

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Microbiología



TESIS DOCTORAL

**Los marcadores antigénicos de neisseria meningitidis : su
aplicación en la vigilancia epidemiológica y control de la
meningitis meningocócica en España**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan Antonio Sáez Nieto

Madrid, 2015

TP
1985

043

Juan Antonio Sáez Nieto



X-53-013288-4

LOS MARCADORES ANTIGENICOS DE NEISSERIA MENINGITIDIS.
SU APLICACION EN LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA Y CONTROL
DE LA MENINGITIS MENINGOCOCICA EN ESPAÑA

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1985



BIBLIOTECA

Colección Tesis Doctorales. Nº

43/85

© Juan Antonio Sáez Nieto
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 28015 Madrid
Madrid, 1985
Xerox 9400 X 721
Depósito Legal: M-6316-1985

LOS MARCADORES ANTIGENICOS DE Neisseria meningitidis.
SU APLICACION EN LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA Y CONTROL
DE LA MENINGITIS MENINGOCOCICA EN ESPAÑA.

VºBº El ponente,



FDO. PROF. DR. D. DIMAS
FERNANDEZ GALIANO. CATE
DRATICO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE CIENCIAS BIO
LOGICAS. UNIVERSIDAD COM
PLUTENSE DE MADRID.

TESIS PRESENTADA PARA
OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
POR
D. JUAN ANTONIO SAEZ NIETO
MADRID, OCTUBRE de 1.982.



ESTA TESIS HA SIDO REALIZADA EN EL SERVICIO DE BACTERIOLOGIA DEL CENTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA, VIROLOGIA E INMUNOLOGIA SANITARIAS DE MAJADAHONDA. MADRID. BAJO LA DIRECCION DEL DR. D. RAFAEL NAJERA MORRONDO.

V^oB^o EL DIRECTOR,



Dr. D. Rafael Najera Morrondo
Director del C.N.M.V.I.S.

A MIS PADRES,
MI MUJER Y
MIS HIJOS.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Rafael Nájera Morrondo, por la dirección de esta tesis. Así mismo deseo expresar mi agradecimiento al Jefe de Servicio de Bacteriología del Centro, Julio Casal por "descubrirme" el meningococo como objeto principal de estudio a lo largo de estos años y por su constante estímulo y ayuda, así como a Cecilia Martín Bourgon, Jefe de Sección del mismo Servicio. También deseo agradecer la inestimable colaboración de Asunción Fenoll en la puesta en marcha del Laboratorio de Referencia de Meningococos y la excelente asistencia técnica de Carmen Marcos y Alicia Fernández.

Hago extensivas las gracias a mis restantes compañeros del Servicio de Bacteriología y de forma muy especial a otros colegas y amigos del Centro por su ayuda y opiniones sobre mi trabajo, Alicia Llacer (Servicio de Epidemiología), Blanca García Barreno y Cecilio López Galíndez (Laboratorio de Investigación Viroológica) y Julio Vázquez, colaborador del laboratorio de neisserias.

También deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Dimas Fernández Galiano por aceptar presentar este trabajo y por su revisión del manuscrito.

I N D I C E

=====

VI.

<u>INTRODUCCION</u>	1
1.- <u>LA ENFERMEDAD: MENINGITIS CEREBROESPINAL EPIDEMICA.</u>	2
1.1.- Historia.	2
1.2.- Aspectos clínicos.	4
1.3.- Aspectos epidemiológicos.	6
1.3.1.- Morbilidad y Mortalidad.	6
1.3.2.- Modo de transmisión	7
1.3.3.- Portadores.	8
2.- <u>EL MICROORGANISMO: Neisseria meningitidis.</u>	11
2.1.- Su situación dentro del género <u>Neisseria.</u>	11
2.2.- Identificación y diferenciación de otras neisserias.	12
2.3.- Estructura antigénica y clasificación se rológica del meningococo.	17
2.3.1.- Antígenos capsulares: polisacárido (serogrupos).	17
2.3.2.- Antígenos no capsulares: proteínas (serotipos).	20
2.3.3.- Antígenos no capsulares: lipopoli- sacáridos y pili.	23
2.4.- Factores de virulencia y relaciones huesped parásito.	26
2.4.1.- Proteasa específica de IgA.	26
2.4.2.- Lipopolisacárido.	27
2.4.3.- Adherencia a las células epiteliales	27
2.4.4.- Virulencia relacionada con la acti- vidad bactericida del suero	28

VII.

2.4.5.- Resistencia a la fagocitosis.	29
2.4.6.- Otros factores de virulencia.	30
2.5.- Inmunidad natural y adquirida.	31
3.- <u>LA MENINGITIS MENINGOCOCICA EN EL MUNDO.</u>	33
3.1.- América.	33
3.2.- Africa y Asia.	37
3.3.- Europa.	39
4.- <u>LA MENINGITIS MENINGOCOCICA EN ESPAÑA.</u>	42
4.1.- Las ondas epidémicas desde 1.940.	43
4.2.- La onda epidémica actual (1.978-1.981)	44
5.- <u>PROFILAXIS Y CONTROL DE LA INFECCION MENINGOCOCICA.</u>	48
5.1.- Estado actual de la vigilancia epidemiológica y el control de la infección meningocócica.	48
5.2.- Quimioprofilaxis.	51
5.3.- Inmunoprofilaxis.	54
5.3.1.- Vacunas polisacáridas.	54
5.3.2.- Vacunas protéicas.	55
<u>OBJETIVOS</u>	58
<u>MATERIAL Y METODOS</u>	61
1.- <u>REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO Y APARATOS.</u>	62
2.- <u>CEPAS DE Neisseria meningitidis y N. lactamica.</u>	64
2.1.- Procedencia de las cepas.	64
2.2.- Crecimiento, transporte y conservación.	66

VIII.

3.- <u>AISLAMIENTO DE CEPAS DE PORTADORES Y PRUEBAS DE IDENTIFICACION.</u>	67
3.1.- Aislamiento de cepas en portadores.	67
3.2.- Pruebas de actividad enzimática.	68
3.3.- Pruebas de utilización de azúcares.	68
4.- <u>SEROGUPADO.</u>	70
4.1.- Producción de sueros serogrupo-específicos.	70
4.2.- Aglutinación en porta.	71
4.3.- Agar anti-suero.	71
5.- <u>SEROTIPADO.</u>	73
5.1.- Producción de sueros serotipo-específicos.	73
5.2.- Extracción de antígenos.	74
5.3.- Serotipado (Inmunodifusión doble en gel).	74
6.- <u>ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.</u>	75
6.1.- Preparación de soluciones de trabajo.	76
6.2.- Preparación de placas.	77
6.3.- Proceso de electroforesis.	78
6.4.- Obtención de patrones y controles de peso molecular.	80
7.- <u>PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.</u>	80
7.1.- Estudio de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de sulfadiazina.	80
7.2.- Estudio de las CMIs de antibióticos: penicilina, ampicilina, cloranfenicol, rifampicina, minociclina y espiramicina.	82

IX.

RESULTADOS =====	84
1.- Distribución por edades y sexos de los casos confirmados bacteriológicamente en la onda epidémica actual.	85
1.1.- Distribución etaria.	85
1.2.- Distribución por sexos.	85
2.- Serogrupos de los meningococos aislados de enfermos	85
2.1.- Distribución temporal.	85
2.2.- Distribución geográfica.	86
2.3.- Distribución etaria.	96
3.- Serogrupos de los meningococos de portadores.	96
4.- Resistencia a sulfadiazina de las cepas aisladas de enfermos y portadores.	102
4.1.- CMIs en cepas de enfermos.	102
4.2.- CMIs en cepas de portadores.	102
4.3.- CMIs de sulfadiazina y serogrupos.	103
5.- Serotipos de meningococo B aislados de enfermos y portadores.	109
5.1.- Distribución de serotipos en enfermos.	109
5.2.- Distribución de serotipos en portadores.	110
5.3.- Serotipos y CMIs de sulfadiazina.	110
6.- Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida.	111
7.- Estudios de susceptibilidad a antibióticos de las cepas de meningococo aisladas de enfermos y portadores	117

X.

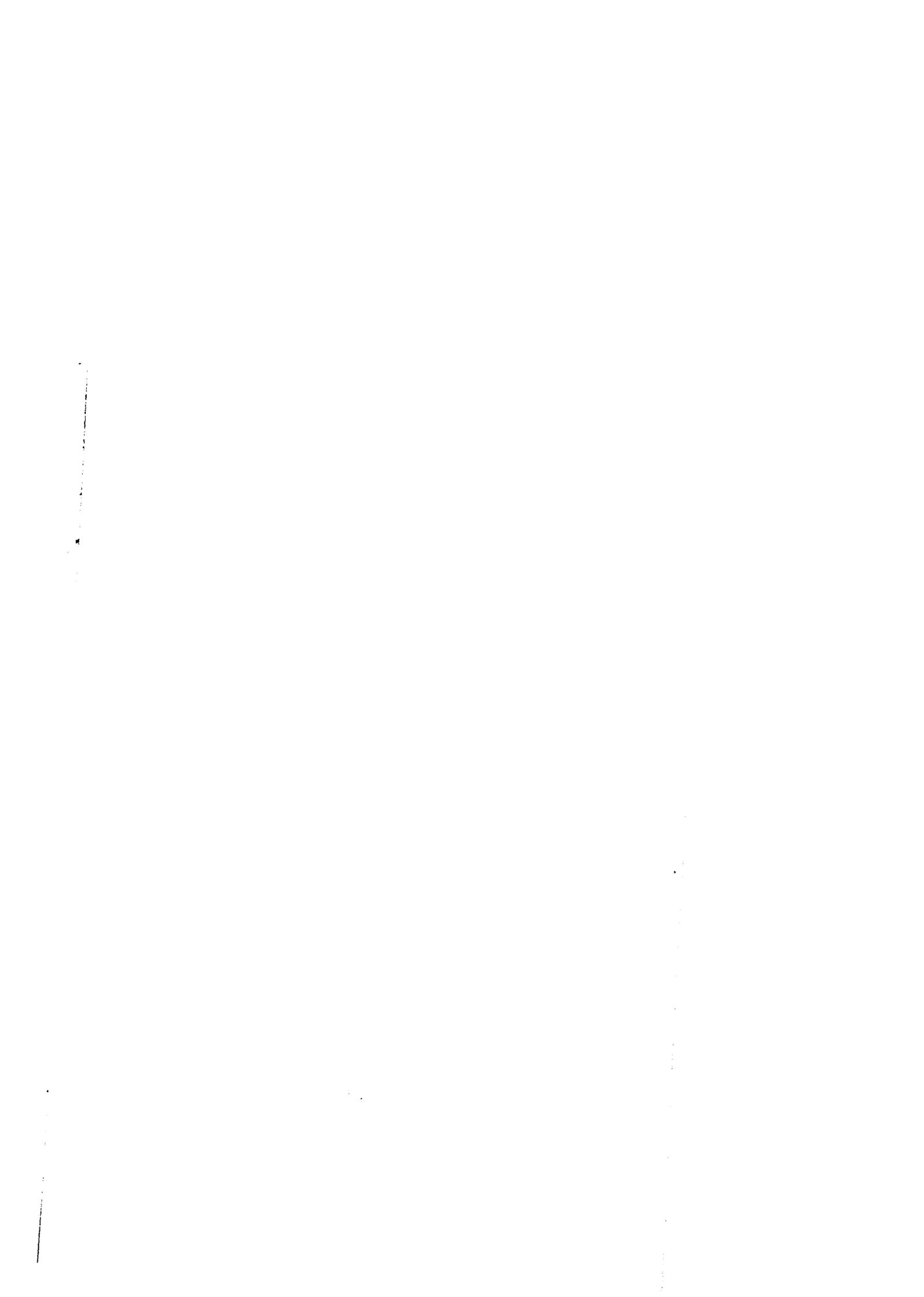
7.1.- Muestreo de vigilancia epidemiológica de sensibilidad a 0,1 µg./ml. de penicilina, ampicilina y rifampicina.	117
7.2.- CMIs de cepas sensibles a 0,1 µg./ml. de los antibioticos anteriores.	117
7.2.1.- CMIs y serogrupos.	118
7.3.- CMIs de cepas resistentes a 0,1 µg./ml. de ampicilina y rifampicina.	118
7.3.1.- CMIs y serogrupos.	119
7.4.- CMIs de cepas aisladas de enfermos frente a otros antibióticos.	126
7.4.1.- Cloranfenicol.	126
7.4.2.- Minociclina.	126
7.4.3.- Espiramicina.	126
8.- Cepas atípicas de meningococo aisladas de enfermos y portadores, durante la onda epidémica actual.	130
8.1.- Serogrupos y serotipos de las variantes maltosa negativas.	130
8.2.- CMIs de sulfadiazina.	131
9.- Estudio de prevalencia de cepas aisladas de enfermos y de sus contactos familiares.	135
9.1.- Proporción de portadores dentro de los grupos familiares.	135
9.2.- Serogrupos y serotipos de las cepas aisladas de enfermos y de sus contactos.	136
9.3.- CMIs de sulfadiazina.	137

XI.

10.- Estudio de localización de serotipos virulentos en poblaciones infantiles.	144
10.1.- Distribución de <u>N. lactamica</u> y <u>N. meningitidis</u> en portadores.	144
10.2.- Serogrupos y serotipos aislados.	145
10.3.- CMIs de sulfadiazina y sensibilidad a antibióticos.	145
10.4.- Reactividad cruzada de <u>N. lactamica</u> con sueros antimeningocócicos.	145
10.5.- Evaluación del método agar anti-suero como técnica de serogrupado directo de meningococos y detección de reactividad cruzada de <u>N. lactamica</u> .	147
11.- Estudio de un brote de infección meningocócica.	154
11.1.- Cronología del brote.	154
11.2.- Marcadores epidemiológicos de las cepas aisladas de enfermos y portadores.	155
11.3.- Estudio de portadores en una guardería libre de casos.	156
<u>DISCUSION</u>	160
1.- Características de la onda epidémica actual en relación con el agente causal.	162
2.- Distribución de serogrupos en enfermos y portadores.	164
3.- Serotipos protéicos aislados de enfermos y portadores.	168

XII.

4.- Resistencias a sulfadiazina y su relación con los marcadores antigénicos.	173
5.- Susceptibilidad a antibióticos y su relación con los marcadores antigénicos.	177
6.- Algunas consideraciones sobre quimioprofilaxis en el control de la infección meningocócica en nuestro país.	181
7.- Cepas atípicas de meningococo.	184
8.- Estudios de prevalencia de cepas aisladas de contactos familiares de enfermos, epidemiológicamente relacionadas con las aisladas en éstos.	187
9.- Localización de serotipos virulentos en poblaciones susceptibles de adquirir la infección meningocócica.	191
10.- El problema diagnóstico y epidemiológico de <u>N. lactamica</u> en encuestas de portadores de meningococo.	195
11.- Caracterización de un brote de infección meningocócica en una guardería infantil.	199
12.- Algunas consideraciones sobre nuestro sistema de vigilancia epidemiológica y medidas de control de la infección en España.	201
<u>RESUMEN Y CONCLUSIONES</u>	203
<u>FOTOGRAFÍAS</u>	210
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	214



I

I N T R O D U C C I O N
=====

1.- LA ENFERMEDAD: MENINGITIS CEREBROESPINAL EPIDEMICA.

1.1.- HISTORIA.

La primera descripción de la meningitis meningocócica ó meningitis cerebroespinal epidémica, fué realizada por VIEUSSEUX en 1.805, al estudiar una epidemia que tuvo lugar en Ginebra en ese mismo año. Al año siguiente la enfermedad apareció en Massachusetts (U.S.A.) y durante años posteriores atacó al ejército prusiano en varios lugares de Europa.

Desde entonces, la infección fué invadiendo nuevos países y se extendió a todos los continentes, a veces en proporciones epidémicas seguidas de periodos de latencia, pero reapareciendo inevitablemente en brotes de mayor ó menor intensidad. A lo largo del tiempo, la enfermedad ha sufrido un incremento paulatino, tanto en su distribución geográfica como en el número de casos.

De acuerdo con los datos aportados por HIRSCH en 1.886, se pueden establecer varios periodos de prevalencia de la enfermedad en varias partes del globo, durante el siglo pasado:

- 1.805-1.830 Prevalencia en Norteamérica.
- 1.837-1.850 Prevalencia en Francia y países nórdicos.
- 1.854-1.874 Extensión a toda Europa y América.
- 1.875- Extensión a los demás continentes.

Durante este periodo son destacables, debido a su alta incidencia, las epidemias de Francia (1.877) y la de Inglaterra-U.S.A. (1.906).

En la actualidad, Africa cuenta con la mayor zona hiperendémica, denominada "cinturón de la meningitis" (LAPEYSSONIE, 1.963). Esta zona, que se circunscribe al Norte del Ecuador y limita con el Desierto del Sahara, está constituida por los estados de Níger, Togo, Dahomey, Alto Volta, Nigéria, Chad y Sudán. Esta región, que engloba una población de 30.000.000 de habitantes, desde 1.939 hasta nuestros días ha registrado alrededor de 1.000.000 de casos con unas 150.000 muertes. Esta zona es, en el presente siglo, la región mas importante en cuanto a asentamiento de la enfermedad; en el resto del mundo, aunque existen ciertos niveles de endemia, no se alcanzan las proporciones antes señaladas.

En España, los primeros datos que hacen referencia a la enfermedad meningocócica son los de MAS y MAGRA de 1.901 y los mas detallados de MARAÑON, RUIZ-FALCO, MARTINEZ-VARGAS y MATA (1.910-1.912). El desarrollo de las ondas epidémicas que se han producido en España durante el presente siglo se comentará en otro apartado de esta introducción.

1.2.- ASPECTOS CLINICOS.

El término "meningitis" describe una afección inflamatoria de las membranas que recubren el Sistema Nervioso Central (meninges), la cual puede aparecer como enfermedad primaria ó secundariamente a otra infección en otro lugar del organismo. Este síndrome puede ser causado por gran número de microorganismos, de hecho por prácticamente todas las bacterias patógenas, muchos virus y ocasionalmente, algunos hongos y protozoos.

La meningitis cerebroespinal epidémica cuyo agente causal es el meningococo, es una de las manifestaciones más frecuentes de la infección producida por este microorganismo.

El espectro de las manifestaciones clínicas de la infección meningocócica va desde la colonización asintomática de la nasofaringe, hasta el Síndrome de Waterhouse-Friderichsen, caracterizado por una evolución fatal de pocas horas. Entre ambos extremos, la forma más común, junto con el estado de portador en nasofaringe, es la meningitis aguda, que afecta particularmente a la base del cerebro.

Otros cuadros que aparecen tras la infección meningocócica son: rinfaringitis, infección generalizada acompañada de septicemia, artritis, endocarditis y otras.

La forma común (meningitis aguda), presenta un periodo de incubación de 2 a 10 días y se caracteriza clínicamente por un ataque súbito con fiebre, cefalea intensa, náuseas, vómitos, rigidez de nuca y rash, entre otros síntomas. La muerte, si ocurre, suele tener lugar dentro de los primeros cinco días. Entre las complicaciones más habituales, pueden aparecer

sordera, poliartritis e hidrocefálea.

En los exámenes post-mortem en casos agudos, se puede observar inflamación de las meninges (pia-aracnoidea) y exudado purulento en la base del cerebro y en el vertex. En las formas crónicas, las circumbalaciones cerebrales aparecen unidas pudiendo existir hidrocefálea. Por último, en las formas fulminantes, aparecen abundantes hemorragias en piel y destrucción de las cápsulas suprarrenales.

En cuanto a las rutas de infección seguidas por el meningococo, hoy no existe duda de que el microorganismo penetra en el organismo a través de la nasofaringe. Sin embargo aun se discute el camino por el cual accede a las meninges. Existen dos teorías sustentadas por un buen número de autores, la primera postula la entrada directa del meningococo de la nariz a las meninges, a través de las estructuras anatómicas adyacentes (bulbo olfatorio, espacio subaracnoideo) (FAIRBROTHER, 1.947); la segunda, sustentada por numerosos autores europeos y americanos establece la ruta hematógica como fase intermedia en la llegada a las meninges.

Ambas hipótesis se apoyan en datos objetivos que permiten aventurar que las dos rutas pueden ser utilizadas en la invasión del organismo.

1.3.- ASPECTOS EPIDEMIOLOGICOS.

1.3.1.- Morbilidad y Mortalidad.

Las dos características más importantes de la infección meningocócica son su baja morbilidad y su elevada mortalidad. Como en el caso de la poliomielitis, un número muy pequeño de individuos que se infectan con el microorganismo, padecen la enfermedad (es necesario señalar, que al referirnos al término "infección meningocócica", lo hacemos teniendo en cuenta desde la colonización en nasofaringe hasta los cuadros fulminantes, esta aclaración se hace extensiva al resto de la memoria en que repetiremos este concepto con frecuencia).

La mortalidad, antes de la introducción de las sulfamidas en el caso de la meningitis aguda con ó sin sepsis, se situaba entre el 40 y el 90 por ciento, mientras que en la actualidad es de un 10% (si desglosamos la mortalidad, en los casos de meningitis sin sepsis no sobrepasa del 2-3% y con sepsis alrededor del 8%).

La distribución temporal de la enfermedad presenta un máximo en invierno-primavera y un número mínimo de casos en verano. Las edades con mayor prevalencia de casos se sitúan entre los 3 meses y los 5 años, a excepción de Africa, en que es más frecuente entre los 10 y 15 años (LAPEYSSONIE, 1.963).

Poblaciones susceptibles son los mineros y las poblaciones militares (DOPTER, 1.921) y en general comunidades cerradas, tales como internados, guarderías, cuarteles y los contactos familiares de los enfermos.

GOETERS en 1.954, explicó la mayor incidencia en mineros no como consecuencia de su profesión, sino fundamentalmente por sus condiciones socioeconómicas, de sus viviendas y también por estar sometidos a cambios bruscos de temperatura y presión atmosférica. En cuanto a las poblaciones militares explicó, que al proceder muchos de ellos de áreas rurales, donde habitualmente no existen niveles de endemia, muchos de los individuos no habían tenido oportunidad de una inmunización natural por contacto con el microorganismo en nasofaringe, además de estar sujetos a un trabajo físico intenso.

