nuñez-Samudio V, Deghmane A-E, Taha M-K. *Neisseria meningitidis* Serogroup X in Sub-Saharan Africa. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(4):698–702.
- Pinzón-Redondo H, Coronell-Rodríguez W, Díaz-Martínez I, Guzmán-Corena Á, Constenla D, Alvis-Guzmán N. Estimating Costs Associated with a Community Outbreak of Meningococcal Disease in a Colombian Caribbean City. *J Health Pop Nutr.* 2014;32(3):539–48.
- Whelan J, Bambini S, Biolchi A, Brunelli B, Robert-Du Ry van Beest Holle M. Outbreaks of meningococcal B infection and the 4CMenB vaccine: Historical and future perspectives. *Expert Rev Vaccines.* 2015;14: 713–36.
- Borrow R, Lee JS, Vázquez JA, Enwere G, Taha MK, Kamiya H, et al. Meningococcal

- disease in the Asia-Pacific region: Findings and recommendations from the Global Meningococcal Initiative. *Vaccine*. 2016; 34(48):5855–62.
11. Yezli S, Assiri AM, Alhakeem RF, Turkistani AM, Alotaibi BM. Meningococcal disease during the Hajj and Umrah mass gatherings. *Int J Infect Dis*. 2016;47:60–4.
 12. Pelton S. The Global Evolution of Meningococcal Epidemiology Following the Introduction of Meningococcal Vaccines. *J Adolesc Health*. 2016;59(2):3–11.
 13. Roger B, Reisinger K, Block SL, Izu A, Odriljin T, Dull P. Antibody Persistence and Booster Response of a Quadrivalent Meningococcal Conjugate Vaccine in Adolescents. *J Pediatrics*. 2014;164(6): 1409–15.
 14. Diallo AO, Soeters HM, Yameogo I, Sawadogo G, Aké 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.
 15. Stein-Zamir C, Shoob H, Sokolov I, Kunbar A, Abramson N, Zimmerman D. The clinical features and long-term sequelae of invasive meningococcal disease in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2014;33(7):777–9.
 16. Ochoa-Azze R, García-Imia L. Efectividad de la vacuna VA-MENGOC-BC® contra cepas heterólogas de meningococo B. *Vaccimonitor*. 2016;25(2):43–8.
 17. Organización Panamericana de la Salud. Informe Regional de SIREVA II, 2013. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Documentos técnicos. Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades Epidémicas (HSD/IR). Washington, DC: OPS; 2014.
 18. Organización Panamericana de la Salud. Informe Regional de SIREVA II, 2014. Datos por país y por grupos de edad sobre las características de los aislamientos de *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Neisseria meningitidis* en procesos invasores. Documentos técnicos. Regulaciones Sanitarias Internacionales, Alerta y Respuesta y Enfermedades Epidémicas (HSD/IR). Washington, DC: OPS; 2015.
 19. Mustapha MM, Marsh JW, Krauland MG, Fernández JO, de Lemos APS, Dunning Hotopp JC, et al. Genomic Epidemiology of Hypervirulent Serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. *EBioMedicine*. 2015;2(10):1447–55.
 20. Manual de Laboratorio para la Identificación y Prueba de Susceptibilidad a los Antimicrobianos de Patógenos Bacterianos de Importancia para la Salud Pública en el Mundo en Desarrollo. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, USAID, CDC; 2004.
 21. Moreno J, Sanabria O, Saavedra SY, Rodríguez K, Duarte C. Phenotypic and genotypic characterization of *Neisseria meningitidis* serogroup B isolates from Cartagena, Colombia, 2012–2014. *Biomed*. 2015;35(1):138–43.
 22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 25th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
 23. Taha M-K. Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 2000;38(2):855–7.
 24. Read RC. *Neisseria meningitidis*; clones, carriage, and disease. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):391–5.
 25. Vetter V, Baxter R, Denizer G, Sáfadi MA, Silfverdal SA, Vyse A, et al. Routinely vaccinating adolescents against meningococcus: targeting transmission & disease. *Expert Rev Vaccines*. 2016;15(5):641–58.
 26. O’Ryan M, Stoddard J, Toneatto D, Wassil J, Dull PM. A multi-component meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB): The clinical development program. *Drugs*. 2014;74(1):15–30.
 27. Araya P, Díaz J, Seoane M, Fernández J, Terrazas S, Canals A, et al. Vigilancia de laboratorio de enfermedad meningocócica invasora en Chile, 2006–2012. *Rev Chil Infectol*. 2014;31(4):377–84.
 28. Lucidarme J, Hill DMC, Bratcher HB, Gray SJ, du Plessis M, Tsang RSW, et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect*. 2015;71(5):544–52.
 29. Moreno J, Hidalgo M, Duarte C, Sanabria O, Gabastou JM, Ibarz-Pavon AB. Characterization of Carriage Isolates of *Neisseria meningitidis* in the Adolescents and Young Adults Population of Bogota (Colombia). *PLOS ONE*. 2015;10(8):e0135497.
 30. Harrison OB, Bray JE, Maiden MCJ, Caugant DA. Genomic Analysis of the Evolution and Global Spread of Hyperinvasive Meningococcal Lineage 5. *EBioMedicine*. 2015;2(3) 234–43.