1.3.2.- Modo de transmisión de la enfermedad.

La enfermedad meningocócica es endémica en las grandes ciudades, en las cuales, incluso en periodos de baja incidencia aparecen casos esporádicos. Cada invierno y primavera, aparecen nuevos casos afectando generalmente a niños y adultos jóvenes no relacionados entre sí. En áreas rurales el estado endémico es prácticamente desconocido.

En epidemias mas intensas la transmisión de la enfermedad es irregular, incluso caprichosa (probablemente influyen factores individuales ó familiares de susceptibilidad, ambientales ó de otro tipo).

Es frecuente que ciertos grupos, debido a su situación pueden aparecer como especialmente susceptibles, y sin embargo escapan a la enfermedad, mientras que otros, alejados del foco inicial pueden sufrir la enfermedad.

Sucede algo similar, en cuanto a los casos producidos a lo largo del tiempo en una epidemia, ya que pueden sucederse remisiones ó brotes extensos sin solución de continuidad.

La declinación de una epidemia de forma natural (sin intervención de medidas profilácticas, tales como vacunas ó quimioprofilaxis), se produce de forma lenta, desapareciendo los focos y recobrándose el estado endémico inicial (DOPTER, 1.921).

Como ya hemos indicado, es importante la especial susceptibilidad de las poblaciones militares a la enfermedad siendo frecuente la aparición de casos en guarniciones y no registrándose casos en las poblaciones civiles cercanas. Ya en 1.886, HIRSCH, estudiando 75 brotes producidos en Francia observó que 39 de ellos se produjeron en poblaciones militares.

1.3.3.- Portadores.

Mucho antes de conocerse el agente causal de la enfermedad, ya se admitía el importante papel del hacinamiento de las poblaciones en la aparición de casos.

En estudios de autopsias se observó la presencia de rinitis purulenta; observaciones posteriores sugirieron que la nasofaringe podría ser una puerta de entrada del microorganismo responsable de la enfermedad.

Cuando WEICHSERBAUM en 1.887 mencionó que uno de los

casos de meningitis por él estudiados presentaba sinusitis purulenta, se sugirió la vía nasal de entrada de la infección meníngea. En numerosos trabajos posteriores, se aisló el meningococo de nasofaringe, no solo de enfermos, sino de portadores sanos, tanto de contactos familiares de enfermos como de población no relacionada con casos (ALBRECHT y GOHN, 1.901; SCOTT, 1.916; OSTERMAN, 1.906). Todos estos estudios permitieron establecer que el meningococo era capaz de vivir en la nasofaringe humana sin producir meningitis y que puede ser transmitido de pacientes a personas sanas en contacto.

Durante el periodo de 1.914 a 1.918, se realizaron muchos estudios que contribuyeron a un mejor conocimiento del papel desempeñado por los portadores en la transmisión de la enfermedad. En muestras de nasofaringe tomadas de poblaciones militares, en periodos previos a un brote, se observó que aumentaba considerablemente el número de portadores. En las tomas mas cercanas al brote, el % de portadores alcanzaba el 30%. En otras ocasiones el % de portadores puede llegar hasta el 90% de la población. Estos casos han sido corroborados posteriormente en estudios en los que se comparó el % de portadores en periodos epidémicos e interepidémicos, observando que los porcentajes eran significativamente mayores en los primeros.

Otros factores antes indicados tales como el hacinamiento hacen pensar en un mayor intercambio de flora nasofaríngea y con ello una mayor transmisión del meningococo, pero no está claro que este intercambio aumente el riesgo siempre, de un aumento del número de enfermos y portadores.

En trabajos posteriores en que comenzaban a utilizarse ciertos marcadores epidemiológicos en las cepas aisladas de enfermos y portadores tales como los serogrupos, se demostró que el grado de virulencia de los meningococos era variable según el serogrupo (BRANHAM, 1.940), además de variar el grado de susceptibilidad de las poblaciones.

Por último en una revisión sobre las evidencias del papel de los portadores en la transmisión de la enfermedad, AYCOCK y MUELLER (1.950) concluyeron que la prevalencia de la meningitis meningocócica, no es una simple función de la proporción de portadores en una determinada población, sino que es más importante una serie de variaciones que puedan afectar al huésped.

Como veremos más adelante, existen factores de virulencia en el microorganismo que juegan un papel importante en la transmisión de la enfermedad.

2.- EL MICROORGANISMO: Neisseria meningitidis (meningococo).

2.1. Su situación dentro del género Neisseria.

El género Neisseria (TREVISAN, 1.885), está constituido por bacterias cocáceas de 0,6 a 1 micra de \varnothing , apareciendo fundamentalmente en parejas, con las zonas adyacentes achatadas. La pared celular es del tipo gramnegativo. No forman esporas, no son móviles y algunas especies pueden poseer cápsula ó pili. Algunas especies pueden necesitar nutrientes complejos para su crecimiento. Son bacterias quimiorganotrofas y utilizan un número reducido de carbohidratos. Son aerobias ó anaerobias facultativas y su temperatura óptima de crecimiento es 37°C. Poseen actividad de catalasa y citocromo-oxidasa. Su tanto por ciento de guanina-citosina se sitúa entre 47 y 52 moles %. Son parásitas de las membranas mucosas de mamíferos (REYN, 1.974).

Las especies admitidas dentro del género son 10:

N. meningitidis, N. gonorrhoeae, N. sicca, N. mucosa,
N. subflava, N. lactamica, N. flavescens, N. cinerea,
N. animalis y N. desnitificans.

Con excepción de N. meningitidis y N. gonorrhoeae (gonococo), agente este último de la gonorrea y otras afecciones del tracto genital, el resto de las neisserias, no producen habitualmente patología, salvo casos excepcionales y se localizan en la nasofaringe humana, a excepción de las dos últimas que se han aislado de cobayo.

2.2.- Identificación del meningococo y diferenciación de otras neisserias.

El meningococo, como causante de septicemia y meningitis puede ser aislado, de sangre, líquido cefalorraquídeo y nasofaringe de forma mas abundante que en otras localizaciones, tales como: conjuntiva, petéquias, líquido sinovial y otros.

Dependiendo del lugar en que se busque el proceso será algo distinto:

a) Zonas habitualmente estériles (LCR ó sangre).

Los pasos a seguir se describen en el ESQUEMA 1.

b) Zonas con flora bacteriana acompañante (nasofaringe).

Para la eliminación de la flora acompañante del meningococo, se han desarrollado varios medios selectivos, siendo el mas usado en sus diversas variantes el descrito por THAYER y MARTIN en 1.966, consistente en un agar chocolate al que se le añade una mezcla de antibióticos (Vancomicina, Nistatina y Colimicina), que inhiben el resto de la flora. En este medio se inhiben todas las neisserias saprofitas a excepción de N. lactamica, la cual como veremos mas adelante tiene cierto interes en relación con la epidemiología del meningococo en portadores.

Para diferenciar esta neisseria del meningococo se debe recurrir a las pruebas bioquímicas que se utilizan habitualmente para diferenciar los miembros de este género y que se

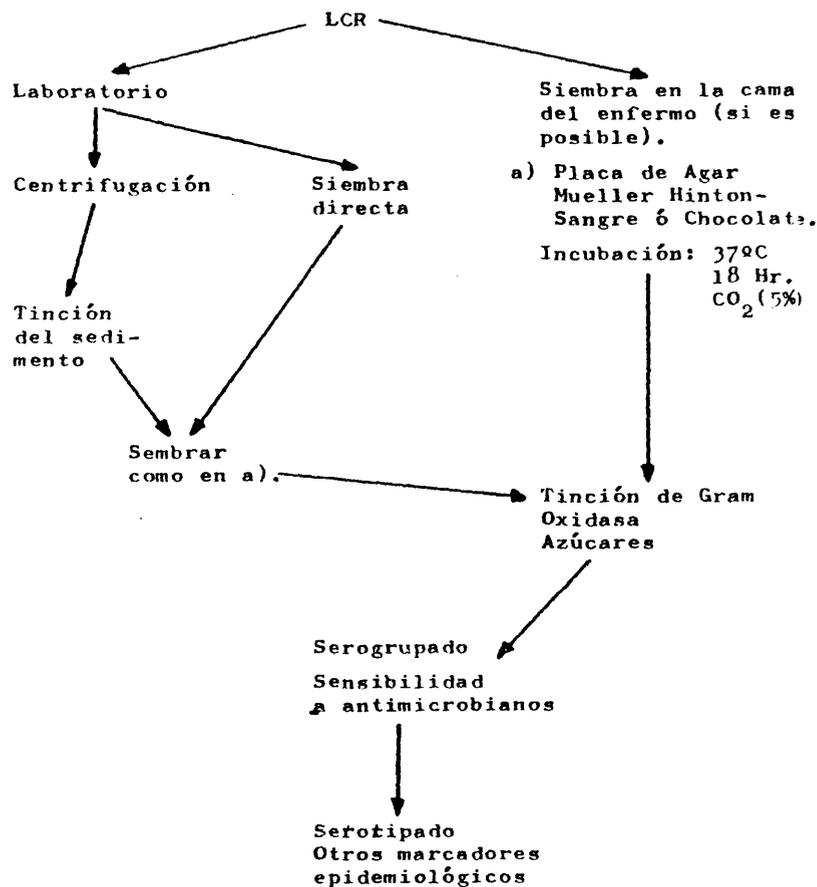
resumen en el ESQUEMA 3 (REYN, 1.974).

Estas pruebas son fundamentalmente, la producción de ácido con algunos azúcares (lactosa, glucosa, maltosa y sacarosa), la reducción de nitratos y la producción de pigmento. A estas pruebas se añaden otras que tienen el carácter confirmativo en el caso de identificaciones dudosas; reducción de nitritos, producción de polisacárido con 5% de sacarosa, DNAsa y LIPASAs.

Como ya hemos indicado, previamente a estas pruebas la diferenciación ya se orienta hacia los dos grandes grupos, el de neisserias patógenas y N. lactamica por un lado y el resto de las neisserias por otro, mediante el crecimiento ó no en medios selectivos, crecimiento a 22º y requerimientos nutritivos especiales ó no (sangre, suero, etc.).

En la actualidad, en que los conceptos taxonómicos están cambiando y se cuestiona el concepto de especie desde el punto de vista fenotípico, se han introducido otras pruebas de diferenciación que nos dan una caracterización mas exacta de las especies dentro del género y nos dan datos sobre las cepas dentro de una misma especie; estas pruebas son, la determinación de la actividad de aminopeptidasas, análisis celular de ácidos grasos, transformación genética, composición de bases del DNA y pruebas de hibridación de ácidos nucleicos (VEDROS, 1.981).

ESQUEMA 1.- SISTEMATICA DE ESTUDIO DE MENINGOCOCOS EN MUESTRAS HABITUALMENTE ESTERILES.



ESQUEMA 2.- SISTEMATICA DE BUSQUEDA DE MENINGOCOCOS EN NASOFARINGE.

Exudado nasofaríngeo



Siembra en medio de Thayer-Martin

Incubación: 37°C
18 hr.
CO₂ (5%)



Aislamiento en Agar Mueller Hinton-sangre



Tinción
Oxidasa
Azúcares



Serogrupo
Sensibilidad a antimicrobianos



Serotipado
Otros marcadores epidemiológicos

ESQUEMA 3.- DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DEL
GENERO NEISSERIA.

Grupo A

Crece en medio de Thayer-Martin
No crece en agar común
No crece a 22°C

lactosa positivo	<u>N. lactamica</u>
lactosa negativo	
Maltosa positivo	<u>N. meningitidis</u>
Maltosa negativo	<u>N. gonorrhoeae</u>

Grupo B

No crece en medio Thayer Martin
Crece en agar común
Crece a 22°C

No utilizan azúcares	
Producción de polisacárido con 5% de sacarosa	<u>N. flavescens</u>
No producen polisacárido	<u>N. cinerea</u>
Utilización de azúcares	
Producción de pigmento	<u>N. subflava</u>
No producen pigmento	
Reducen los nitratos	<u>N. mucosa</u>
No reducen "	<u>N. sicca</u>

2.3.- ESTRUCTURA ANTIGENICA Y CLASIFICACION SEROLOGICA DEL MENINGOCOCO.

2.3.1.- Antígenos capsulares: polisacáridos (serogrupos).

Desde que DOPTER en 1.909 encontró diferencias serológicas entre los meningococos aislados de nasofaringe, numerosos autores han tratado de clasificar las cepas de meningococo encontradas tanto en enfermos como en portadores. DOPTER y PAURON en 1.914 separaron de los meningococos habitualmente encontrados en brotes, ciertas cepas a las que denominaron alfa, beta y gamma, por las diferencias encontradas por aglutinación.

Después de sucesivas clasificaciones, BRANHAM en 1.953, publicó una revisión muy completa relacionando todas las clasificaciones propuestas hasta 1.950, en que el Subcomité de nomenclatura propone la existencia de 4 grupos denominados por las primeras mayúsculas del alfabeto (A,B,C y D).

A partir de esa fecha se relacionaron estos grupos con casos esporádicos, brotes y epidemias, estudiándose la frecuencia de los mismos en portadores sanos.

Fué en 1.961, cuando SLATERUS, con la ayuda de técnicas de microprecipitación describió tres nuevos grupos cuyas cepas no se podían incluir en los grupos ya descritos. Estos nuevos grupos los denominó provisionalmente X, Y y Z, nomenclatura que persiste hasta nuestros días. Este mismo autor en 1.963, analizando los serogrupos aislados en Holanda en un periodo no epidémico, describió un nuevo grupo llamado Z'.

En 1.968, HOLLIS y cols. en un estudio de verificación de la existencia de las cepas descritas por SLATERUS en U.S.A., propuso que los grupos descritos por éste se denominaran E, F y G respectivamente. En ese mismo año EVANS y cols. describieron tres nuevos serogrupos que denominaron Bo, 29E y W135. Estudios posteriores determinaron que las cepas Bo eran serológicamente idénticas a las cepas Y de SLATERUS.

También en el mismo año, VEDROS, NG y CULVER describieron un nuevo serogrupo llamado E, que en la actualidad se sabe que es idéntico a las cepas Bo y a las del grupo Y.

Por último en estudios realizados por DEVINE y HAGERMAN en 1.970, se demostró la identidad de las cepas 29E y Z; observación corroborada posteriormente por FALLON en 1.976.

A continuación se resumen las descripciones de los diferentes serogrupos hasta la actualidad:

Comite 1.950	Slaterus	Evans	Vedros	Hollis	Actual
A	A	A			A
B	B	B			B
C	C	C			C
D	D	D			D
	X			E	X
	Y	Bo	E	F	Y
	Z			G	Z
	Z'	29E			29E
		135			W135

A la clasificación actual se deben añadir los posibles nuevos serogrupos descritos en China por SHAO-QUING y cols. en 1.981, aislados de portadores sanos y denominados por estos autores H, I y K.

La evidencia de la naturaleza polisacárida de los antígenos que determinan el serogrupo, ya fué establecida por SHERP y RAKE en 1.935, al estudiar la composición del antígeno determinante de la especificidad del meningococo I (mas tarde le nominado A).

En años posteriores se desarrollaron abundantes trabajos de purificación y análisis químico de los polisacáridos capsulares, incluso algunos de ellos encaminados a estudiar la utilidad de estos antígenos en la protección frente a la infección. Podemos destacar, los trabajos de KABAT y cols., 1.945 y los de WATSON y SHERP en 1.958. Pero a partir de la década de los 60 es cuando se realizan los estudios mas detallados, lle gándose en la actualidad a conocer perfectamente la composición química de los polisacáridos capsulares de los diferentes serogrupos. Esta composición se señala a continuación:

<u>Serogrupos</u>	<u>Unidad que se repite</u>	
A	N-acetil, O-manosamina 6-P	(alfa 1-6)
B	Acido N-acetil neuramínico	(alfa 2-8)
C*	Acido N-acetil neuramínico también O-acetil	(alfa 2-9)
D	Desconocida	
X	N-acetil glucosamina 4-P	(alfa 1-4)
Y	Acido N-acetil, O-acetil Neuraminico--Glucosa	(alfa 2-6)
Z	N-acetilgalactosamina-- glicerol-P	
29E	Acido 3 deoxymanooculosonico --N-acetil galactosamina	(beta 1-3)
W135	Acido N-acetil neuramínico --galactosa	(alfa 2-6)

* El serogrupo C ha sido subdividido recientemente por APICELLA en 1.974. La mayoría de las cepas C, tendrían N y O acetilos (C+) y serían resistentes a la neuraminidasa y una minoría (C-) no poseerían O-acetilos y serían sensibles a dicho enzima.

2.3.2.- Antígenos no capsulares: proteínas.

Los estudios de DOPTER de 1.914, ya describieron la heterogeneidad de los llamados parameningococos; posteriormente algunas observaciones se fueron añadiendo a los conocimientos ya existentes de la heterogeneidad antigénica dentro de los serogrupos de meningococo.

EVANS en 1.920, utilizando pruebas de fagocitosis, distinguió lo que él llamó cinco tropín-tipos, los cuales encontró dentro de los grupos A, B y D. SILVERTHORNE en 1.935, mediante pruebas bactericidas, observó la actividad cepa-específica en sueros de enfermos.

Posteriormente, WILSON (1.956), dedujo que la mayoría de las cepas poseían un antígeno tipospecífico somático añadido al de serogrupo. En un estudio detallado realizado por ROBERTS en 1.967, estudiando la interacción in vitro, entre meningococos del grupo B, factores del suero y eritrocitos, encontró que los anticuerpos bactericidas y las opsoninas presentaban especificidad de serotipo, además de la de serogrupo.

Posteriormente GOLDSNEIDER y cols. (1.969) determinaron al menos la existencia de 5 serotipos dentro del grupo C,

estos antígenos los denominaron, antígenos de reacción cruzada.

Las observaciones anteriores, fueron ampliadas por GOLD y WYLE en 1.970, quienes determinaron la existencia de 4 serotipos dentro del grupo C que denominaron I, II, III y IV.

En un estudio posterior del mismo autor (1.971), estudiando 143 cepas de meningococo C aisladas de enfermos, encontró un porcentaje elevado de cepas del serotipo II; siendo el primer trabajo en que la serotipia se utilizó como marcador epidemiológico, describiendo además dos nuevos serotipos V y VI.

Pero fueron FRASCH y CHAPMAN en 1.972, los que en sucesivos trabajos, utilizando una prueba microbactericida, establecieron un esquema definitivo de serotipos dentro del serogrupo B. Estos autores describieron 12 serotipos que posteriormente serían ampliados a 15, que fueron designados con números arábigos; en sucesivos estudios y utilizando técnicas similares a las utilizadas para la proteína M de estreptococo A, obtuvieron unos antígenos, lo cuales podían ser estudiados por difusión en gel, demostrando la correlación entre los resultados obtenidos con pruebas bactericidas y los de esta técnica.

La existencia de antígenos tipospecíficos comunes a los grupos B y C, fué demostrada por KASPER y cols. en 1.973 y MUNFORS y cols. en 1.975, estos últimos demostraron la identidad entre el serotipo II del grupo C y el 2 del grupo B, ambos, los más abundantes en aislamientos de enfermos (GOLD y WYLE, 1.970; FRASCH y CHAPMAN, 1.973). Estos serotipos comunes

se han encontrado posteriormente en otros serogrupos (FRASCH y FRIEDMAN, 1.977; ZOLLINGER y MANDRELL, 1.980).

La naturaleza protéica de estos antígenos ya se estableció de forma preliminar por FRASCH y CHAPMAN en 1.972, después se desarrollaron estudios para dilucidar la localización topográfica de estos antígenos, estableciéndose su situación en la membrana externa de la pared celular (FRASCH y GOTSCHLICH, 1.974; ZOLLINGER y MANDRELL, 1.977; FRASCH y cols, 1.976 y FRASCH y LaMOCCA, 1.978).

FRASCH y cols. establecieron en 1.976 el peso molecular de los determinantes antigénicos y se desarrolló una técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, para separar las diferentes proteínas que integran cada serotipo. Mediante este método se estableció que los distintos serotipos estaban determinados por dos ó tres bandas de proteínas mayoritarias. Estos patrones se corresponden con los serotipos encontrados por inmunodifusión:

<u>Serotipos</u>	<u>Patrones</u>
1	IV
2	I,II
2,7	I,II
2,10	I,II
4	IV
5	I
6	III
8(1,3)	IV
9	II
11	V
12	IV
13	VII
14	IX
15	IV

La importancia de los antígenos de serotipo no radica únicamente en su valor como marcadores epidemiológicos, sino que como veremos mas adelante, juegan un importante papel en la inducción de anticuerpos protectores en la infección meningocócica.

En el ESQUEMA 4 se expresa el modelo propuesto por HILL y WEISS en 1.974 y esquematizado por FRASCH en 1.979, de localización de los componentes de la membrana externa de la pared del meningococo.

2.3.3.- Antígenos no capsulares: lipopolisacáridos y pili.

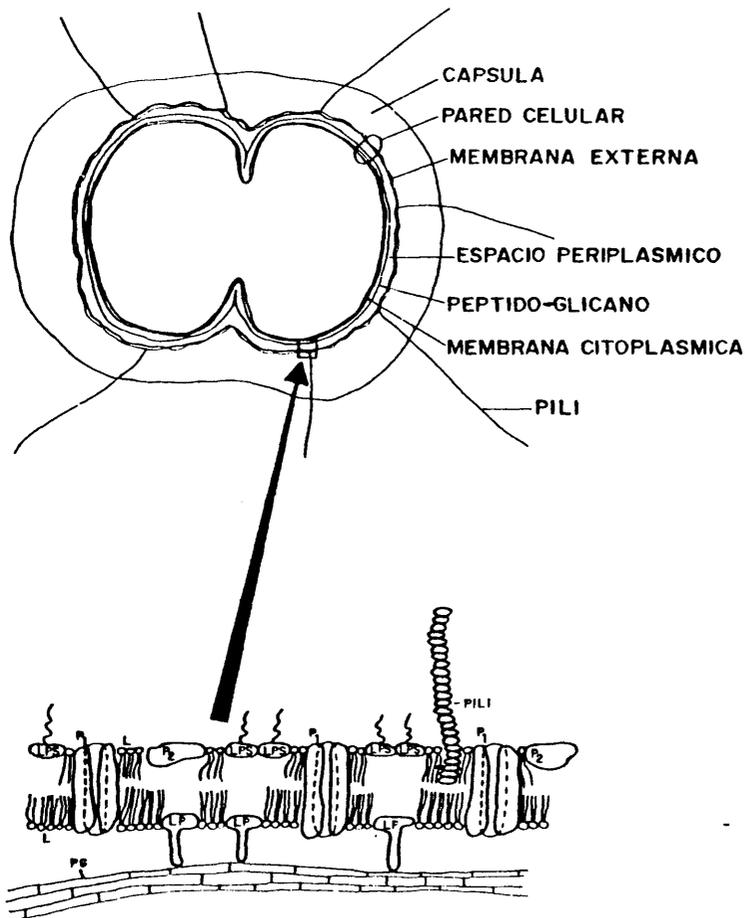
El lipopolisacárido (LPS), se halla en todas las bacterias gramnegativas y se localiza junto con las proteínas en la membrana externa de la pared celular (ESQUEMA 4).

La heterogeneidad de estos antígenos tambien ha sido demostrada en el meningococo y ha servido para establecer un sistema de serotipia, mediante técnicas de inhibición de la hemaglutinación, usando LPSs purificados. Mediante esta técnica MANDRELL y ZOLLINGER en 1.977 describieron 8 LPSs distintos; al mismo tiempo, estos autores desarrollaron una técnica de radioinmunoensayo en fase sólida, con la que demostraron la independencia de estos antígenos con respecto a los antígenos proteicos, así como su localización dentro de los diferentes serogrupos (ZOLLINGER y MANDRELL, 1.977).

Otros intentos de desarrollar sistemas de serotipia para el meningococo se basan en la heterogeneidad antigénica de los pili. Aunque no se ha desarrollado un esquema válido hasta ahora, sin embargo cabe pensar que la diversidad antigénica de los pili sea similar a la encontrada en el gonococo, en el cual se han descrito determinantes antigénicos comunes y tipospecíficos (BUCHANAN, 1.975 y NOVOTNY y TURNEY, 1.975).

ESQUEMA 4

ESTRUCTURA ANTIGENICA DEL MENINGOCOCO



Tomado de Frasch (1979)

25/6/77



FOTOGRAFIA 1.- Aspecto de Neisseria meningitidis
serogrupo B. Tinción negativa.
x 43.000.

2.4.- FACTORES DE VIRULENCIA Y RELACIONES HUESPED - PARASITO.

La virulencia del meningococo es bien conocido que varía desde poca ó nula invasividad hasta la producción de infecciones generalizadas muy graves. Existen una serie de factores que pueden jugar un importante papel en la virulencia de este microorganismo, aunque en la actualidad dicho papel no está totalmente esclarecido, estos factores son entre otros: la producción de proteasas específicas de la fracción IgA, la capacidad de ataque a las células epiteliales de la nasofaringe, la capacidad antifagocitaria de la cápsula y las estructuras de la membrana externa de la pared (proteínas, pili y lipopolisacárido. Estos factores proveen al meningococo de una capacidad de resistencia frente a los factores humorales del huesped. En el caso del LPS, su papel en la virulencia está cuestionado, sin embargo nadie niega su importante papel en la patogénesis de la enfermedad, como constituyente de la endotoxina meningocócica.

2.4.1.- Proteasa específica de IgA.

Un posible factor de virulencia puede ser esta enzima que degrada la subclase IgA₁ de la fracción IgA del suero. Esta enzima se ha encontrado en el meningococo, gonococo y otros microorganismos invasivos. Aunque permanece en discusión su papel en la virulencia, únicamente se ha detectado su actividad en neisserias patógenas (MULKS y PLANT, 1.978), sin embargo en

el caso de cepas de meningococo se ha detectado la actividad de esta enzima tanto en cepas de enfermo como en cepas de portadores.

2.4.2.- Lipopolisacárido.

Este componente, que es producido como hemos dicho por todas las bacterias gramnegativas y que se localiza en la membrana externa de la pared, tiene una variedad de efectos biológicos en el huesped, fundamentalmente en la patogénesis de la infección meningocócica.

Se piensa que puede activar el sistema de complemento, hecho demostrado en enfermos con meningococemia; así mismo puede producir una activación del sistema de coagulación y "disparar" mecanismos que pueden dar lugar a colapsos circulatorios por provocación de coagulaciones intravasculares (ZIMMERMAN y MUELLER, 1.971).

Según estos hechos se admite que el LPS sería un factor mas importante en la patogénesis, después de que se produjera la invasión del organismo por una cepa virulenta.

2.4.3.- Adherencia a las células epiteliales.

El ataque de los microorganismos a las superficies mucosas, supone un importante paso en la invasión del organismo. Las bacterias piliadas, se ha demostrado que se adhieren mejor por lo cual a estas estructuras se las considera como un factor de virulencia de primera línea, particularmente en el gonococo (PUNSALANG y SAWYER, 1.973).

En el meningococo también se ha demostrado la presencia de pili (DeVOE y GILCHRIST, 1.974). Sin embargo estudios realizados por CRAVEN y FRASCH en 1.978, demostraron que cepas capsuladas no piliadas se adherían débilmente a las mucosas, mientras que cepas no capsuladas sean piliadas ó no se adherían fuertemente, esto indicaría que la presencia de cápsula inhibiría la adherencia. Estos autores también demostraron que cepas capsuladas ó no pero piliadas, mostraban significativamente más fuerte adherencia en cepas de portadores que en las procedentes de enfermos. Estos resultados les sugirieron la existencia de otros factores implicados en la adherencia y que podrían ser los antígenos de la pared antes mencionados.

2.4.4.- Virulencia relacionada con la actividad bactericida del suero.

La actividad bactericida del suero es el mecanismo de defensa más importante frente a la infección meningocócica, como demostraron GOLDSCHNEIDER y cols. en 1.969, al comprobar la clara correlación entre la presencia de anticuerpos bactericidas y la protección frente a la enfermedad.

Los anticuerpos bactericidas se producen frente al polisacárido capsular, el LPS y las proteínas de la pared. Se piensa que el conocimiento de los mecanismos que regulen la susceptibilidad de las bacterias a ser lisadas por el suero bactericida, sería el paso más importante en el conocimiento de la virulencia.

Así las cepas no capsuladas son mas susceptibles a la muerte por el suero. Una posible explicación sería el que la ausencia de capsula dejaría al descubierto antígenos comunes, a los existentes en cepas adquiridas previamente en nasofaringe, que permitirían la destrucción del microorganismo mediante los anticuerpos bactericidas y el complemento (FRASCH, 1.979).

Como se ha demostrado, no solo la cápsula es determinante en la susceptibilidad a la destrucción por el suero, ya que se han encontrado, dentro de un mismo serogrupo, cepas con diferentes grados de invasividad. Así dentro del grupo B, existen algunos serotipos considerados mas virulentos fundamentalmente el tipo 2 (FRASCH y CHAPMAN, 1.973) y el 15 (HOLTEN, 1.979); sin embargo otros serotipos, únicamente se han encontrado en portadores, tales como el 6 y el 14 (FRASCH, 1.979).

La explicación de esta variabilidad en la virulencia no está clara aunque se supone una asociación entre el material capsular y las proteínas de serotipo, en la regulación de la susceptibilidad, frente al suero.

2.4.5.- Resistencia a la fagocitosis.

La fagocitosis es un mecanismo de defensa muy importante, con el que cuenta el huésped para enfrentarse a la invasión bacteriana. Por tanto los factores antifagocitarios de un microorganismo, pueden ser importantes en su grado de virulencia. ROBERTS en 1.967 observó que los meningococos del grupo B,

poseían factores antifagocitarios superficiales frente a los leucocitos polimorfonucleares de conejo. Este efecto era tipo-específico y según más adelante comprobó FRASCH (1.979) era debido a las proteínas serotipo-específicas de la pared.

Esta observación concuerda con la obtenida por LEHMAN y SOLBERG (1.980), que describieron esta actividad tipo-específica antifagocitaria en sueros de enfermos con meningococemia.

Fué también ROBERTS en 1.970, el que demostró la existencia de actividad opsonica grupo-específica en sueros de voluntarios vacunados con polisacáridos capsulares purificados de los grupos A y C. Estos resultados simplemente corroboran el papel antifagocitario atribuido a la capsula.

En la actualidad se acepta el papel de los antígenos superficiales en la antifagocitosis, si bien no está totalmente esclarecido el mecanismo de actuación, aunque se ha demostrado que tanto los anticuerpos frente al polisacárido capsular como los específicos de la membrana externa de la pared, pueden actuar como anticuerpos opsonizantes.

2.4.6.- Otros factores de virulencia.

Uno de los factores que en los últimos años está adquiriendo interés dentro de los investigadores, es el requerimiento de hierro para el crecimiento de algunos microorganismos.

PAYNE y FINKELSTEIN (1.978), al estudiar los requerimientos de hierro de diversos microorganismos gramnegativos,

establecieron cuatro clases de bacterias según su grado de virulencia en embrión de pollo. El meningococo pertenece a la clase I, es decir microorganismos cuya virulencia no se ve afectada por la adición de proteínas portadoras de hierro. Según estos autores, el meningococo poseería alta afinidad por las proteínas portadoras de hierro en el plasma (transferrina o lactoferrina) y estas se requerirían para una mayor virulencia del germen, ya que como se ha demostrado, cepas mutantes incapaces de fijar hierro son avirulentas. También se ha demostrado en ratones que la transferrina es una fuente inmediata de hierro para el meningococo in vivo e in vitro (HOLBEIN, 1.981).

2.5.- Inmunidad natural e inmunidad adquirida.

Tanto la enfermedad causada por el meningococo como el estado de portador, se ha comprobado que inducen la formación de anticuerpos bactericidas (GOLDSCHNEIDER y cols. 1.969); estos anticuerpos se admite que son de carácter protector frente a la infección; ya que según demostraron dichos autores, la existencia de anticuerpos bactericidas, estaba recíprocamente relacionada con la incidencia de la enfermedad.

Posteriormente se estableció que la inmunidad natural se inicia y se refuerza a lo largo de la vida por la adquisición intermitente de diferentes cepas de meningococo en nasofaringe.

GOLDSCHNEIDER y cols. en ese mismo año, establecieron que los polisacáridos capsulares de los grupos A y C, indu-

cían la formación de anticuerpos bactericidas y por tanto eran antígenos que podían servir como inductores de inmunidad frente a la infección. Esto no ocurría en el polisacárido del grupo B, el cual poseía un pobre poder inmunogénico (WYLE y cols., 1.972).

La observación de que los antígenos no capsulares, también inducían la formación de anticuerpos bactericidas ya fué señalada por GOLDSCHNEIDER y cols. en 1.969, quienes observaron que un 92% de soldados portadores de un determinado sero grupo, desarrollaban un incremento de anticuerpos bactericidas frente a la cepa homóloga y la mayoría también aumentaban el título de anticuerpos frente a cepas de otros serogrupos. Estos anticuerpos serotipo-específicos fueron posteriormente encontrados en enfermos y portadores sanos (FRASCH, 1.977; ZOLLINGER y cols., 1.974). Estos últimos autores demostraron la inducción de anticuerpos bactericidas por el LPS, en su estudio comprobaron que en el serogrupo B, la respuesta inmunitaria se inducía frente a las proteínas y el LPS, mientras que en el C, también existía respuesta frente al polisacárido capsular.

3.- LA MENINGITIS MENINGOCOCICA EN EL MUNDO.

Como ya hemos indicado, fué en el siglo pasado cuando se publicaron las primeras observaciones de epidemias causadas por el meningococo. Estos primeros informes se completan notablemente con el descubrimiento del agente causal por WEICHSELBAUM en 1.887 y por el uso cada vez mas generalizado de la punción lumbar en el diagnóstico despues de NETTER en 1.898. Posteriormente con la introducción de nuevos corrimientos sobre el agente causal (serogrupos, sensibilidad a antimicrobianos) y recientemente con los nuevos marcadores epidemiológicos y de virulencia (ver apartado 2), se han podido añadir numerosos datos a los ya habituales de morbilidad mortalidad, deistribución etaria de los casos, etc.

En el presente apartado pasaremos revista a la situación epidemiológica de la meningitis en el mundo, haciendo especial énfasis en las últimas décadas y utilizando fundamentalmente los datos aportados por el estudio de los nuevos marcadores epidemiológicos.

3.1.- América.

La meningitis meningocócica es ya conocida en U.S.A. desde 1.806, en que apareció en Massachusetts y otros estados. En nuestro siglo se han producido serias epidémias hasta la década de los 50.

Desde 1.920 hasta la actualidad se han producido 3

ondas epidémicas importantes que alcanzan su máximo en los años 1.929, 1.936 y 1.943 con tasas por 100.000 habitantes de 9, 6, 14 respectivamente.

No se conoce la causa por la que hasta la actualidad no se han producido nuevas ondas epidémicas, alcanzandose en los años siguientes tasas siempre inferiores ó iguales a 3 por 100.000 habitantes (Meningococcal Disease Surveillance group, 1.976).

La distribución estacional es la típica, alcanzando su máximo en invierno-primavera y siendo los grupos de edad mas afectados los comprendidos entre los 3 meses y los 3 años. La letalidad estimada para el periodo 73-75 fué del 19%.

En relación con el agente causal, en los años 60 el serogrupo predominante era el B, el cual ha ido sufriendo una disminución en favor del C. Cuando se introdujeron los estudios de serotipos se demostró que el tipo 2 era el causante del 90% de las infecciones producidas por el grupo C y sobre el 50% de las producidas por el grupo B (GOLD y cols. 1.971; FRASCH y CHAPMAN, 1.973).

Destaca el hecho de que desde que en 1.963 se describieron las primeras cepas resistentes a sulfamidas, el aumento de las resistencias no ha cesado hasta los últimos años, en que parece que se ha producido un estacionamiento de las cepas resistentes e incluso una ligera disminución (Informes del Center for Diseases Control, Atlanta, 1.971 a 1.981).

Las resistencias a las sulfamidas de las cepas del grupo C alcanzaron entre el 70 y el 90% en los años 70. En cuanto al serogrupo B la sulforresistencia es muy baja, hecho que contrasta como veremos con las cepas aisladas en Europa y particularmente en nuestro país.

En Canada se han declarado unos 13.000 casos entre 1.924 y 1.979 de infección meningocócica, siendo el año de menor incidencia 1.966 y el de máxima 1.941 (13/100.000) y que constituye el pico de máxima incidencia de la onda epidémica mas importante registrada en este país; a partir de los años 40 las tasas son semejantes a las de Estados Unidos. Independientemente de las tasas globales, se debe destacar la existencia de algunos brotes importantes en algunas regiones. Las características epidemiológicas son semejantes a las de U.S.A.

Es interesante señalar, las elevadas cifras de letalidad registradas desde 1.940 a 1.970, que fueron del 26% al 34%, descendiendo en el último año a un 16%. Este descenso de la letalidad que ha sucedido en la mayoría de los países desarrollados, ha sido explicado por varios autores y podría deberse a varias causas, tales como la mejora en la declaración, la inclusión en algunos casos de portadores de meningococo, así como la inclusión en la declaración de otros cuadros clínicos tales como neumonias, meningococemias, conjuntivitis, artritis, que rebajarían dichas tasas y por último y seguramente la causa mas importante del descenso que sería la mas rápida detección de los casos y la indudable mejora de la terapia.

En un estudio de prevalencia de serogrupos en el periodo 1.974-1.979 se encontró un 50% de los aislamientos del grupo B, seguido del C (26%) y el A (14%). En este estudio se observó la declinación del serogrupo A del 30% al 5%, el aumento del B del 30% al 60%, en los cinco años (VARNGHESE, 1.980).

Brasil: Es uno de los países que junto con los integrantes del "cinturón de la meningitis" de Africa, ha sufrido una de las mayores epidémias de nuestro siglo.

Esta epidemia se localizó fundamentalmente en la región de Sao Paulo. Los antecedentes de epidémias en esta zona, ya aparecen en un brote que tuvo lugar entre 1.945 y 1.951, en 1.947 año de máxima incidencia se informaron tasas de 25 por 100.000 habitantes (SCHMID y GALVAO, 1.961). Desde 1.951 hasta 1.971 hubo muy pocos casos declarados en esta región no superando las tasas de 2 por 100.000 habitantes. Entre los años 71 y 72 previos a la epidemia se registraron en todo Brasil unas tasas de 11 por 100.000 (SOUZA de MORAIS y cols., 1.974). La cepa causante de la mayoría de los casos pertenecía al serogrupo C y era resistente a las sulfamidas. En el año siguiente empieza a aparecer un claro incremento de cepas del serogrupo A que constituiría el comienzo de la gran epidemia.

En Julio y Agosto de 1.974 se hospitalizaron mas de 13.000 personas con supuesta infección meningocócica solo en la zona de Sao Paulo, confirmándose por el aislamiento del agente causal mas de un 50%. Las tasas de este periodo se estimaron en

65 casos por 100.000 habitantes por mes. El 80% de las cepas aisladas pertenecieron al serogrupo A. El serogrupo C predominante en los años previos, desciende vertiginosamente (SILVA GUEDES, 1.977).

En la primera mitad del siglo 20, varias epidemias mas ó menos importantes han ocurrido en casi todos los países de centro y sudamérica. En casi todas ellas el serogrupo predominante fué el A (BRANHAM, 1.956). Sin embargo desde 1.951 y a excepción de la citada epidemia de Brasil, no se han descrito importantes brotes de infección meningocócica. La última epidemia de meningococo A de cierta importancia se declaró en Santiago de Chile en 1.941 (PIZZI, 1.944). En cuanto al serogrupo C además de ser predominante en Norteamérica, también ha producido algunos brotes de cierta importancia como el de Costa Rica de 1.971.

En el periodo epidémico de Brasil, algunos países limítrofes sufrieron un cierto incremento de sus tasas de afectación, como es el caso de Argentina (8 por 100.000), sin embargo la prevalencia de serogrupos se invierte con relación a a Brasil ya que el 80% de los aislamientos en este periodo pertenecían al serogrupo C (O.M.S. Weekly Epid. Rec., 1.975).

3.2. Africa y Asia.

En los años 60, tanto en Europa como en América los brotes epidémicos de meningitis meningocócica, se producen en general dentro de un estado endémico moderado, aunque en algunos países de Europa se ha producido un aumento considerable a partir de los 70.

Sin embargo en Africa, durante estos años, la meningitis constituyó un grave problema de salud pública el cual se extiende hasta nuestros días; sobre todo en el "cinturón de la meningitis" ya mencionado.

Desde 1.939 se estima en más de un millón de casos notificados y unas 150.000 muertes, siendo la mayoría de ellos producidos por el serogrupo A.

A partir de los 60, la meningitis meningocócica parece evadirse del cinturón. Ya en Marruecos se declararon 58.000 casos de los cuales, 2.400 se registraron en la ciudad de Fez en 5 meses (600 por 100.000 habitantes).

Pero es en 1.974 cuando la meningitis reapareció bajo su forma epidémica fuera de Africa; el detonante se sitúa en la peregrinación a la Meca en 1.974 (1.600 casos), en este caso vuelve a aparecer el fenómeno del hacinamiento como factor importante en el elevado número de casos, además de una presencia de un elevado número de peregrinos procedentes del cinturón de la meningitis que presumiblemente llevaron la cepa virulenta. Durante esta epidemia en La Meca, contrasta el hecho de que, en la zona del cinturón fué el año de menor incidencia (LAPEYSSONIE, 1.981).

Otro brote importante se registró en la peregrinación anterior de 1.965 y afectó especialmente a algunos países islámicos tales como Irak (3.500 casos), Iran (13.400) y Pakistán (5.400)(LAPEYSSONIE, 1.981).

Al sur del ecuador, la meningitis existe en focos endémicos moderados, en casi todos los países. El ritmo estacional se invierte en el hemisferio austral consiguiéndose el acmé de los brotes en la estación seca y caliente (Septiembre) y afectando mayoritariamente a los grupos entre 5 y 15 años.

Esta situación epidémica se localiza en países como Kenia, Zaire, Ruanda ó Zambia. Ruanda sufrió un brote especialmente virulento alcanzando tasas de 90 por 100.000. Como el resto del continente, en esta zona el serogrupo predominante fué el A.

3.3. Europa.

La situación en Europa, de la meningitis meningocócica no difiere en gran medida de lo que sucede en otros continentes, aunque hay algunos hechos claramente diferenciales:

- En la mayoría de los países el serogrupo predominante es el B, hecho que contrasta con el resto de continentes. Si exceptuamos algunos países como Finlandia, en que durante un brote epidémico intenso predominó el A.
- En la actualidad nos encontramos en varios países, entre los que destaca España y Francia, en los cuales se registran periodos fuertemente epidémicos.
- La resistencia a las sulfamidas de las cepas B aisladas en Europa es muy elevada alcanzando en muchos países cifras superiores al 50%.
- La prevalencia de serotipos proteicos en los países en que se ha estudiado, varía sensiblemente de los encontrados en U.S.A.

En este apartado pasaremos revista a la situación epidemiológica de países con mucha tradición en la vigilancia tales como Francia, Inglaterra y Países Nórdicos, los cuales nos servirán de referencia para comentar la situación epidémica en España.

Noruega: Desde 1.869 se han producido en este país 4 ondas epidémicas, con intervalos de unos 30 años. Los brotes mas importantes ocurrieron en 1.910 y 1.940. En la última década destaca una severa epidemia producida entre 1.974 y 1.975 con tasas entre 26 y 37 (BØVRE y cols., 1.977). Las tasas de letalidad eran del 14%, semejantes a las encontradas en otros países. El serogrupo predominante fué el B (60%) y después el C (25%). La resistencia a las sulfamidas alcanzó el 90%. Como en otros países, la fluctuación de serogrupos se halla sin explicación; en este país hasta 1.971, casi exclusivamente se aislaba serogrupo A de enfermos y además las resistencias a las sulfamidas solo alcanzaban el 28%, mientras que inmediatamente antes de la epidemia, se registraba ya una resistencia del 90%.

A partir de 1.975, las tasas de afectación han ido descendiendo aunque los niveles de endemia son elevados (tasas entre 6 y 8) en años posteriores.