Manuscrito recibido el 10 de octubre de 2017 y aceptado para publicación, tras revisión, el 4 de julio de 2018.

ABSTRACT

Genotypes of *Neisseria meningitidis* isolates in patients with meningococcal meningitis in Paraguay, 1996–2015

Objective. Describe the phenotypical and genotypical characteristics of *Neisseria meningitidis* isolates from cases of meningococcal disease in Paraguay between 1996 and 2015.

Methods. Conventional microbiological methods and molecular techniques were used to study 114 isolates of *N. meningitidis* and 12 clinical samples without isolation (confirmed by polymerase chain reaction), provided by various sentinel centers and collaborating centers in Paraguay.

Results. The most affected age group was children under 1 year (19.0%), followed by 1-5-year-olds (17.5%). The highest percentage of strains was isolated in meningitis cases (81.7%) and serogroup B was found in 60.3% of cases. The most frequent phenotypes were B:4:p1.14 (16.0%), B:15:p1.5, C:nt:nst, and W:nt:p1.2 (10.5%), respectively. The prevalent clonal complexes were: ST-11/ET37 complex, 29.6% (8/27), predominantly serogroup W (6/8); ST-35 complex, 18.5% (5/27), in serogroup B (4/4); and ST-32/ET5 complex, 14.8% (4/16), in serogroup B (5/5).

Conclusions. Meningococcal meningitis is relatively uncommon in Paraguay. Distribution analysis showed that serogroup B is the most common and that the number of cases of meningococcal disease caused by serogroups C and W increased in the last two years. The identified clonal complexes were correlated with those found in the Southern Cone region. Due to the high virulence of *N. meningitidis*, its surveillance should be a strategic priority of national and regional public health systems to prevent epidemic outbreaks and support public health decision-making.

Keywords

Neisseria meningitidis; meningococcal disease; polymerase chain reaction; multilocus sequence typing; Paraguay.

RESUMO

Genótipos de *Neisseria meningitidis* isolados de pacientes com doença meningocócica no Paraguai, 1996–2015

Objetivo. Descrever as características fenotípicas e genotípicas de cepas de *Neisseria meningitidis* isoladas de casos de doença meningocócica no Paraguai entre 1996 e 2015.

Métodos. Foram estudados por métodos microbiológicos convencionais e técnicas moleculares 114 isolados de *N. meningitidis* e 12 amostras clínicas sem isolamento confirmadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) enviados por diferentes centros-sentinelas e centros colaboradores do Paraguai.

Resultados. A faixa etária mais afetada foi a de crianças menores de 1 ano (19,0%) e crianças de 1 a 5 anos (17,5%). Uma maior porcentagem de cepas foi isolada de casos de meningite (81,7%) e o sorogrupo B foi identificado em 60,3% dos casos. Os fenótipos mais comuns foram B:4:P1.14 (16,0%), B:15:P1.5, C:NT:NST e W:NT:P1.2 (10,5%), respectivamente. Os complexos clonais mais prevalentes foram o complexo ST-11/ET37 (29,6%, 8/27) com predomínio no sorogrupo W (6/8), complexo ST-35 (18,5%, 5/27) no sorogrupo B (4/4) e complexo ST-32/ET5 (14,8%, 4/16) no sorogrupo B (5/5).

Conclusões. A doença meningocócica é relativamente pouco comum no Paraguai. A análise da distribuição dos sorogrupos demonstrou que o sorogrupo B é o mais prevalente e, nos últimos dois anos, houve um aumento nos casos de doença meningocócica pelos sorogrupos C e W. Os complexos clonais encontrados se correlacionam com os achados na região do Cone Sul. Devido à alta virulência da *N. meningitidis*, a vigilância deste agente deve ser uma prioridade estratégica dos sistemas de saúde pública nacionais e regionais para prevenir surtos epidêmicos e subsidiar a tomada de decisão em saúde pública.

Palavras-chave

Neisseria meningitidis; doença meningocócica; reação em cadeia da polimerase; tipagem de seqüências multilocus; Paraguai.