En este mismo periodo Suecia no sobrepasa las tasas de 2/100.000.

Finlandia: La epidemia mas significativa de este país en la última década, tuvo lugar en 1.973 y fué producida por el grupo A, con cepas resistentes a la sulfamida. En los años anteriores

únicamente se registraron casos producidos por los grupos B y C. Las tasas de incidencia fueron de 14 por 100.000 que constituían cantidades siete veces mayores que las encontradas habitualmente (MAKELA y cols. 1.977).

Reino Unido: Desde 1.929 hasta finales de los 70 únicamente se registró un brote epidémico importante en Inglaterra y Gales, este brote, que tuvo lugar entre 1.939 y 1.945, alcanzó su acmé en 1.940 (13/100.000) con mas de 12.000 casos (NOAT, 1.979). En los 20 años siguientes, el nivel de endemia es discreto con declaraciones anuales entre 1.000 y 1.400 casos.

En todo este periodo, se aisla preferentemente el serogrupo B, seguido del C y A con porcentajes de 65%, 18% y 10% respectivamente.

En estudios de serotipia realizados por JONES y TOBIN en 1.976, se vió que el serotipo predominante en cepas de enfermos era el 2 (50%), cifras similares a las encontradas en U.S.A. Este porcentaje ha variado posteriormente, adquiriendo cierta importancia el serotipo 15 como sucede en Noruega, donde es cláramente predominante (HOLTEN, 1.979).

Francia: La situación epidemiológica de Francia es muy similar a la de nuestro país. Es habitual un máximo de casos en invierno-primavera y poblaciones mas afectadas las típicas de 3 meses a 3 años.

Desde 1.968 se ha producido un aumento en las tasas

de afectación que no ha cesado hasta la actualidad y va de 1,5 en 1.968 hasta 4 en 1.978 (SERRE-BOISSEAU, 1.973). Entre el 70% y el 80% de los aislamientos de enfermos se sitúan dentro del serogrupo B. Es también muy significativo el aumento de resistencias a las sulfamidas (Informe C.I.R.M. Marsella, 1.981).

Otros países: En otros países los márgenes endémicos se mantienen en los límites ya señalados, sin embargo en casi todos ellos ha habido recrudescencias importantes: Suiza (1.963), Grecia (1.971), Italia (1.970) y Portugal (1.971). En todos los países predomina el serogrupo B y la resistencia a sulfamidas continúa incrementándose.

4.- LA MENINGITIS MENINGOCOCICA EN ESPAÑA.

La meningitis meningocócica, a diferencia de otras enfermedades bacterianas, presenta en España, en las últimas décadas, una tendencia creciente de su morbilidad y mortalidad a pesar de una reducción progresiva de su letalidad.

De 1.940 a 1.981, se han registrado cuatro ondas epidémicas progresivamente mas intensas. La primera presentó su acmé en 1.944, la segunda en 1.964, la tercera en 1.971 y la cuarta alcanza sus valores máximos en 1.979, año en el cual se declararon 6.618 casos con unas tasas de afectación de 17,6 por 100.000 habitantes, la cual constituye el principal objeto de estudio de la presente tesis (GRAFICA 1).

4.1. Las ondas anteriores, desde 1.940.

Desde 1.940, se ha ido incrementando el número de casos en las sucesivas ondas epidémicas aparecidas.

La primera, presentó unas tasas de 4,9/100.000 en 1.944, la segunda de 1.964 alcanzó cifras similares y la tercera de 1.971 elevó sus tasas hasta 10,8/100.000.

En el periodo interepidémico desde 1.950 a 1.960, las tasas de endemicidad se situaron entre 1 y 2, semejantes a las de otros países. Sin embargo en el periodo interepidémico siguiente (1.966-1.970), las tasas fueron algo mayores, presagiando el aumento vertiginoso que tendría lugar a comienzos de 1.970 (MEZQUITA, 1.973).

Los primeros datos de laboratorio, de que se disponen, en cuanto a prevalencia de serogrupos, se refieren a la onda epidémica de 1.971 y destacan un claro predominio del serogrupo B (77%) y ausencia del grupo A (FADON, 1.977). Así mismo se detecta una resistencia grande a las sulfamidas (FADON, 1.976).

4.2.- La onda epidémica actual (1.977-1.981).

A partir de 1.977 se han producido incrementos paulatinos del número de casos de infección meningocócica en nuestro país. En 1.978 se declararon en España 4.419 casos (12,07/100.000), en 1.979 ascendieron a 6.618 (17,62/100.000), en 1.980 se declararon 4.806 (12,8/100.000) y en 1.981 se produce un ligero aumento en la tasa de afectación (13,9) con un total de 5.243 casos. Por tanto nos encontramos en una situación claramente epidémica, de rápida implantación, en la que en el transcurso de dos años, se llega a un valor máximo, que triplica de hecho la media anual de los casos declarados en el periodo anterior (73/77).

En el periodo actual, los casos se han distribuido siguiendo un patrón estacional de mayor incidencia en los primeros meses del año y menor en los meses de verano (GRAFICA 2). En esta onda epidémica, los valores máximos se han presentado siempre en Febrero, concretamente entre la 5ª y la 8ª semanas. Los valores mínimos para estos cuatro años se dieron entre las semanas 37ª y 40ª.

La distribución geográfica, al igual que en las anteriores ondas epidémicas, no ha sido homogénea. Los valores extremos referidos a las 52 unidades territoriales (provincias) y expresados en tasas son:

<u>Año</u>	<u>Tasa mínima</u>	<u>Tasa máxima</u>
1.978	4,01 (Toledo)	38,0 (Guipuzcoa)
1.979	5,18 (Soria)	38,5 (Lugo)
1.980	1,20 (Palencia)	38,4 (Santander)
1.981	2,90 (Jaen)	42,5 (Lugo)

En conjunto, las zonas mas afectadas en todo este periodo han sido Galicia, Extremadura, País Vasco, Navarra y Murcia.

Todas las provincias, excepto La Coruña que ha mantenido niveles semejantes, han experimentado un aumento de la incidencia respecto al periodo interepidémico anterior. A excepción de algunas provincias, en que el incremento con respecto al periodo anterior (1.976) ha sido del 50%, el resto han sufrido un aumento igual ó mayor del 100%.

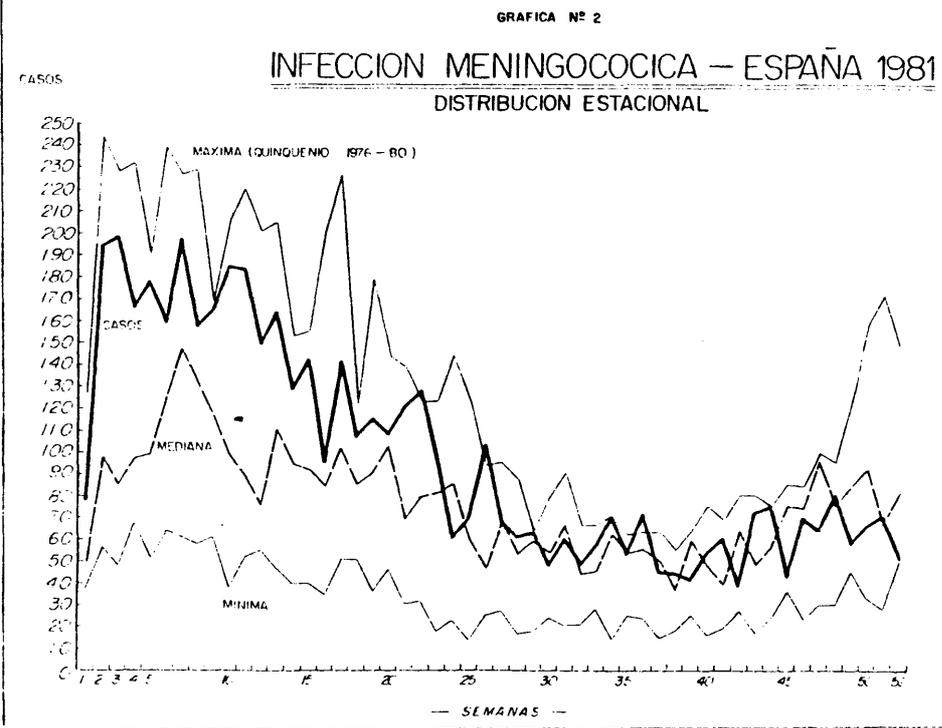
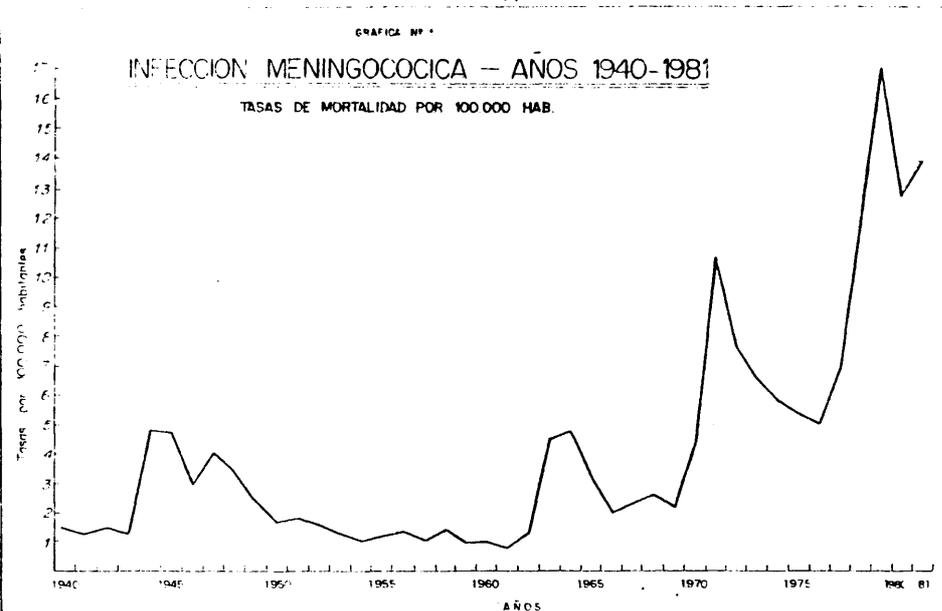
La distribución de los grupos de edad es muy similar a la encontrada en otros países de nuestro área. El 42% de los casos se produjeron en niños menores de 5 años, llegando al 80% del total de casos en los menores de 14 años. Hay un ligero predominio de los varones en el conjunto de los casos, entre el 55 y el 60%, según la fuente de información.

La letalidad global encontrada para el periodo pre-

vio a la onda actual fué del 18%. Registrándose en 1.971, la letalidad mas baja de los últimos 20 años (12,7%).

En la onda actual y según los datos de que se dispone, la letalidad se puede estimar en el 5,5%, que se duplica en los menores de un año (Bol. Epidem. Semanal, nº 1.416, 1.980). Sin embargo se estima que esta cifra es algo menor de la real, debido a las deficiencias de seguimiento de los casos en nuestro sistema de vigilancia.

Las características del agente causal desde el punto de vista de los marcadores epidemiológicos y susceptibilidad a antimicrobianos, responsable de dicha onda, constituyen el objeto central de nuestro trabajo y se expresan con detalle en el apartado de resultados.



5.- PROFILAXIS Y CONTROL DE LA INFECCION MENINGOCOCICA.

5.1. Estado actual de la vigilancia epidemiológica y el control de la infección meningocócica.

El control efectivo de la infección meningocócica según describe LYSTAD en 1.980, debe basarse, en primer lugar en el conocimiento de la situación epidemiológica de los diferentes países, así como del conocimiento de la historia natural de la enfermedad. Además se deben definir las relaciones entre el agente causal, su fuente, la ruta de infección y el huesped susceptible; en definitiva conocer lo mejor posible la cadena de transmisión de la infección; para poder utilizar las armas de control de que se dispone en la actualidad y poder interromper dicha cadena en alguno de sus eslabones.

El conocimiento epidemiológico es indispensable, para decidir las medidas de control a utilizar (este apartado, incluiría, los datos de morbilidad, mortalidad, características de los brotes, etc.). Toda esta información epidemiológica debe ir incuestionablemente unida, a los datos de laboratorio que nos permiten conocer las características del agente causal, tales como el serogrupo, serotipo, resistencia a antimicrobianos y otros marcadores, los cuales nos permitirán de forma mas efectiva decidir la aplicación de las medidas de control (vacunas, quimioprofilaxis, etc.). Estos marcadores mas finos, nos permitiran seguir la pista a las cepas virulentas en la población normal y así poder prevenir la aparición de nuevos casos.

El primer eslabón de la cadena de transmisión, es el agente causal, y en el futuro un modo interesante de ataque será la modificación de los factores de virulencia del germen (ver el apartado 2 de esta introducción). Sin embargo, las investigaciones en este terreno no han avanzado mucho y se requerirán unos años, para que estas puedan dar fruto.

La segunda línea de la cadena, la constituyen, el reservorio y la fuente de transmisión del agente causal, los estudios para ejercer el control en este paso, se basan fundamentalmente en los estudios de prevalencia del meningococo en poblaciones con ó sin casos, así como en brotes y grupos familiares. Para estos datos nos serviríamos de los marcadores epidemiológicos antes citados y que nos permiten localizar cepas virulentas en una determinada población. Las medidas de control se basarían fundamentalmente en la quimioprofilaxis de contactos de enfermos (familiares, condiscípulos, etc.).

La ruta de transmisión constituye el tercer peldaño en la cadena; con los conocimientos de que se dispone en la actualidad, es claro que la transmisión se efectúa a través de contactos estrechos. En este caso se cree que juegan un papel mas importante los portadores de cepas virulentas que los enfermos. Debiendo, en estos casos el control ir encaminado a eliminar el estado de portador de estas cepas que pueden producir nuevos casos. Sin embargo, esto es factible en los contactos íntimos de un enfermo, pero el control de las cepas virulentas y su transmisión a individuos susceptibles de la población general resulta muy difícil sinó imposible.

Probablemente el control mas efectivo, que podemos ejercer sobre la infección meningocócica, aunque con algunas limitaciones, es el dirigido contra el cuarto eslabón de la cadena de transmisión, es decir, sobre el huesped susceptible. Este control se basaría en la inmunización mediante vacunas polisacáridas de los grupos A y C. Sin embargo como ya hemos indicado, en prácticamente toda Europa y alguna otra zona, el predominio del serogrupo B y la demostración del bajo poder inmunogénico de su polisacárido capsular hace poco útil en la actualidad, al menos en nuestra área, esta medida de control. Sin embargo, como comentaremos mas adelante, se está trabajando intensamente en el desarrollo de vacunas protéicas (antígenos serotipoespecíficos), ya que como hemos indicado son capaces de inducir anticuerpos bactericidas y por tanto juegan un papel importante en la inducción de inmunidad frente a la infección producida por el serogrupo B.

En resumen, podemos decir que las medidas de control de que se dispone en la actualidad, pueden incidir en cierta medida sobre los diferentes eslabones de la cadena de transmisión, en particular, la caracterización de las cepas mediante marcadores epidemiológicos.

En lo que se refiere a la prevención en la aparición de nuevos casos, es practicamente imposible llevarla a cabo en la población general. Unicamente se puede prever la posible aparición de casos secundarios, en contactos familiares de un enfermo ó individuos de comunidades cerradas, particularmente si los individuos de estas poblaciones son menores de 14 años.

5.2.- Quimioprofilaxis.

Como ya hemos indicado, el reservorio del meningococo es la nasofaringe humana. Una de las preocupaciones primarias, una vez conocida la transmisión de la enfermedad a través de los portadores sanos; fué la erradicación de los meningococos de la nasofaringe para romper así la cadena de transmisión.

La utilización de las sulfamidas como quimioprofilácticos, debido a su utilidad frente al meningococo, fué el principal arma para eliminar el estado de portador, ya en los años 40 (FAIRBROTHER, 1.940; KUHNS y cols., 1.943).

Sin embargo desde que MILLAR y cols. en 1.963 describieron por primera vez cepas resistentes a la sulfadiazina, estas cepas se han encontrado en todas las partes del mundo y han causado la mayoría de las grandes epidémias, tales como la de Brasil de 1.974, Africa y Europa (SERRE-BOISSEAU, 1.973; MINFORD y cols., 1.974; ABBOTT y GRAVES, 1.972 y muchos otros).

Debido a la aparición de las resistencias, se estudiaron numerosos antibióticos como alternativa a las sulfamidas sobre todo aquellos que ya habian mostrado su efectividad "in vitro" frente al meningococo (DEVINE y HAGERMAN, 1.970). A partir de esa época, se han realizado muchos estudios descartando como quimioprofilácticos antibióticos tales como eritromicina, oxitetraciclina, doxiciclina, cefalexina, ampicilina y penicilina (este último, el agente terapéutico más importante frente al meningococo).

En los últimos 10 años la rifampicina y la minociclina han demostrado su habilidad para eliminar el meningococo de nasofaringe (BEAM y cols., 1.973; DEVINE y cols., 1.971; GUTTLER y cols., 1.971 y MUNFORD y cols., 1.974). Sin embargo estos antibióticos presentan algunos inconvenientes, que los hacen ser cuestionados por algunos autores, aunque la rifampicina es el mas ampliamente utilizado como sustituto de las sulfamidas.

Las objeciones a la minociclina se basan fundamentalmente en los efectos secundarios que conlleva su administración principalmente de tipo vestibular (DREW y cols., 1.976; MENENDEZ y cols., 1.980).

En cuanto a la rifampicina, que se muestra tan efectiva en cuanto a la erradicación y persistencia de ésta como las sulfamidas, en la actualidad han aparecido informes de aparición de cepas resistentes tras el tratamiento (BEAM y cols., 1.973; GUTTLER y cols., 1.971 y WEIDMER y cols., 1.971).

Mas recientemente, la espiramicina ha sido citada por algunos autores europeos como un posible quimioproláctico (ALBERT y cols., 1.979 y ENGELEN y cols., 1.981). Estos últimos autores encuentran un porcentaje de erradicación del 85%, aunque la persistencia de la misma no es tan alta como en sulfamidas ó rifampicina; sin embargo, la no existencia de resistencias y su inocuidad, le acreditan como un posible quimioproláctico a tener en cuenta.

A continuación se recogen las características de los 4 quimioprolifáticos mas utilizados hasta la fecha:

	<u>Sulfamidas</u>	<u>Rifampicina</u>	<u>Minociclina</u>	<u>Espiramicina</u>
Reducción del estado de portador.	+++	+++	++	++
Persistencia de reducción	+++	+++	++	+(+)
Aparición de resistencias post-tratamiento	-	+	-	-
Efectos secundarios	-	-	+	-
Dosis total	4 gr.	2,4 gr.	1,2 gr.	10 gr.
Precio aproximado en Ptas.	1.500.-	2.000.-	1.200.-	50.-

La utilización de los quimioprolifáticos, estuvo y en algunos países todavía persiste, muy extendida. En general y especialmente antes de la aparición de resistencias, fueron muy útiles para eliminar los meningococos de nasofaringe, sin embargo en la actualidad, contamos con otras armas para controlar la infección (vacunas), aunque con las limitaciones que indicaremos.

En la actualidad, los quimioprolifáticos se suelen recomendar en casos especiales, tales como comunidades cerradas (cuarteles, guarderías) y en contactos familiares, tras la aparición de un caso de meningitis meningocócica, ya que como se sabe, el riesgo de aparición de casos secundarios en estas poblaciones es mucho mayor (EICKHOFF, 1.975; ARTENSTEIN, 1.975 y FINLEY, 1.976).

Además en el caso de la meningitis causada por el serogrupo B, en la actualidad es la única medida de control de que se dispone evitar la transmisión.

En las situaciones antes citadas, es cuando se recomienda la quimioprofilaxis fundamentalmente con rifampicina, dado el elevado porcentaje de cepas resistentes a las sulfamidas.

5.3.- Inmunoprofilaxis.

5.3.1.- Vacunas polisacáridas.

Según expuso ARTENSTEIN en 1.975, los factores mas importantes que condujeron al desarrollo de vacunas útiles frente a la infección meningocócica son dos: la demostración de una respuesta inmunológica frente a los antígenos capsulares, que se relacionó con la protección frente a la infección, y el aislamiento y purificación de estos antígenos y la demostración de la inducción de anticuerpos protectores en el hombre.

Como ya indicamos el parámetro inmunológico asociado con la resistencia a la enfermedad se demostró que lo constituían los anticuerpos bactericidas (GOLDSCHNEIDER y cols., 1.969).

La extracción y purificación de los antígenos polisacáridos capsulares de alto peso molecular, fué descrita por GOTSCHLICH y cols., en 1.969. En estudios de protección realizado por estos autores, se vió que la inmunización de voluntarios con polisacáridos purificados de los serogrupos A y C, inducían la formación de anticuerpos protectores.

A partir de estos estudios, se han realizado muchas pruebas de campo, de efectividad de las vacunas, en zonas endémicas y en brotes en poblaciones militares (GOLD y ARTENSTEIN, 1.971; ARTENSTEIN y cols., 1.971; WAHDAN y cols., 1.977; HANKINS y cols., 1.982 y MAKELA y cols., 1.977).

Así mismo existen en la actualidad vacunas efectivas frente a los serogrupos Y y W135, serogrupos causantes de algunos brotes descritos en diversos países (BEUVERY, 1.981 y GOLS, 1.979).

Aunque estas vacunas han probado su eficacia en numerosos estudios, algunos problemas permanecen sin resolver, el principal es la pobre respuesta inmunitaria que se registra con la vacuna del grupo C, en niños menores de 3 años (GOLD y cols., 1.977 y GOLDCHNEIDER y cols., 1.973).

5.3.2.- Vacunas proteicas.

Como se indicó anteriormente, la vacuna polisacárida C posee una baja inmunogeneicidad en grupos de edad de alto riesgo como son los niños pequeños. Además ya se ha comentado la falta de poder inmunogénico del polisacárido B (WYLE y cols., 1.972). Por estas razones y a partir del descubrimiento de los antígenos no capsulares y de su capacidad de inducir la formación de anticuerpos bactericidas, se ha trabajado intensamente en lograr su utilización como vacuna.

En principio se admitió que una combinación del polisacárido junto a componentes de la pared producirían una pro-

tección mucho mas completa (FRASCH, 1.979).

De los componentes de la membrana externa de la pared celular, se descartó el lipopolisacárido, que aunque se vió que poseía capacidad inmunizante (FRASCH, 1.979), poseía una alta toxicidad debido a ser el principal componenete de la endotoxina meningocócica(DAVIS y ARNOLD, 1.974).

Las investigaciones se centraron en las proteínas serotipoespecíficos purificados. FRASCH y cols. en 1.976 realizaron varios ensayos de protección con la proteína del tipo 2 prevalente en los enfermos de infección meningocócica en U.S.A. para ello emplearon, modelos experimentales, de bacteriemia del ratón, neutralización en embrión de pollo e infección en cobayo (FRASCH y ROBINS, 1.978). En estos estudios encontraron protección inducida en forma de anticuerpos bactericidas.

Los primeros estudios en humanos fueron llevados a cabo por ZOLLINGER y cols. en 1.978. Estos autores utilizaron una vacuna protéica con el polisacárido capsular del grupo C incorporado. Los voluntarios vacunados presentaron un cierto aumento en el título de anticuerpos frente a los antígenos proteicos, pero estos no poseían actividad bactericida. Los anticuerpos bactericidas inducidos en los voluntarios eran específicos del polisacárido C y de muchas cepas del grupo B.

FRASCH en 1.978, probó una vacuna únicamente proteica en un 90%, obteniendo resultados poco satisfactorios.

Este autor especuló con la discrepancia existente entre la respuesta inmune producida por las proteínas purificadas y la obtenida por los antígenos en estado nativo en la infección considerando que la fracción lipido-lipopolisacárido eliminada por su toxicidad era fundamental para recuperar la actividad inmunizante. En la actualidad se realizan trabajos para eliminar ó reducir al máximo dicha toxicidad.

Otro rumbo que se investiga en la actualidad y que puede rendir frutos a corto plazo, es el desarrollo de vacunas polivalentes, en que convivan los polisacáridos capsulares con las proteínas mas frecuentes encontradas en cepas aisladas de enfermos. Estas vacunas polivalentes son propugnadas por algunos autores incluyendo en las mismas, no solo antígenos de meningococo sino de H. influenzae, Neumococo, y otros gérmenes responsables de meningitis en la infancia tales como E. coli y S. agalactiae (GOTSCHLICH y cols. 1.978).

O B J E T I V O S

=====

Como se ha señalado en la introducción, la situación epidémica actual de la meningitis meningocócica en nuestro país es la más alarmante de nuestro siglo, al contrario de lo que ocurre en otros países de nuestra área, en los que los niveles de endemia se mantienen relativamente bajos. Este hecho hace que la meningitis meningocócica sea junto a la brucelosis y la tuberculosis, un problema sanitario de primer orden en España.

El control de la infección meningocócica, pasa fundamentalmente por la intervención sobre los eslabones de la cadena de transmisión de la enfermedad y como hemos indicado, la información epidemiológica es fundamental para el mejor conocimiento de estos eslabones y así poder ejercer un control más efectivo de la infección. Por otro lado la información epidemiológica necesita incuestionablemente de los datos que proporciona el estudio de los marcadores epidemiológicos del agente causal.

Nuestros objetivos en este trabajo, se han centrado fundamentalmente en el estudio de estos marcadores antigénicos, para caracterizar el agente causal, protagonista de la onda epidémica actual y de paso marcar la pauta en el estudio de otras enfermedades infecciosas producidas por bacterias y que hasta nuestros días no se han estudiado a nivel comunitario. Pudiendo así obtener una información que nos permita una mejor utilización de las medidas de control de que disponemos actualmente.

Entre los objetivos que nos propusimos, podemos señalar los siguientes:

- 1) Conocimiento de los serogrupos y serotipos predominantes en enfermos de infección meningocócica y portadores de población general.
- 2) Estudio de la susceptibilidad a antibióticos mas usados en terapéutica (penicilina, ampicilina y cloranfenicol), así como a las drogas mas usadas en quimioprofilaxis (sulfadiazina, rifampicina, minociclina y espiramicina).
- 3) Correlación de las posibles resistencias con los marcadores epidemiológicos (serogrupo y serotipo).
- 4) Caracterización de los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida de las cepas aisladas de enfermos y portadores.
- 5) Como aplicación del estudio de estos marcadores epidemiológicos, se han realizado tres tipos de estudios de vigilancia epidemiológica:
 - a) Estudio de la prevalencia de las cepas productoras de casos en contactos familiares de enfermos.
 - b) Localización y frecuencia de cepas virulentas en poblaciones infantiles y comparación de la incidencia del meningococo y Neisseria lactamica en dichas poblaciones.
 - c) Caracterización de brotes de infección meningocócica en comunidades semicerradas (guarderías).
- 6) Por último, en la presente memoria se realiza un comentario sobre la situación de la vigilancia epidemiológica en nuestro país, atendiendo fundamentalmente a los datos que pueden suministrar los laboratorios de referencia en beneficio del conocimiento de los agentes causales y se proponen algunas pautas para mejorar dicha vigilancia.

M A T E R I A L Y M E T O D O S

=====

1.- Reactivos, medios de cultivo y aparatos.1.1. Reactivos y medios de cultivo.

-	Caldo Eugon	Difco
-	Agar Mueller Hinton	Difco
-	Suplemento Isovitalex	BBL
-	Leche descremada (Skim milk)	Difco
-	Medio CTA (Cystin Tryptic Agar)	Difco
-	Caldo TSB (Tryptic Soy Broth)	Difco
-	Agar Noble	Difco
-	Sales de fósforo (PO_4HNa_2 , PO_4H_2K , PO_4H_2Na), $ClNa$ y $ClLi$.	Merck
-	Acido acético, ácido tricloroacético, etanol, metanol, persulfato amónico	Merck
-	Hidrocioruro de tetrametil parafenilen diamina (oxidasa)	Difco
-	O-nitro-fenil-galactopiranósido	Sigma
-	Thimerosal (merciolato)	BDH
-	Azida sódica, urea	Difco
-	Azúcares (lactosa, glucosa, maltosa y sacarosa)	Difco
-	Glicerol	Merck
-	Dodecil-sulfato sódico, poliacrilamida, bis-acrilamida e indicadores de peso molecular (Dalton Mark IV)	Sigma
-	Beta-mercaptoetanol y tetrametiletilen diamina (TEMED)	BDH
-	Azul de bromotimol y azul de bromofenol	Difco
-	Azul brillante de Comassie R	Serva
-	Mezcla inhibidora CNV (colimicina, nistatina y vancomicina)	Difco

- Antibióticos:

Rifampicina	(100%)	Merck, Sharp & Dohne
Ampicilina	(92,9%)	Antibióticos S.A.
Penicilina G sódica	(1.650Ud/mg.)	Antibióticos J.A.
Minociclina (Minocin) (Capsulas)		Lederle
Espiramicina	(96%)	Rhodia
Cloranfenicol	(95%)	Antibióticos S.A.
- Sulfadiazina	(99,2%)	Andreu

1.2.- Aparatos.

- Estufas con atmosfera de CO ₂	Selecta
- Ultracentrífuga L5-50 Rotores 40.3 y 50Ty	Beckman
- Centrífuga J2-21 Rotores JS 21 y JA 10	Beckman
- Fotocolorímetro Spectronic 20	Bausch y Lomb
- Cortador de geles Cutter-Template	Miles
- Micropipetas fijas y regulables	Oxford
- Fuente electroforesis 2103	LKB
- Congelador de -20°C	Electrolux
- Congelador nieve carbónica	Labora y Adsuar

2.- Cepas de N. meningitidis y N. lactamica.

2.1.- Procedencia de las cepas.

Las cepas estudiadas, las agruparemos, según su procedencia y objeto del estudio:

- a) Cepas de referencia: Estas cepas se utilizaron tanto como controles en pruebas bioquímicas de identificación y crecimiento, como para la inducción de sueros serogrupo y serotipoespecíficos y como controles en las pruebas serológicas. Se utilizaron 30 cepas que relacionamos a continuación:

Cepas patrón de serogrupos:

<u>N. meningitidis</u>	grupo A	M139	Dr. Vedros
"	" B	M136	"
"	" C	M137	"
"	" D	21724	Dr. Albert
"	" 29E	64823	"
"	" X	M405	Dr. Vedros
"	" Y	M406	"
"	" Z	M407	"
"	" W135	M603	"

Dr. Vedros (School of Public Health, University of California, Berkeley, U.S.A.).

Dr. Albert (Centre Collaborateur O.M.S. Marsella. Francia).

Cepas patrón de serotipo: Todas las cepas son del sero grupo B y han sido suministradas por el Dr. C. E. Frasch (Bureau of biologics, N.I.H. Bethesda, Maryland. U.S.A.).

Tipo 1 (M1080), 2(B16B6), 2,7(M986), 2,10(M1011),
4(M981), 5(M992), 6(M990), 8(M978), 9(M982), 11(M136), 12(S3032),
13(BC4) 14(S3446I) y 15(H355).

Cepas patrón de otras neisserias:

<u>N. lactamica</u>	NCTC 10616	
<u>N. lactamica</u>	NCTC 10617	
<u>N. lactamica</u>	NCTC 10618	
<u>N. subflava</u>	44	Dr. Albert
<u>N. flavescens</u>	64	"
<u>N. gonorrhoeae</u>	MA 1660	C.N. Microbiología. Majadahonda.
<u>N. gonorrhoeae</u>	MA 3830	"

b) Cepas aisladas de enfermos con infección meningocócica:

Se estudiaron 2.223 cepas procedentes de enfermos, aisladas de líquido cefalorraquídeo ó sangre. Enviadas a nuestro laboratorio de referencia de 55 laboratorios de 30 provincias. Dichas cepas venían acompañadas de una ficha epidemiológica en la que se hacía constar los datos de aislamiento (fecha, lugar, edad, sexo y otras informaciones complementarias).

c) Cepas aisladas de portadores:

- 481 cepas aisladas de portadores de la población general recibidas en nuestro laboratorio.
- 208 cepas aisladas de niños portadores en las Escuelas de Alcalá de Henares.

- 27 cepas de contactos familiares de enfermos controlados en el estudio de Barcelona.
- 31 cepas de niños portadores, aisladas de un brote registrado en una guardería de Logroño.
- 409 cepas de N. lactamica, aisladas en niños portadores de las Escuelas de Alcalá de Henares.
- 24 cepas de N. lactamica recibidas en el laboratorio de referencia de meningococos.
- 26 cepas de N. lactamica y 18 de meningococo aisladas en una escuela de Majadahonda.

2.2.- Crecimiento, transporte y conservación de las cepas.

Todas las cepas recibidas en nuestro laboratorio, fueron enviadas en el medio de transporte para meningococos, recomendado por el Centro de Referencia de meningococos de Marsella. Este medio permite una mayor viabilidad de las cepas y fué suministrado por nuestro laboratorio a los que lo solicitaron. El medio consiste en una parte de Caldo Eugon (Difco) y tres partes de huevo coagulado. El medio se distribuyó en tubos con tapón de rosca y puede almacenarse en nevera hasta 6 meses.

Tanto las cepas recibidas de otros laboratorios, como las aisladas por nosotros se sembraron en placas de agar Mueller Hinton con sangre de carnero al 5% y en medio de Thayer-Martin. Dichas placas fueron incubadas 24-48 hrs. en atmósfera de CO₂ al 5% y a 37°C.

Medio de Thayer Martin: Este medio selectivo de neisserias patógenas y N. lactamica consiste en un agar chocolate (en este caso se ha utilizado agar Mueller Hinton como base y sangre chocolatada de carnero al 5%), una mezcla inhibidora que consta de

los antibióticos; vancomicina, 300 mcg./100 ml., colistina, 750 mcg/ml., y nistatina, 1.250 Ud./ml.) y un suplemento nutritivo al 1% de concentración final (Isovitalex(BBL)).

Los ingredientes por placa fueron: agar base, 20 ml., sangre chocolatada, 5%, mezcla inhibidora CNV, 0,2 ml., y suplemento nutritivo, 0,2 ml. Posteriormente y hasta su utilización para los diferentes estudios, todas las placas se conservaron en nevera a 4°C.

Todas las cepas estudiadas fueron conservadas a -70°C en leche descremada (Difco) y liofilizadas.

3.- Aislamiento de cepas en portadores y pruebas de identificación.

3.1. Aislamiento de cepas en portadores.

En los estudios realizados sobre portadores, se empleó la sistemática expresada en el ESQUEMA 2, pag. 15:

La muestra (escobillón estéril), se tomó de la parte alta de la nasofaringe e inmediatamente se sembró en medio de Thayer Martin, incubándose posteriormente durante 24 horas en atmósfera de CO₂ al 5% y a 37°C. Después de la incubación se realizaron las pruebas de confirmación habituales (tinción de Gram, oxidasa y utilización de azúcares), en el caso de los portadores se añadió la prueba de beta-galactosidasa, para diferenciar al meningococo de la N. lactamica que como ya hemos indicado crece en el medio selectivo y además es frecuente en niños pequeños. Posteriormente se realizaron los estudios serológicos correspondientes a cada caso., así como el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos.

3.2.- Investigación de la actividad enzimática.

Oxidasa: Para detectar la actividad de oxidasa en las cepas se utilizó una solución al 1% de hidrocloreuro de tetrametil-parafenilendiamina (Difco) (MORELLO y BONHNOFF, 1.980), la cual se impregna en una tira de papel de filtro. Se toma una colonia de una placa incubada y se extiende sobre la citada tira de papel, obteniéndose en pocos segundos un ennegrecimiento en caso de positividad.

Beta-galactosidasa: Esta prueba se realizó fundamentalmente en las cepas aisladas de nasofaringe ó de pruebas de azúcares dudosas, para diferenciar N. lactamica del meningococo. Para esta prueba se utilizó una solución 5 mM de O-nitro fenil-galactopiranosido (ONPG) en tampón fosfato pH= 6,9 con la siguiente composición:

- Solución 0,15M de PO_4HNa_2	66,6 ml.
- Solución 0,15M de PO_4H_2K	33,3 ml.
- ClNa	8,5 gr.
- H_2O destilada	900 ml.

Se realizó una suspensión densa del microorganismo en 0,5 ml. del reactivo y en pocos minutos se detecta la reacción positiva (color amarillo).

3.3.- Pruebas de utilización de azúcares.

Se utilizaron dos medios para investigar la oxidación de azúcares en las neisserias.

El primero fué el utilizado habitualmente en el laboratorio de referencia de meningococos, consistente en agar Mueller

Hinton como medio base y una solución de azul de bromotimol como indicador (medio MIBT). A este medio se le añadieron 1% de los azúcares incluidos en el estudio, previamente esterilizados en soluciones al 10% (lactosa, sacarosa, glucosa y maltosa).

La solución de azul de bromotimol se esteriliza independientemente y contiene: azul de bromotimol 1 gr., NaOH N/10 25 ml., H₂O 475 ml.

Método: De cepas cultivadas en las condiciones ya descritas se realizaron suspensiones densas en tampón fosfato pH 6,9. Cada suspensión se inoculó en las placas de los azúcares, en un área de 0,5 cm de ϕ . En cada placa de Petri se estudiaron de 20 a 25 cepas simultáneamente. Las placas fueron incubadas durante 72 horas en atmósfera húmeda a 37% , efectuando lecturas cada 24 horas.

El segundo medio utilizado fué el CTA (Agar Cystin Tryptic)(difco), según las condiciones establecidas por MORELLO y BONHNOFF en 1.980.

Este medio se utilizó fundamentalmente para cepas que presentaron reacciones dudosas en el primer medio y para los estudios en que intervenía N. lactamica, ya que el crecimiento de dicho microorganismo en el medio MIBT no es satisfactorio para dicha prueba.

A este medio se le añadieron los azúcares antes indicados y en los casos de reacciones poco claras se incorporaron en una concentración final del 10%.

Este medio se utilizó distribuido en tubos de tapón de rosca para conseguir mayor hermeticidad en la incubación.

Método: De las suspensiones antes señaladas se realizó una siembra en picadura con una pipeta Pasteur en los correspondientes tubos. La incubación se realizó durante 5 días a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Efectuando las lecturas cada 24 horas.

4.- Serogrupo.

4.1.- Producción de sueros serogrupo-específicos.

Los sueros empleados para la identificación serológica del serogrupo fueron producidos en nuestro laboratorio, inmunizando conejos albinos Nueva Zelanda de 2 a 3 kg., siguiendo el esquema de VEDROS (1.978), con algunas variaciones:

La vacuna de gérmenes muertos la obtuvimos por congelaciones y descongelaciones bruscas y sucesivas. El esquema de inoculaciones fué el siguiente:

1ª semana:	L-M y V	0,5 ml. de gérmenes muertos
2ª semana:	L-M y V	0,75 ml, 0,75 ml. y 1 ml. g. muertos
3ª semana:	L-M y V	1 ml de gérmenes vivos
4ª semana:	M	Sangrado en vena marginal de la oreja para comprobar título por aglutinación.
	V	Sangrado a muerte por punción cardiaca.

Las suspensiones se ajustaron a una concentración de $1,2 \times 10^8$ gérmenes por ml., realizando dichas suspensiones en PBS pH= 6,9 (ver apartado 7).

Las cepas utilizadas para las inmunizaciones fueron las indicadas anteriormente. Los sueros fueron probados frente a su cepa homóloga y frente a otras heterólogas, para detectar reacciones cruzadas.

En los estudios realizados con la técnica de agar antisuero se utilizaron los sueros de los serogrupos A, B, C, Y, 29E y W135 producidos en burros y caballos, amablemente suministrados por el Dr. C.E.Frasch (Bethesda, Maryland). Los sueros de los serogrupos D, X y Z fueron los mismos que en las pruebas de aglutinación.

4.2.- Aglutinación en porta.

De un cultivo en las condiciones ya mencionadas, se realizó una suspensión densa en PBS pH 6,9 y una gota de dicha suspensión se enfrentó con los sueros serogrupo-específicos. En pocos minutos se observó la aglutinación con alguno de los mismos.

4.3.- Agar antisuero.

Este método se utilizó en periodos en que había gran cantidad de cepas, ya que permite identificar el serogrupo de muchas cepas simultáneamente, de manera similar a lo que ocurría con el medio MIBT de azúcares. También se utilizó para la confirmación de cepas que presentaron aglutinación dudosa y para determinar la reactividad cruzada de cepas de N. lactamica con sueros antimeningocócicos.

Método: Las placas con el medio agar-suero, se sembraron en estrías ó en áreas de 0,5 a 1 cm. de ϕ . La incubación se efectuó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas. El halo translúcido alrededor de la siembra indica reacción positiva frente al suero del serogrupo incluido en la placa. La magnitud y nitidez del halo se puede incrementar si se dejan las placas durante 24 horas en nevera a 4°C.

En todas las pruebas se incluyeron cepas homólogas y heterólogas, para detectar reactividades cruzadas. Solo aparecieron dichas reacciones entre los serogrupos Y y W135 al utilizar sueros de caballo. Las cepas de serogrupo Y produjeron halo en placas conteniendo suero Y y en placas con suero W135, mientras que las cepas W135 únicamente produjeron halo en placas conteniendo su suero homólogo.

Esta reactividad cruzada se eliminó utilizando nuevos sueros de conejo, fenómeno que ya fué observado por CRAVEN y cols. en 1.979.

En los demás serogrupos no se encontraron diferencias apreciables entre los sueros de caballo y conejo.

Por último la lectura siempre se realizó por dos personas y se repitieron las cepas no productoras de halos ó con reacciones poco claras antes de dar los resultados como definitivos.

Medio de agar-antisuero: Este medio consiste en un caldo como medio nutritivo base (Caldo Tryptic Soy (Difco)) y agar Noble

(Difco) en una proporción de 14 gr/l: de medio. Una vez autoclavizado el medio y enfriado a 50°C se le añade el suero del serogrupo a estudiar, previamente titulado, para obtener un halo claro con su cepa homóloga.

La mezcla obtenida se reparte en placas a razón de 20 ml/placa y éstas, se secaron toda la noche a temperatura ambiente antes de su uso.

5.- Serotipado.

5.1.- Producción de sueros serotipo-específicos.

Los sueros empleados para la identificación de serotipos fueron producidos en nuestro laboratorio, inmunizando conejos con las características antes mencionadas y siguiendo el esquema de FRASCH y CHAPMAN (1.972), utilizando cepas patrón de los diferentes serotipos ya descritas.

Las condiciones de siembra, esquema de inoculación, suspensión de gérmenes y comprobación de título son similares a las ya descritas para los sueros de serogrupo, variando las condiciones establecidas en el esquema de FRASCH y CHAPMAN y lógicamente utilizando para las pruebas de comprobación las propias de la serotipia es decir inmunodifusión doble en gel.

Una vez comprobados los sueros fueron conservados en pequeñas cantidades de 0,5 a 1 ml. a -20° hasta su uso añadiéndoles mertiolato al 1/5.000 como preservativo. Este método de conservación y almacenamiento fué también utilizado con los sueros de serogrupo, a excepción de los utilizados en las pruebas de agar-suero en que el preservador podría inhibir el crecimiento de los microorganismos.

5.2.- Extracción de antígenos serotipo-específicos.

Para la extracción de los antígenos serotipoespecíficos se sembraron las cepas en una placa de agar sangre durante 24 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%. El crecimiento así obtenido se sembró en 250 ml. de Caldo Tryptic Soy (Difco), el cual fué incubado toda la noche en un agitador Kottermann a 37°C a 30 r.p.m.

Este crecimiento se recoge por centrifugación a 10.000 ges en una centrifuga Beckman J2-21, con un motro JA-10 con botes de policarbonato de 500 ml. durante 20 min. El sedimento obtenido se resuspende en 5 ml. de una solución 0,2M de ClLi y 0,1M de CH₃-COONa, pH 5,8 y esta mezcla se agita en un baño Herón, durante 2 horas a 50°C. Se realiza una nueva centrifugación a 10.000 ges en la misma centrífuga en un rotor JS-21, durante 20 minutos y el sobrenadante se ultracentrifuga en una Beckman L5-50 a 100.000 ges durante 2 horas, utilizando un rotor 50 Ty ó 40.3.

El sedimento resultante se reconstituye en 0,5 ml. de agua destilada, conservándose a 4°C hasta su estudio.

5.3.- Serotipado.

Se realizó mediante la técnica de inmunodifusión doble en gel, según las indicaciones dadas por FRASCH y CHAPMAN en 1.972, con algunas modificaciones.

En nuestro estudio utilizamos placas de petri de 10 cm. de ϕ en las cuales se perforaron 6 rosetas de 6 pocillos periféricos cada una, y uno central, en el cual se situaba el

suero serotipoespecífico y en los periféricos los extractos de las cepas a estudiar.

Las placas se prepararon añadiendo 12 ml. del gel Agar Noble (Difco) al 1% en solución salina (ClNa al 0,85%) y se substituyó el mertiolato por azida sódica al 0,02%.

Las placas se incubaron toda la noche a 37°C y después de la lectura se dejaron una noche a temperatura ambiente y se efectuó una nueva lectura.

Tras la incubación se pueden observar dos tipos de líneas de precipitación: la línea determinada por los antígenos de serotipo que es una línea curvada y cercana al pocillo antigénico; en ocasiones puede aparecer una línea mas recta y situada de forma equidistante del pocillo central y de los periféricos, que corresponde a un antígeno común a muchos meningococos (LPS).

6.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

Los patrones electroforéticos de las proteínas serotipoespecíficos, se obtuvieron mediante geles de poliacrilamida-dodecil sulfato sódico al 10% según la técnica de WEBER y OSBORN, 1.969, modificada por FRASCH y LaMOCCA, 1.978, usando placas y con algunas modificaciones:

A los geles se les añadió un gel concentrador de acrilamida-bis-acrilamida al 3%-0,25%, utilizando un tampón fosfato como electrolito.

Los geles se fijaron en una solución de ácido tricloroacético al 5% y posteriormente se tiñeron con azul brillante de Comassie R al 0,25% en una solución metanol-acético (46:8). La decoloración se realizó con una solución 20:8 de metanol:acético.

6.1.- Preparación de las soluciones de trabajo.

A) Solución tampón, para llenado de cubetas e incubación de la muestra.

Tampón fosfato sódico 0,01M pH= 7

Solución A	PO_4H_2Na	0,2M
Solución B	PO_4HNa_2	0,2M

Sol. A	16,5 ml.
Sol. B	33,5 ml.
ClNa	7,4 gr.
H ₂ O dest.	950 ml.

B) Solución de calentamiento de la muestra.

Dodecil-sulfato sódico (SDS)	2 gr.
Beta-mercaptoetanol	2 ml.
Urea 8M	48 gr.
H ₂ O destilada	100 ml.

C) Solución tampón del gel.

$PO_4H_2Na \cdot H_2O$	7,8 gr.
$PO_4HNa_2 \cdot 7H_2O$	38,6 gr.
SDS	2 gr.
H ₂ O dest.	1 l.

D) Solución de persulfato amónico: 15 mg./ml.

E) Azul de bromofenol al 0,05%.

F) Solución de ácido tricloroacético al 5%.

G) Solución de acrilamida-bis-acrilamida.

Acrilamida	22,2 gr.
Bis-acrilamida	0,6 gr.
H ₂ O destilada	100 ml.

H) Teñido de geles (solución acuosa).

Metanol	46 partes
Acido acético glacial	8 partes
Azul de Comassie R	0,25%(en agua)

I) Decolorante.

Solución metanol:acético	20:8
--------------------------	------

6.2.- Preparación de placas.

La cubeta consiste básicamente en un recipiente de plástico con dos cubetas a distinto nivel y con los electrodos circulares de platino según modelo de FRASCH y GOTCHLICH, 1.974, construida gracias a la amabilidad de los Dres. A. SANTOS y RUIZ ALBUSAC del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

En la pared que separa ambas cubetas se sitúan las placas de cristal de 5 x 120 x 140 mm. que son las que van a contener el gel. La preparación de las placas de gel se realizó de la siguiente manera:

78.

- Deaireación del gel.
- Desengrase de las placas de cristal con tolueno.
- Colocación de separadores y grasa aislante.
- Vertido del gel lentamente, aplicando posteriormente a la polimerización (1 hora) el gel concentrador.
- Se aplica el peine molde que producirá los pocillos de aplicación de las muestras.
- Ingredientes de cada placa:

Tampón del gel	16,9 ml.
Sol. de acrilamida- Bis-acrilamida	15,5 ml.
Sol. de persulfato amónico	1,7 ml.
TEMED	51 mcl.

Gel concentrador:

Tampón del gel	2,5 ml.
Acrilamida	1 ml.
Bis-acrilamida al 2%	0,6 ml.
H ₂ O	2 ml.
TEMED	10 mcl.
Persulfato amónico	2 ml.

6.3.- Proceso de electroforesis.

La muestra se prepara tras la ultracentrifugación a 100.000 g en la extracción de los antígenos de serotipo ya descrita (Apartado 5.2.), se incuba durante 2 horas a 37°C en baño, en 0,5 ml. de la solución de incubación, consistente en 1% de SDS, 1% de beta-mercaptoetanol en tampón fosfato pH 7.

79.

La muestra, conteniendo entre 1,5 y 2 mcg/ml. de proteínas, se calienta durante 2 min. a 100°C en la solución de calentamiento (20 µl de los antígenos, 20 µl del trazador y 20 µl de la solución de calentamiento).

El trazador se prepara de la siguiente manera:

Azul de bromofenol al 0,05%	3 µl.
Glicerol	3 µl.
Beta-mercaptoetanol	5 µl.
Tampón fosfato pH 7	50 µl.

La muestra (50 µl) se situa en los pocillos y estos se enrasan con unas gotas de agua-solución tampón.

Para correr la electroforesis se utilizó una fuente LKB 2103, aplicando el electrodo positivo abajo y con una corriente de 80 mA durante 4 a 6 horas.

Después de terminada la electroforesis, se procedió al fijado de los geles, en una solución de ácido tricloroacético al 5% durante 2 horas.

La tinción se realizó en agitación suave, con la solución ya descrita, durante 5 a 8 horas.

Por último la decoloración se realizó, en agitación con una solución 46:8 metanol:acético durante 3 horas.

Los geles pueden conservarse tras su desecación al vacío.

6.4.- Obtención de patrones y controles de pesos moleculares.

Los patrones de referencia de los diferentes serotipos, se obtuvieron con las cepas patrón ya señaladas (Apartado 2.1a). Para los controles de pesos moleculares, se utilizó una mezcla de proteínas (DALTON MARK IV: Lisozima 14.300 d., lactoglobulina 18.400 d., Tripsinógeno 25.000 d., Pepsina 35.000 d. y Ovoalbúmina 43.000 d. Estas proteínas son las idóneas para comparar pesos moleculares de las proteínas serotipoespecíficas, ya que el determinante antigénico del serotipo 2 tiene un peso molecular de 41.000 daltons, mientras que las proteínas de las cepas 1,8 son de 46.000, 37.000 y 29.000 daltons, pesos moleculares muy similares a los de las proteínas control.

7.- Pruebas de sensibilidad a antimicrobianos.

7.1.- Estudio de la concentración mínima inhibitoria de sulfadiazina.

La sensibilidad frente a sulfadiazina, se realizó en placas de agar Mueller Hinton, a las que se le añadieron concentraciones de 1, 5, 10, 25, 50 y 100 mcg/ml. de medio."

Se prepararon suspensiones a partir de cultivos de meningococos de 24 horas en placas de agar sangre, Estas suspensiones se ajustaron a una concentración de 10^5 gérmenes/ml. Para este ajuste se utilizó un fotocolorímetro Spectronic 20 (Bausch y Lomb) con un intervalo de longitud de onda de 375 a 650 milimicras. Para este ajuste se eligió la onda de 500 milimicras por ser la que daba el máximo de absorción.

La concentración se estableció mediante la construcción de una curva estandar de absorbancias, con la medida de varias diluciones realizadas a partir de una suspensión densa en solución salina, del microorganismo (1/5, 1/10, 1/25, 1/100, 1/125 y 1/625). Paralelamente a estas medidas de absorbancia, las diluciones se sembraron en placas de agar Mueller Hinton para conocer el nº de gérmenes por ml. correspondientes.

Con un asa calibrada de 2 mm. de ϕ se realizó una estría de 2 cm, en la placa con cada microorganismo (se incluyen 1/4 cepas por placa). Después de una incubación de 18-24 horas en atmósfera húmeda, las placas fueron leídas y la concentración mas baja la cual inhibio el 90% del crecimiento con respecto al control, fué considerada como la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En todas las pruebas se incluyeron placas de agar Mueller Hinton sin sulfadiazina, en las cuales se exigió un crecimiento confluyente de la cepa.

Así mismo, en cada nuevo lote de medio, se incluyeron cepas control con las CMIs previamente establecidas para comprobar la reproducibilidad.

Las cepas se agruparon atendiendo a su CMI:

Cepas sensibles:	CMI	$\leq 1 \mu\text{g./ml.}$
Cepas moderadamente resistentes:	CMI	de 5 a 10 $\mu\text{g./ml.}$
Cepas resistentes:	CMI	$\geq 25 \mu\text{g./ml.}$

La solución base de sulfadiazina fué de 1000 ug./ml. y para obtenerla se disuelven 0,1 gr. de sulfadiazina en 95 ml. de agua destilada estéril y caliente, añadiendo NaOH 1N lentamente hasta que se disuelva y se completa se ha lugar con H₂O hasta 100 ml. La conservación de esta solución se hace a -20°C hasta su uso.

Las diluciones antes mencionadas se preparan en el momento de hacer las placas a concentraciones 10 veces mayores que las utilizadas como concentración final en el agar.

Cada placa se prepara con 18 ml. de agar enfriado a 50°C y 2 ml. de estas soluciones. Es importante mezclar bien la placa para una distribución homogénea.

7.2.- Antibióticos.

En el caso de los antibióticos, se realizaron los siguientes estudios:

- a) Encuesta de susceptibilidad de todas las cepas antes mencionadas, tanto de enfermos como de portadores frente a una concentración de 0,1 µg/ml. de rifampicina, ampicilina y penicilina.
- b) Estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) frente a los tres antibióticos en aquellas cepas resistentes en el aparatado anterior.
- c) Muestreo de CMI de cepas aisladas de enfermos y sensibles a la concentración ya mencionada, con objeto de evaluar el grado de susceptibilidad de

estas cepas consideradas no resistentes.

- d) Estudio de CMIs de cepas de enfermos para los antibióticos cloranfenicol, minociclina y espiramicina.

En todos los casos se estudió la posible relación de los marcadores antígenicos con las CMIs.

Los antibióticos usados, su procedencia y los solventes empleados se indican a continuación: Penicilina G sódica (Antibióticos S.A.)(Agua), Ampicilina (Antibióticos S.A.)(Agua), Rifampicina (Merck, Sharp & Dohne)(Metanol), Cloranfenicol (Antibióticos S.A.)(Metanol), Minociclina (Minocin-cápsulas)(Lederle)(Agua y NaOH 0,1N) y Espiramicina (Rhodia)(Etanol).

Las concentraciones utilizadas, para la penicilina, ampicilina, y rifampicina fueron desde 0,00625 $\mu\text{g/ml.}$ a 1,6 $\mu\text{g/ml.}$, mientras que las estudiadas en cloranfenicol, minociclina y espiramicina cubrían un espectro entre 0,1 $\mu\text{g/ml.}$ y 6,4 $\mu\text{g/ml.}$

Las diluciones de todos los antibióticos se realizaron en agua destilada. Las condiciones de siembra, preparación de inóculo, placas, lectura e interpretación de resultados, fueron similares a las descritas previamente para el estudio de las CMIs de sulfadiazina.

Las soluciones base de los distintos antibióticos fueron 5.000 $\mu\text{g/ml.}$ para penicilina, ampicilina y rifampicina y 6.400 $\mu\text{g/ml.}$ en los restantes. Estas soluciones se conservaron en pequeñas cantidades a -70°C , haciéndose las concentraciones de trabajo inmediatamente antes de su uso.

84

R E S U L T A D O S
=====

1.- DISTRIBUCION POR EDADES Y SEXOS DE LOS CASOS CONFIRMADOS
BACTERIOLOGICAMENTE EN LA ONDA EPIDEMICA ACTUAL.

1.1.- Distribución etária.

En el CUADRO 1 se muestra la distribución por grupos de edad de 1.211 casos de infección meningocócica confirmados bacteriológicamente. De los datos obtenidos se desprende que un 14,9% de los casos se han producido en los menores de 1 año y un 50% en los menores de 5 años. Los menores de 14 años suponen el 79,4% y el 89% de los mismos se alcanza en los menores de 34 años.

En las GRAFICAS 3 y 4 se muestra el porcentaje acumulado y la distribución dentro de los grupos de edad de los casos.

1.2.- Distribución por sexos.

En la GRAFICA 5 y el CUADRO 2 se observa un ligero predominio de los varones en el conjunto de los casos.

Como se puede ver, este ligero predominio se produce a expensas de los casos dentro de edades inferiores a los 24 años y se advierte, a partir de las mismas, un claro aumento de casos en mujeres.

2.- SEROGRUPOS DE LOS MENINGOCOCOS AISLADOS DE ENFERMOS.

2.1.- Distribución temporal.

Los resultados correspondientes al estudio de 2.223 cepas de meningococos aislados de enfermos (LCR ó sangre), durante los 4 años del estudio se expresan en el CUADRO 3.

El serogrupo predominante es el B, que alcanza un promedio en los 4 años del 84,5%, siguiéndole en importancia el A (11,1%), el C(3,9%) y el Y(0,05%). Las cepas no grupables (autoaglutinables, heteroaglutinables y no aglutinables), representaron un 0,4%).

Es destacable, el incremento del serogrupo C en 1.981 alcanzando el 14% a expensas fundamentalmente del grupo A que desciende a un 3,8%. Descenso ya observado en el año anterior esta vez a expensas del grupo B que sufrió un incremento del 10%.

2.2.- Distribución geográfica.

En el CUADRO 4, se expresa la distribución de los serogrupos atendiendo a su lugar de procedencia.

Aunque en todas las zonas del país, el serogrupo B es claramente predominante, se pueden señalar algunas particularidades dignas de mención:

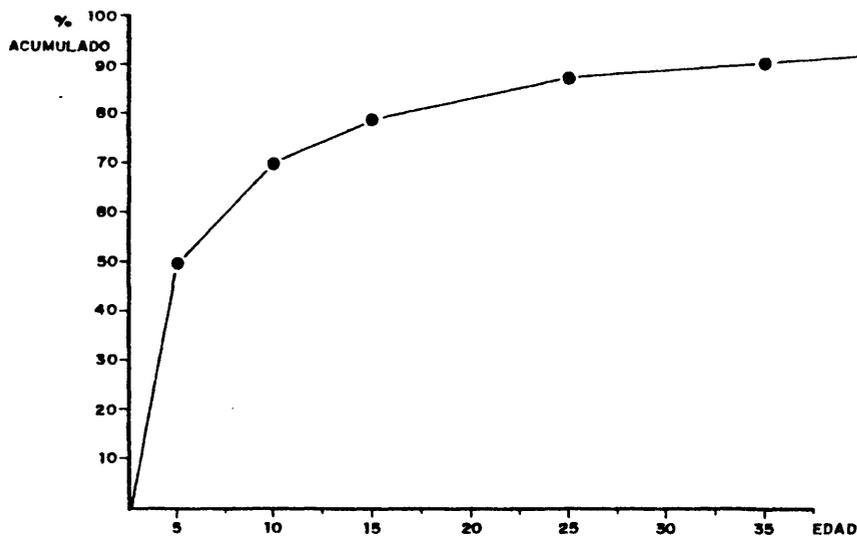
- a) Una zona que comprende Aragon, Rioja, País Vasco, y Navarra, donde el serogrupo C presenta una cierta relevancia respecto a la media del país durante todo el periodo.
- b) Ausencia de cepas C en Extremadura.
- c) Zonas en que el serogrupo A presenta un porcentaje alto con relación al resto del país: Madrid, Castilla, Murcia y Rioja.
- d) Zonas con un predominio del serogrupo B muy por encima de la media del país: Galicia y Asturias.

Cuadro 1.- Casos de infección meningocócica confirmados bacteriológicamente.
Distribución por edades (1.978-1.981).

<u>Grupos de Edad</u>	<u>1978</u>	<u>1979</u>	<u>1980</u>	<u>1981</u>	<u>1978-81</u>	<u>%</u>	<u>% acumulado</u>
Menos de 1 año	21	53	65	42	181	14,95	
De 1 a 4 años	43	137	156	89	425	35,09	50,04
De 5 a 9 años	16	78	94	60	248	20,48	70,52
De 10 a 14 años	18	44	22	23	107	8,84	79,36
De 15 a 24 años	10	51	26	11	98	8,09	87,45
De 25 a 34 años	2	11	7	4	24	1,98	89,43
De 35 a 44 años	5	10	6	5	26	2,15	91,58
De 45 a más años	13	45	32	12	102	8,42	100,00
	<u>128</u>	<u>429</u>	<u>408</u>	<u>246</u>	<u>1.211</u>	<u>100,00</u>	

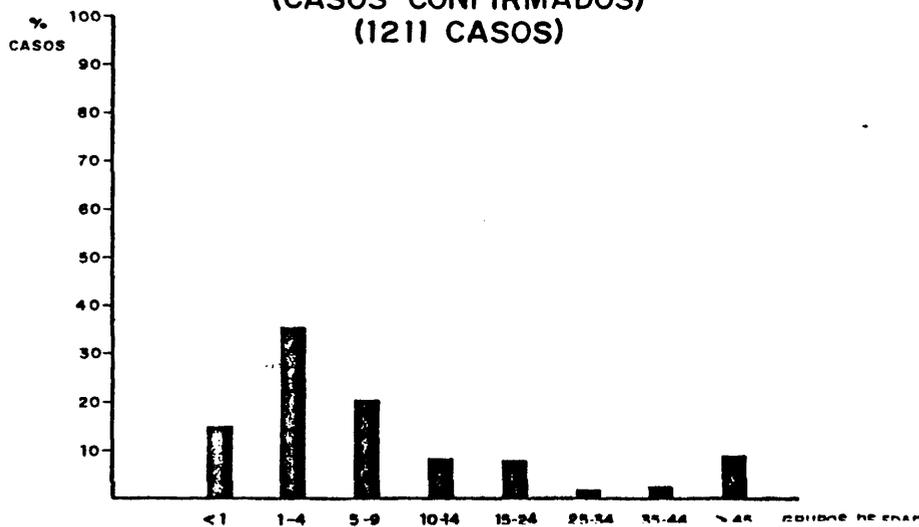
GRAFICA 3

DISTRIBUCION POR EDADES DE LOS CASOS DE INFECCION MENINGOCOCICA (CASOS CONFIRMADOS) (1978 - 1981)



GRAFICA 4

DISTRIBUCION DE CASOS DE INFECCION MENINGOCOCICA POR GRUPOS DE EDAD (CASOS CONFIRMADOS) (1211 CASOS)

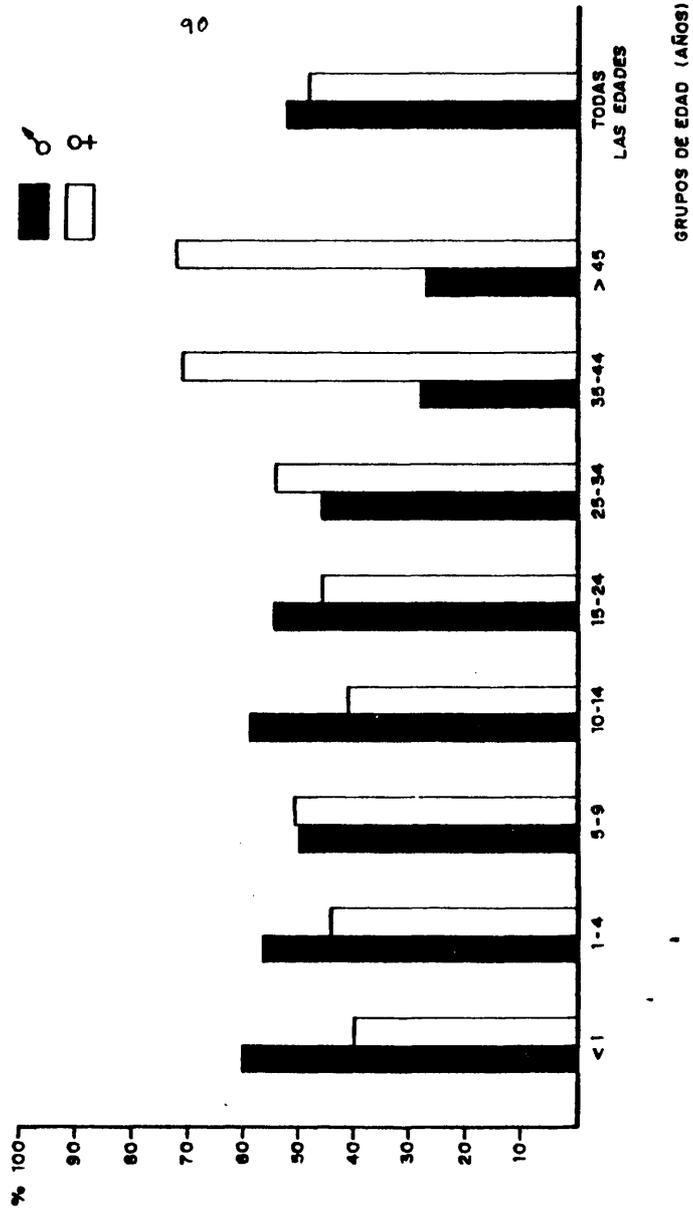


Cuadro 2.- Casos de infección meningocócica, confirmados bacteriológicamente. Distribución por edades y sexos (1.790 casos).

<u>Grupos de edad</u>	<u>Varones</u>	<u>%</u>	<u>Mujeres</u>	<u>%</u>
Menos de 1 año	96	60,4	63	39,6
De 1 a 4 años	213	55,9	168	44,1
De 5 a 9 años	119	49,4	122	50,6
De 10 a 14 años	52	58,4	37	41,6
De 15 a 24 años	48	54,5	40	45,5
De 25 a 34 años	10	45,5	12	54,5
De 35 a 44 años	6	28,6	15	71,4
De 45 a mas años	24	27,6	63	72,4
No consta edad	363	51,7	339	48,3
Totales	931	52,0	859	48,0

GRAFICA 5

DISTRIBUCION DE LOS CASOS DE INFECCION MENINGOCOCICA
SEGUN SEXO Y EDAD
(CASOS CONFIRMADOS BACTERIOLOGICAMENTE)
(1790 CASOS)



CUADRO 3.- SEROGRUPOS DE LAS CEPAS DE MENINGOCOCOS AISLADAS DE ENFERMOS DURANTE LA ULTIMA ONDA EPIDEMICA (1.978 - 1.981).

AÑOS	S E R O G R U P O S					TOTALES
	A	B	C	Y	NG ^a	
1.978	50 (13,5) ^b	313 (84,8)	5 (1,4)		1 (0,3)	369
1.979	145 (16,8)	704 (81,8)	11 (1,3)	1 (0,1)		861
1.980	37 (6,1)	549 (91,0)	17 (2,9)			603
1.981	15 (3,8)	312 (80,0)	55 (14,1)		8 (2,1)	390
TOTALES	247 (11,1)	1.878 (84,5)	88 (3,95)	1 (0,05)	9 (0,4)	2.223

a Incluye cepas autoaglutinables, heteroaglutinables y no aglutinables.

b Porcentaje.

CUADRO 4.- DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE LOS SEROGRUPOS DE
MENINGOCOCOS AISLADOS EN ENFERMOS, EN LAS
DISTINTAS PROVINCIAS Y REGIONES DE ESPAÑA.

PROCEDENCIA	SEROGRUPOS					TOTALES
	A	B	C	Y	NG ^a	
Almeria	-	-	-	-	-	-
Cadiz	1	16	-	-	-	17
Cordoba	-	1	1	-	-	2
Granada	1	11	-	-	-	12
Huelva	-	-	-	-	-	-
Jaen	-	-	-	-	-	-
Malaga	11	25	1	-	-	37
Sevilla	21	172	9	-	-	197
ANDALUCIA	34	225	11	-	-	270
%	(12,6)	(83,3)	(4,1)			
Huesca	-	-	-	-	-	-
Teruel	-	-	-	-	-	-
Zaragoza	5	27	4	-	-	36
ARAGON	5	27	4	-	-	36
%	(13,9)	(75,0)	(11,1)			
ASTURIAS	14	185	8	-	-	207
%	(6,8)	(89,4)	(3,8)			
BALEARES	-	2	-	-	-	2
%		(100,0)				
CANARIAS	-	10	-	-	-	10
%		(100,0)				
CANTABRIA	19	128	5	-	2	154
%	(12,35)	(83,1)	(3,25)		(1,3)	

CUADRO 4.- CONTINUACION.

93

	A	B	C	Y	NG ^a	
Ciudad Real	-	-	-	-	-	-
Cuenca	-	-	-	-	-	-
Guadalajara	1	3	-	-	-	4
Toledo	-	-	-	-	-	-
Albacete	-	-	-	-	-	-
CASTILLA- LA MANCHA	1	3	-	-	-	4
%	(25,0)	(75,0)				
Avila	3	4	-	-	-	7
Burgos	-	-	-	-	-	-
Leon	3	3	-	-	-	6
Palencia	-	2	-	-	-	2
Salamanca	1	2	-	-	-	3
Segovia	4	14	1	-	-	19
Soria	-	-	-	-	-	-
Valladolid	2	5	1	-	-	8
Zamora	-	-	-	-	-	-
CASTILLA- LEON	13	30	2	-	-	45
%	(28,9)	(66,7)	(4,4)			
Lerida	-	-	-	-	-	-
Barcelona	55	552	28	-	3	638
Gerona	2	42	1	1	-	46
Tarragona	2	1	1	-	-	4
CATALUÑA	59	595	30	1	3	688
%	(8,6)	(86,4)	(4,4)	(0,15)	(0,45)	
Caceres	-	13	-	-	-	13
Badajoz	4	14	-	-	-	18
EXTREMADURA	4	27	-	-	-	31
%	(12,9)	(87,1)				

CUADRO 4.- CONTINUACION.

94
94

	A	B	C	Y	NG ^a	
La Coruña	13	118	4	-	-	135
Lugo	1	29	1	-	-	31
Orense	-	16	-	-	-	16
Pontevedra	-	10	1	-	-	11
GALICIA	14	173	6	-	-	193
%	(7,3)	(89,6)	(3,1)			
MADRID	41	216	7	-	3	267
%	(15,4)	(80,9)	(2,6)		(1,1)	
MURCIA	6	25	-	-	-	31
%	(19,4)	(80,6)				
NAVARRA	2	9	1	-	-	12
%	(16,7)	(75,0)	(8,3)			
Alicante	-	-	-	-	-	-
Castellon	-	1	1	-	-	2
Valencia	24	181	5	-	1	211
VALENCIA	24	182	6	-	1	213
%	(11,3)	(85,4)	(2,8)		(0,5)	
Alava	1	13	2	-	-	16
Guipuzcoa	1	6	-	-	-	7
Vizcaya	-	1	-	-	-	1
PAIS VASCO	2	20	2	-	-	24
%	(8,35)	(83,3)	(8,35)			
RIOJA	9	21	6	-	-	36
%	(25,0)	(58,3)	(16,7)			
TOTALES	247	1.878	88	1	8	2.223
%	(11,1)	(84,5)	(3,95)	(0,05)	(0,4)	

a, Incluye cepas autoaglutinables, heteroaglutinables y no aglutinable

CUADRO 4.- RESUMEN POR REGIONES DE LOS SEROGRUPOS
AISLADOS DE ENFERMOS (1.978-1.981).

95

SEROGRUPOS:

REGION	Nº CEPAS	A	B	C	Y	NG
ANDALUCIA	270	(12,6)	(83,3)	(4,1)	-	-
ARAGON	36	(13,9)	(75,0)	(11,1)	-	-
ASTURIAS	207	(6,8)	(89,4)	(3,8)	-	-
BALEARES	2	-	(100)	-	-	-
CANARIAS	10	-	(100)	-	-	-
CANTABRIA	154	(12,35)	(83,1)	(3,25)	-	(1,3)
CASTILLA- LA MANCHA	4	(25,0)	(75,0)	-	-	-
CASTILLA- LEON	45	(28,9)	(66,7)	(4,4)	-	-
CATALUÑA	688	(8,6)	(86,4)	(4,4)	(0,15)	(0,45)
EXTREMADURA	31	(12,9)	(87,1)	-	-	-
GALICIA	193	(7,3)	(89,6)	(3,1)	-	-
MADRID	267	(15,4)	(80,9)	(2,6)	-	(1,1)
MURCIA	31	(19,4)	(80,6)	-	-	-
NAVARRA	12	(16,7)	(75,0)	(8,3)	-	-
VALENCIA	213	(11,3)	(85,4)	(2,8)	-	(0,5)
PAIS VASCO	24	(8,35)	(83,3)	(8,35)	-	-
RIOJA	36	(25,0)	(58,3)	(16,7)	-	-
TOTALES	2.223	(11,1)	(84,5)	(3,95)	(0,15)	(0,4)

2.3.- Distribución etaria.

En el CUADRO 5 y la GRAFICA 6 se expresan la distribución etaria de los serogrupos de meningococo aislados de enfermos. Tanto el serogrupo B como el C se distribuyen de forma similar alcanzándose alrededor del 50% de los casos en menores de 4 años, para ir descendiendo en las edades adultas. Sin embargo el serogrupo A tiene una distribución algo mas desplazada hacia edades mayores, ya que el 54% lo alcanza en menores de 14 años y parece observarse un desplazamiento de este serogrupo hacia edades superiores a los 45 años.

No obstante, aunque apreciable, el bajo porcentaje de aislamientos de este serogrupo enmascara, el fenómeno si se analiza la importancia relativa de los distintos serogrupos en cada grupo de edad (CUADRO 5Bis y GRAFICA 7), siendo en todos ellos predominante el B, desde un 85% en menores de 1 año y 91% en el grupo entre 1 y 4 años, hasta el 68% en mayores de 45. En dicha GRAFICA, se puede apreciar una cierta acumulación de casos del serogrupo A en los mayores de 45 años (26%).

3.- SEROGRUPOS DE MENINGOCOCO AISLADOS DE PORTADORES.

Al contrario de lo que sucedía en enfermos, en que se aislaban un número reducido de serogrupos, con uno cláramente predominante (el B), en 481 cepas aisladas de portadores sanos (fundamentalmente población militar y algunos contactos de casos) se encuentran todos los serogrupos existentes. El predominio sigue siendo para el B (58%), siguiéndole en importancia el A (9,6%) y el Y (6,6%). Las cepas no grupables constituyen un 9% (CUADRO 6).

CUADRO 5.- DISTRIBUCION ETARIA DE LOS SEROGRUPOS MAYORITARIOS
AISLADOS DE ENFERMOS (1.207 cepas).

GRUPOS DE EDAD	A	B	C
De menos de 1 año	13(10,50) ^a	148(14,42)	13(22,80)
De 1 a 4 años	20(16,12)	378(36,84)	18(31,60)
De 5 a 9 años	22(17,74)	219(21,35)	8(14,03)
De 10 a 14 años	14(11,30)	80(7,80)	8(14,03)
De 15 a 24 años	18(14,51)	83(8,10)	3(5,26)
De 25 a 34 años	4(3,22)	19(1,85)	-
De 35 a 44 años	3(2,41)	20(1,95)	1(1,75)
De 45 a más años	30(24,20)	79(7,69)	6(10,53)
Totales	124	1.026	57

a Porcentaje.

+ Cuatro cepas autoaglutinables no incluidas en el cuadro de
aislaron de niños entre 1 y 4 años.

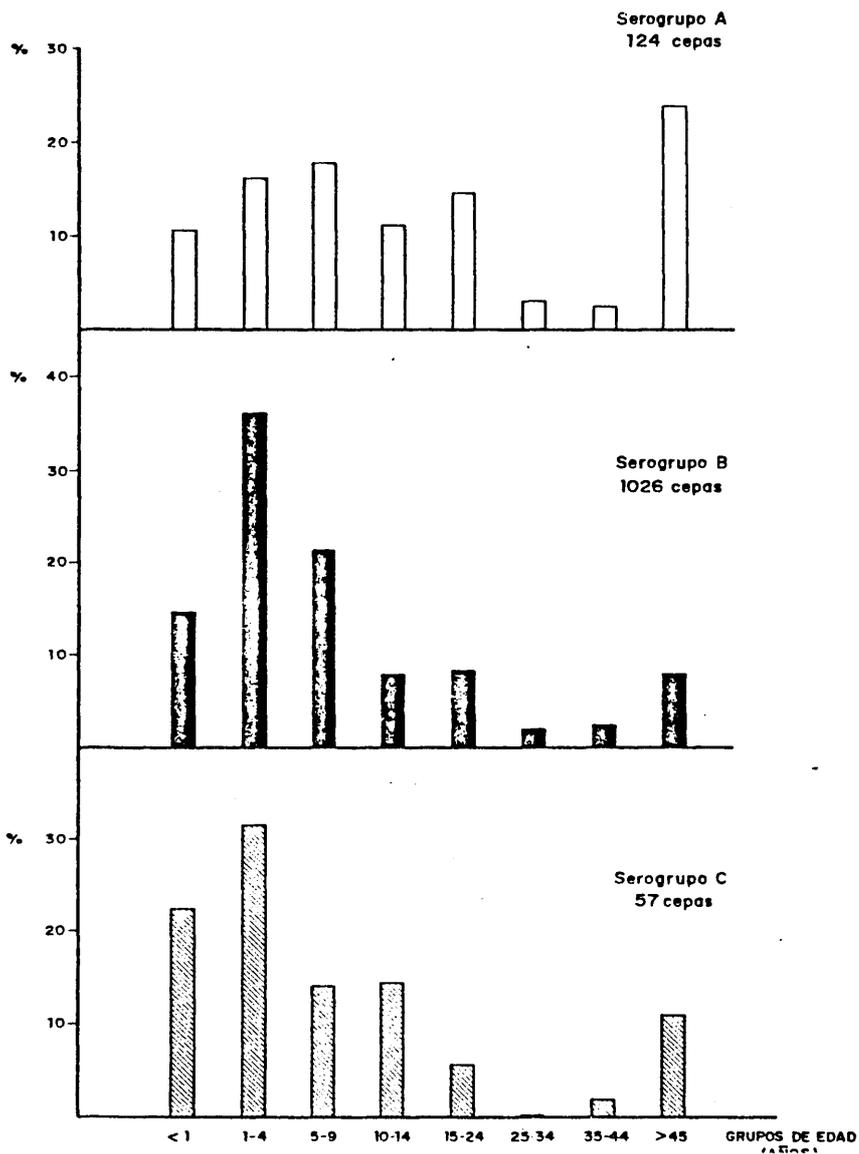
CUADRO 5 Bis.- IMPORTANCIA RELATIVA DE LOS SEROGRUPOS AISLADOS
DE ENFERMOS SEGUN SU GRUPO DE EDAD (PORCENTAJES).

GRUPOS DE EDAD	CEPAS	A	B	C
De menos de 1 año	174	7,5	85,0	7,5
De 1 a 4 años	416	4,8	90,9	4,3
De 5 a 9 años	249	8,8	88,0	3,2
De 10 a 14 años	102	13,8	78,4	7,8
De 15 a 24 años	104	17,3	79,8	2,9
De 25 a 34 años	23	17,4	82,6	-
De 35 a 44 años	24	12,5	83,3	4,2
De 45 a más años	115	26,1	68,7	5,2
TOTALES	1.207	10,3	85,0	4,7

GRAFICA 6

11

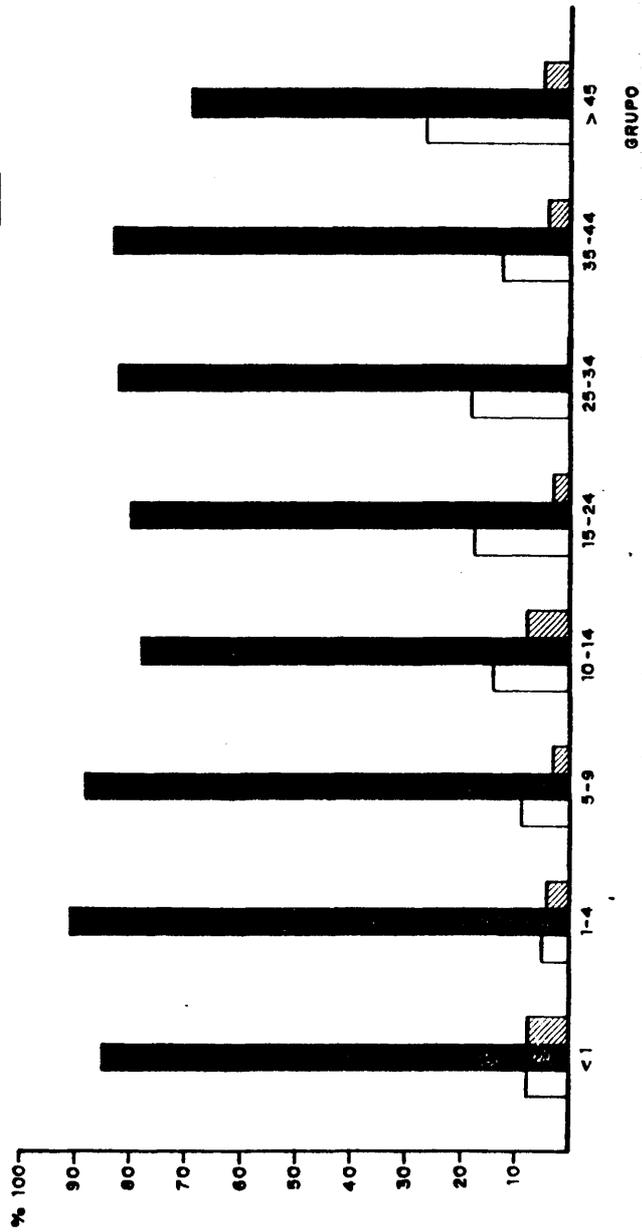
DISTRIBUCION ETARIA DE LOS SEROGRUPOS
DE MENINGOCOCOS AISLADOS DE ENFERMOS
(1978 - 1981)
(1207 - CEPAS)



GRAFICA 7

IMPORTANCIA RELATIVA DE LOS SEROGRUPOS AISLADOS DE ENFERMOS DENTRO DE LOS GRUPOS DE EDAD (1207 CEPAS)

Serogrupo A
Serogrupo B
Serogrupo C



CUADRO 6.- DISTRIBUCION DE LOS SEROGRUPOS DE MENINGOCOCOS AISLADOS DE PORTADORES DURANTE LA ONDA ACTUAL (1.978-1.981).

AÑOS	S E R O G R U P O S											TOTALES
	A	B	C	D	X	Y	Z	29E	W135	NG	NG	
1.978	16	55	5	1	1	12	1	15	1	14		121
1.979	21	105	4	-	5	14	22	5	4	18		198
1.980	7	51	-	-	-	1	1	-	1	-		61
1.981	2	71	9	-	-	5	-	3	-	11		101
TOTALES	46	282	18	1	6	32	24	23	6	43		481
%	9,6	58,6	3,7	0,2	1,25	6,65	5,0	1,25	4,8	8,95		

4.- RESISTENCIA A SULFADIAZINA DE LAS CEPAS DE MENINGOCOCO AIS-
LADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES.

4.1.- Concentraciones mínimas inhibitorias en cepas aisla-
das de enfermos.

La sensibilidad frente a sulfadiazina de 2.223 cepas aisladas de enfermos se muestra en el CUADRO 7 y la GRAFICA 8. Las cepas resistentes (CMI mayor ó igual a 25 µg./ml.) constituyen un elevado porcentaje, alcanzando para el periodo de 4 años, el 83,7% y una media geométrica de 37,7% µg./ml., las moderadamente resistentes (CMI de 5 a 10 µg./ml.) alcanza el 14,5% y las cepas sensibles, solo engloban un 2% de las cepas.

No se observa a lo largo del estudio una variación significativa de los porcentajes de resistencia si exceptuamos una disminución de las cepas resistentes (77%) en favor de las moderadamente resistentes (21,2%) en 1.980.

4.2.- CMIs de cepas aisladas de portadores.

Las CMIs de sulfadiazina de las cepas aisladas de portadores se muestran en el CUADRO 9 y la GRAFICA 8. Las cepas resistentes engloban un 54,5%; en relación con las cepas de enfermos esta proporción es bastante inferior, notándose un aumento de las cepas moderadamente resistentes (28,9%) y sobre todo de las cepas sensibles (16,6%). El incremento de las cepas sensibles es posible explicarlo, debido a las CMIs mucho menores de los serogrupos no encontrados en enfermos (datos no recogidos en el cuadro).

Sin embargo en la GRAFICA 8 se puede observar una disminución paulatina del porcentaje de las cepas sensibles a lo largo de los 4 años del estudio, en favor de un incremento del de las moderadamente resistentes y que particularmente en 1.981, se traduce en un aumento de las cepas resistentes.

Una comparación de las CMI_{50} y CMI_{90} en cepas de enfermos y portadores se muestra en la GRAFICA 9. En esta GRAFICA se observa una apreciable diferencia en la CMI_{50} de ambos grupos de cepas, mientras que la CMI_{90} es similar.

4.3.- CMIs de sulfadiazina y serogrupos de cepas aisladas de enfermos.

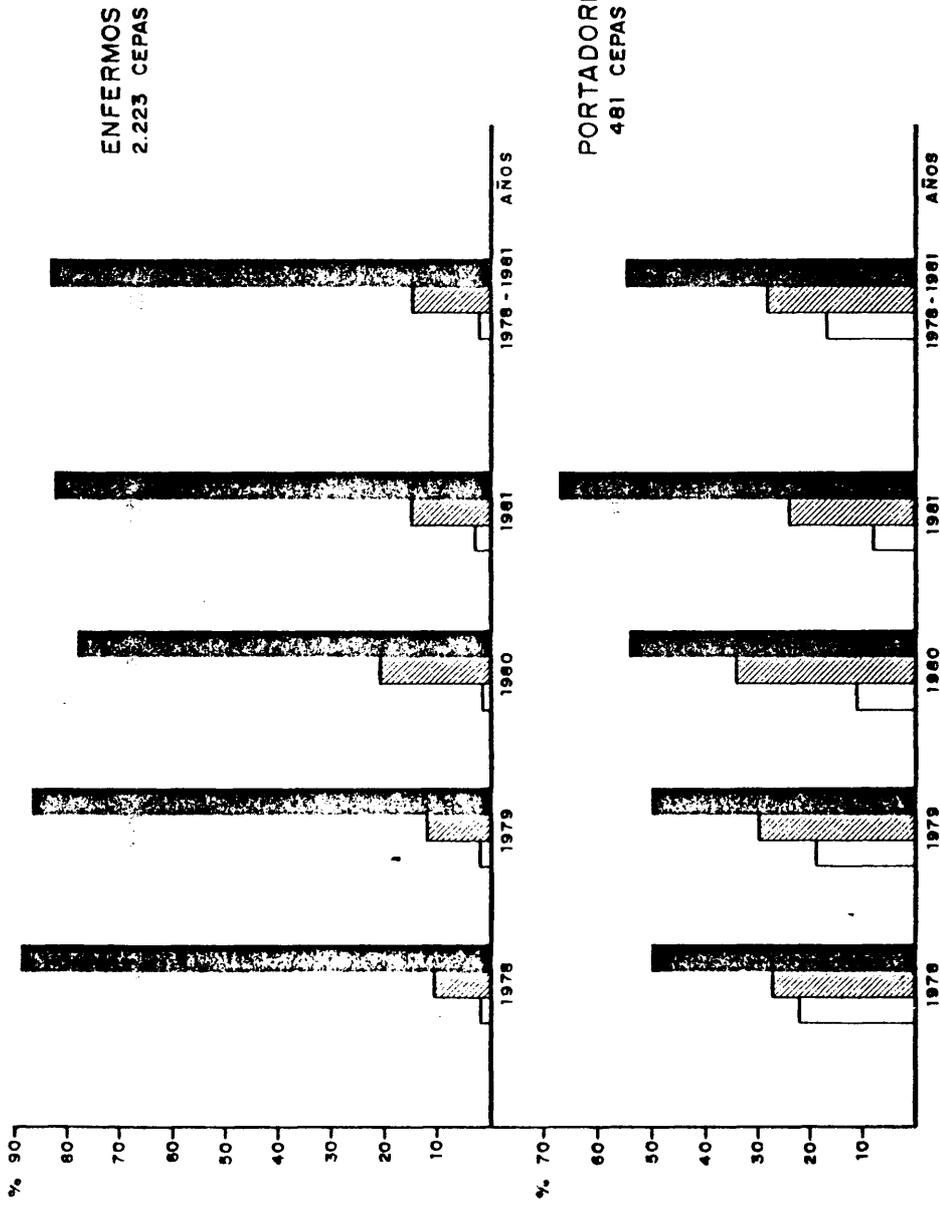
La correlación entre las CMIs a sulfadiazina y el serogrupo de cepas de enfermos se expresan en el CUADRO 8. No se aprecian diferencias significativas entre los diferentes serogrupos. Aunque se observa un porcentaje de cepas sensibles algo mayor dentro del serogrupo C (5,7%).

CUADRO 7.- RESISTENCIAS A SULFADIAZINA DE LAS CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS EN LA ÚLTIMA ONDA EPIDÉMICA (1.978-1.981)

AÑOS	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml.)						N ^b	TOTALES
	S ^a	MR ^a		R ^a				
		5	10	25	50			
1.978	6	9	28	132	154	40	369	
%	(1,6)	(10,8)	(88,4)					
1.979	18	25	75	413	228	102	861	
%	(2,1)	(11,6)	(86,3)					
1.980	9	28	100	304	112	50	603	
%	(1,5)	(21,2)	(77,3)					
1.981	11	14	43	163	119	40	390	
%	(2,8)	(14,6)	(82,6)					
TOTALES	44	76	246	1.012	613	232	2.223	
%	(2,0)	(14,5)	(83,5)					

a S: cepas sensibles, MR: Moderadamente resistentes, R: Resistentes.
 b M: Media geométrica de cepas resistentes.

DISTRIBUCION DE LAS CMIs DE SULFADIAZINA DE CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES (1978-1981)



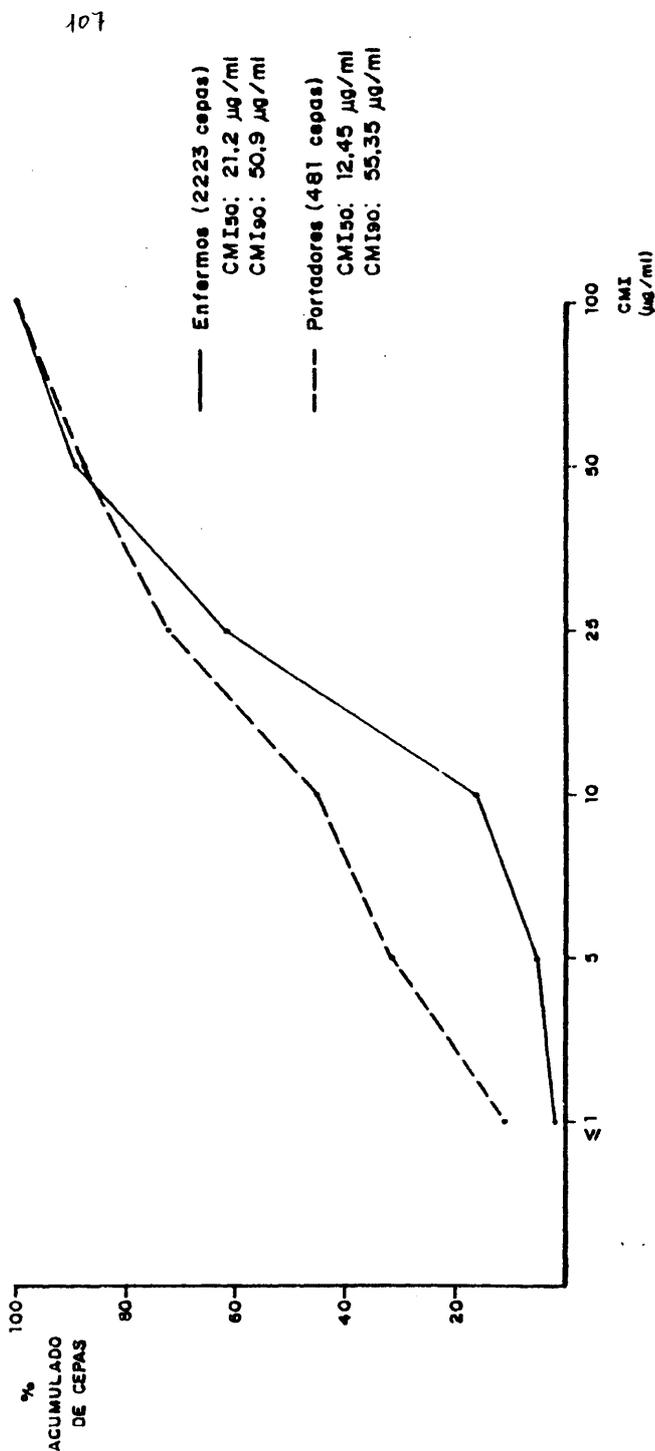
CUADRO 9.- RESISTENCIAS A SULFADIAZINA DE LAS CEPAS AISLADAS DE PORTADORES.

AÑOS	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ ml.)						TOTALES	
	S ^a	MR		R		M		
		5	10	25	50			≥100
1.978 %	27 (22,3)	25 (27,3)	8	19	27 (50,4)	15	47,8	121
1.979 %	38 (19,2)	31 (30,3)	29	58	24 (50,5)	18	37,9	198
1.980 %	7 (11,5)	5 (34,4)	16	20	8 (54,1)	5	36,5	61
1.981 %	8 (7,9)	13 (24,8)	12	35	17 (67,3)	16	41,1	101
TOTALES %	80 (16,6)	74 (28,9)	65	132	76 (54,5)	54	40,7	481

a S: Sensible, MR: Moderadamente resistente, R: Resistente.

b Media Geométrica de las cepas resistentes.

CMIs 50 Y CMIs 90 DE LAS CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES (SULFADIAZINA)



CUADRO 8.- RESISTENCIAS A LA SULFADIAZINA DENTRO DE LOS DIFERENTES SEROGRUPOS DE MENINGOCOCOS AISLADOS DE ENFERMOS EN LA ONDA ACTUAL (1.978-1.981).

SEROGRUPOS	AÑOS	Nº CEPAS	SENSIBLES	MODERADAMENTE RESISTENTES	RESISTENTES
A	1.978	50	1 (2,0) ^a	6 (12,0)	43 (86,0)
	1.979	145	2 (1,4)	18 (12,4)	125 (86,2)
	1.980	37	1 (2,7)	4 (10,8)	32 (86,5)
	1.981	15	-	1 (6,7)	14 (93,3)
	1.978-81	247	4 (1,6)	29 (11,75)	214 (86,65)
B	1.978	313	5 (1,6)	30 (9,6)	278 (88,8)
	1.979	704	16 (2,3)	79 (11,2)	609 (86,5)
	1.980	549	5 (0,9)	122 (22,2)	422 (76,9)
	1.981	312	9 (2,9)	53 (17,0)	250 (80,1)
	1.978-81	1.878	35 (1,9)	284 (15,1)	1.559 (83,0)
C	1.978	5	-	1 (20,0)	4 (80,0)
	1.979	11	-	2 (18,2)	9 (81,8)
	1.980	17	3 (17,6)	2 (11,8)	12 (70,6)
	1.981	55	2 (3,6)	2 (3,6)	51 (92,7)
	1.978-81	88	5 (5,7)	7 (7,95)	76 (86,35)

804

^a Porcentaje.

5.- SEROTIPOS DE MENINGOCOCO B AISLADOS DE ENFERMOS Y PORTADORES.5.1.- Distribución de serotipos en cepas de enfermos.

Los serotipos encontrados en 1.300 cepas de meningococos del grupo B aisladas de enfermos y su distribución geográfica se muestran en los CUADROS 10 y 11.

Observamos tres grupos mayoritarios de cepas: las cepas tipo 2 (25,7%), las de los serotipos relacionados 1,8,15 (27%) y las cepas no tipables que engloban un 43%. El resto de los serotipos encontrados constituyen un 3,85% (se incluyen los serotipos 5,6,9,11,12 y 14). No se han encontrado cepas de los serotipos 4 y 13.

No se aprecian diferencias significativas en los cuatro años del estudio, aunque parece apreciarse una ligera disminución del serotipo 2 y un ligero aumento de las cepas 1,8,15.

En el CUADRO 11 se recoge la procedencia de los serotipos estudiados. Como se puede comprobar, los tres grupos mayoritarios de cepas se encuentran presentes en las diferentes regiones, en proporciones parecidas a la media del país, con algunas excepciones:

Así el serotipo 2 es particularmente abundante en zonas como Extremadura, Murcia, Rioja ó Madrid. Siendo las cepas 1,8,15 muy abundantes en Asturias, Castilla-Leon y Galicia. En cuanto a las cepas no tipables, las zonas con porcentajes superiores a la media son Aragón, Andalucía y el País Vasco.

5.2.- Distribución de serotipos en portadores.

La distribución de serotipos en las cepas aisladas de portadores se muestran en el CUADRO 12.

Como hechos destacables podemos señalar, el de que las cepas 1,8,15 han sido casi todas aisladas de contactos de enfermos, mientras que las cepas del tipo 2 en un 50 % pertenecían a contactos y el resto a portadores no contactos. También se puede destacar que casi la totalidad de las cepas no tipables y de otros serotipos, pertenecían a portadores de la población general.

Se estudiaron los patrones electroforéticos de las cepas no tipables y se vió que un 85% presentaban un mismo patrón (IV), por lo que es probable una cierta similitud antigénica.

5.3.- Serotipos y CMI's de sulfadiazina.

En el CUADRO 14 se muestran las CMI's de las 1.300 cepas serotipadas pertenecientes al grupo B. No se encontraron diferencias en los serotipos, en cuanto a su resistencia a la sulfadiazina.

En los tres grupos mayoritarios de cepas se supera el 80% de cepas resistentes, alcanzándose porcentajes del 87,2% (tipo 2), 84,4% (tipos 1,8,15) y 81,2% (no tipables). En las cepas de otros serotipos el porcentaje de resistencias es algo mayor (94%).

La única diferencia apreciable entre los tres grupos principales es la mayor media geométrica de las cepas resistentes del serotipo 2 (41,1 µg./ml.).

6.- PATRONES ELECTROFORETICOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE CEPAS
 AISLADAS DE ENFERMOS.

En el CUADRO 13, se muestran los patrones electroforéticos de 439 cepas no tipables por inmunodifusión.

Se observa un claro predominio de las cepas con patrón IV (72,7%), seguido de los patrones I y II (15,5%) constituyendo otros patrones el 11%.

Con respecto a este marcador no hemos encontrado diferencias en cuanto a su localización geográfica, alcanzando en la mayoría de las regiones alrededor de un 90% el citado patrón IV y constituyendo prácticamente el 100% de las cepas no tipables estudiadas de Madrid, Valencia y Galicia.

La proporción de este patrón únicamente se encuentra disminuido en Cataluña, donde alcanza algo más del 60%, debido a la abundante proporción de los patrones I y II encontrados (35%) (Datos no recogidos en los cuadros).



CUADRO 10.- SEROTIPOS PROTEICOS DENTRO DEL SEROGRUPO B, DE CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS (1.978-1.981).

Serotipos	1.978	1.979	1.980	1.981	Totales
2	91 (29,1) ^a	97 (28,7)	123 (22,4)	23 (23,0)	334 (25,7)
1	12	10	34	7	63
8	57	54	89	18	218
15	3	24	39	6	72
					(27,15)
Otros ^b	19 (6,1)	13 (3,8)	15 (2,7)	3 (3,0)	50 (3,85)
NT ^c	131 (41,8)	140 (41,4)	249 (45,4)	43 (43,0)	563 (43,3)
Totales	313 (100)	338 (100)	549 (100)	100 (100)	1.300 (100)

212

a Porcentaje.

b Incluye los serotipos 5, 6, 9, 11, 12, 14. No se aislaron los serotipos 4 y 13.

c Cepas no tipables.

CUADRO 11.- DISTRIBUCION POR SEROTIPOS DE LAS CEPAS DEL SEROGRUPO B
AISLADAS DE ENFERMOS, SEGUN SUS LUGARES DE PROCEDENCIA.

PROCEDENCIA	S E R O T I P O S					TOTALES
	2	1,8,15	Otros ^a	NT ^b		
ANDALUCIA	31 (24,05) ^c	34 (26,35)	2 (1,55)	62 (48,05)	129	
ARAGON	4 (19,05)	4 (19,05)	2 (9,5)	11 (52,4)	21	
ASTURIAS	22 (14,0)	69 (43,9)	4 (2,5)	62 (39,5)	157	
CANARIAS	3 (37,5)	1 (12,5)	-	4 (50,0)	8	
CANTABRIA	24 (29,65)	18 (22,2)	3 (3,7)	36 (44,45)	81	
CASTILLA-						
LA MANCHA	1 (50,0)	-	-	1 (50,0)	2	
CASTILLA-LEON	4 (18,2)	8 (36,4)	1 (4,5)	9 (40,9)	22	
CATALUÑA	117 (30,7)	95 (24,95)	18 (4,7)	151 (39,65)	381	
EXTREMADURA	7 (46,7)	-	4 (26,65)	4 (26,65)	15	
GALICIA	26 (18,8)	44 (31,9)	4 (2,9)	64 (46,4)	138	
MADRID	47 (31,1)	28 (18,55)	8 (5,3)	68 (45,05)	151	
MURCIA	6 (40,0)	5 (33,3)	1 (6,7)	3 (20,0)	15	
NAVARRA	2 (25,0)	2 (25,0)	-	4 (50,0)	8	
VALENCIA	33 (23,9)	37 (26,8)	2 (1,45)	66 (47,85)	138	
PAIS VASCO	1 (5,55)	5 (27,8)	1 (5,55)	11 (61,1)	18	
RIOJA	6 (37,5)	3 (18,75)	-	7 (43,75)	16	
TOTALES	334 (25,70)	353 (27,15)	50 (3,85)	563 (43,30)	1.300	

^a Se incluyen los serotipos 5, 6, 9, 11, 12 y 14.

^b N° tipables.

^c Porcentaje.

114

CUADRO 12.- SEROTIPOS DE LAS CEPAS DEL SEROGRUPO B
AISLADAS DE PORTADORES.

<u>Serotipos</u>	<u>Cepas</u>	<u>Cepas de contactos</u>
2	60	30
1	7	5
8	10	10
15	12	8
Otros ^a	29	-
NT ^b	82 ^c	10
Totales	200	63

a Se incluyen los serotipos 5, 6, 11, 12 y 14.

b No tipables.

c El 85% de estas cepas pertenecen al patron IV de electroforesis en gel de poliacrilamida.

CUADRO 13.- PATRONES ELECTROFORETICOS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DE
 439 CEPAS NO TIPABLES POR INMUNODIFUSION DOBLE, AISLADAS
 DE ENFERMOS (1.978-1.981).

Patrón	1.978	1.979	1.980	1.981	Total
IV	90 (68,7) ^a	100 (71,4)	96 (76,8)	33 (76,7)	319 (72,7)
I, II	16 (12,2)	26 (18,6)	19 (15,2)	7 (16,3)	68 (15,5)
Otros ^b	25 (19,1)	14 (10,0)	10 (8,0)	3 (7,0)	52 (11,8)
TOTALES	131	140	125	43	439

115

a Porcentaje.
 b Se incluyen los patrones III, V, VI y X.

CUADRO 14.- CMI's DE SULFADIAZINA EN RELACION CON EL SEROTIPO PROTEICO DEL SEROGRUPO B, CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS (1.978-1.981).

SEROTIPOS	S ^a	MR		R			TOTALES
		5	10	25	50	≥100	
2	4	7	32	145	84	62	334
%	(0,1)	(11,7)		(87,2)			
1	-	2	5	33	18	5	63
8	3	7	25	116	63	4	218
15	-	3	10	41	15	3	72
%	(0,85)	(14,7)		(84,45)			
Otros ^c	-	-	3	25	22	-	50
%	-	(6,0)		(94,0)			
NT	12	24	70	285	130	42	563
%	(2,1)	(16,7)		(81,2)			
TOTALES	,19	43	145	645	332	116	1.300
%	(1,5)	(14,5)		(84,0)			

7.- ESTUDIOS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS DE LAS CEPAS DE MENINGOCOCOS AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES.

7.1.- Muestreo de vigilancia epidemiológica frente a penicilina, ampicilina y rifampicina.

Los resultados del estudio de susceptibilidad de las 2.223 cepas de meningococo aisladas de enfermos a 0,1 µg./ml. de penicilina, ampicilina y rifampicina se muestran en el CUADRO 15. No se encontraron cepas resistentes a esa concentración de penicilina. Únicamente 24 cepas (1,1%) lo fueron a 0,1 µg./ml. de ampicilina y 83 (3,7%) lo fueron a esta misma concentración de rifampicina.

El estudio de 481 cepas aisladas de portadores nos indica cifras similares en cuanto a penicilina (ausencia de resistentes) y ampicilina (1,4%). Sin embargo aparece un número mayor de cepas resistentes a 0,1 µg./ml. de rifampicina (6,6%)(CUADRO 16).

7.2.- CMIs de cepas sensibles a 0,1 µg./ml. de penicilina ampicilina y rifampicina.

Con objeto de conocer las CMIs de estos tres antibióticos frente a cepas sensibles en el estudio anterior. Se estudiaron 434 cepas de los cuatro años del estudio y representativas de los diferentes serogrupos, frente a 5 concentraciones por debajo de la antes probada (CUADRO 17).

Las CMIs de penicilina poseen una media geométrica de 0,019 µg./ml. siendo algo superior en ampicilina (0,027) y en rifampicina (0,035). En la GRAFICA 10 se expresan los porcen-

tajes acumulados y las CMI_{50} y CMI_{90} de estos antibióticos, frente a las cepas ya mencionadas.

7.2.1. CMIs y serogrupos de enfermos.

No se han encontrado diferencias significativas entre los diferentes serogrupos, con respecto a penicilina y ampicilina. En el caso de la rifampicina, el serogrupo A presenta claras diferencias respecto al B y C, ya que la media geométrica se duplica con respecto a los otros serogrupos (CUADRO 17). Las CMIs 50 y 90 de este serogrupo son respectivamente 0,062 $\mu\text{g./ml.}$ y 0,092 $\mu\text{g./ml.}$, como puede apreciarse esta última se acerca notablemente a la concentración máxima probada y que constituye la concentración de separación entre cepas resistentes y sensibles.

7.3.- CMIs de cepas resistentes a 0,1 $\mu\text{g./ml.}$ de ampicilina y rifampicina, aisladas de enfermos y portadores.

Las cepas resistentes a 0,1 $\mu\text{g./ml.}$ de ampicilina y rifampicina, fueron estudiadas para averiguar su CMI y los resultados obtenidos se muestran en el CUADRO 18.

Las 24 cepas resistentes a ampicilina, poseen una media geométrica de 0,24 $\mu\text{g./ml.}$ y el 100% de las cepas se inhiben con una concentración de 0,4 $\mu\text{g./ml.}$

Las 83 cepas resistentes a rifampicina poseen una media geométrica mayor, de 0,65 $\mu\text{g./ml.}$ y el 90% de las cepas se inhibe con una concentración de 1,6 $\mu\text{g./ml.}$

En el CUADRO 19 se expresan las CMIs de las cepas resistentes a 0,1 µg./ml. de ampicilina y rifampicina, aisladas de portadores. Las medias geométricas son similares a las encontradas en enfermos.

7.3.1.- CMIs de las cepas resistentes y serogrupos.

La distribución de las CMIs de las cepas resistentes de enfermos y portadores dentro de los diferentes serogrupos también se expresan en los CUADROS 18 y 19.

No se encuentran cepas resistentes a ampicilina en las aisladas de enfermos dentro del serogrupo A, siendo muy similares los porcentajes de resistentes dentro de los grupos B y C.

Con respecto a la rifampicina, las cepas resistentes engloban un 15%. En el grupo B solo alcanzan un 2,4% y dentro del grupo C no se encontraron cepas resistentes.

En las cepas aisladas de portadores se puede destacar el 11% de cepas del grupo C resistentes a ampicilina, y el elevado porcentaje de cepas del serogrupo A resistentes a la concentración ya mencionada de rifampicina (26%). Las cepas no grupables, alcanzan frente a ampicilina y rifampicina porcentajes de resistencia de 7% y el 9% respectivamente.

CUADRO 15.- RESISTENCIAS A 0,1 µg/ml. DE PENICILINA, AMPICILINA Y RIFAMPICINA DE LAS CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS (1.978-1.981).

AÑOS	PENICILINA:		AMPICILINA:		RIFAMPICINA:	
	≤ 0,1	> 0,1	≤ 0,1	> 0,1	≤ 0,1	> 0,1
1.978	369	-	366	3 (0,8)	348	21 (5,7)
1.979	861	-	854	7 (0,8)	826	35 (4,1)
1.980	603	-	596	7 (1,2)	595	8 (1,3)
1.981	390	-	383	7 (1,8)	371	19 (4,9)
TOTALES	2.223	-	2.199	24 (1,1)	2.140	83 (3,7)

CUADRO 16.- RESISTENCIAS A 0,1 µg/ml. DE PENICILINA, AMPICILINA Y RIFAMPICINA DE CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE PORTADORES.

AÑOS	PENICILINA		AMPICILINA		RIFAMPICINA	
	≤ 0,1	> 0,1	≤ 0,1	> 0,1	≤ 0,1	> 0,1
1.978	121	-	120	1 (0,8)	111	10 (8,25)
1.979	198	-	198	-	188	10 (5,05)
1.980	61	-	60	1 (1,6)	59	2 (3,3)
1.981	101	-	96	5 (4,9)	91	10 (9,9)
TOTALES	481	-	474	7 (1,45)	449	32 (6,65)

124

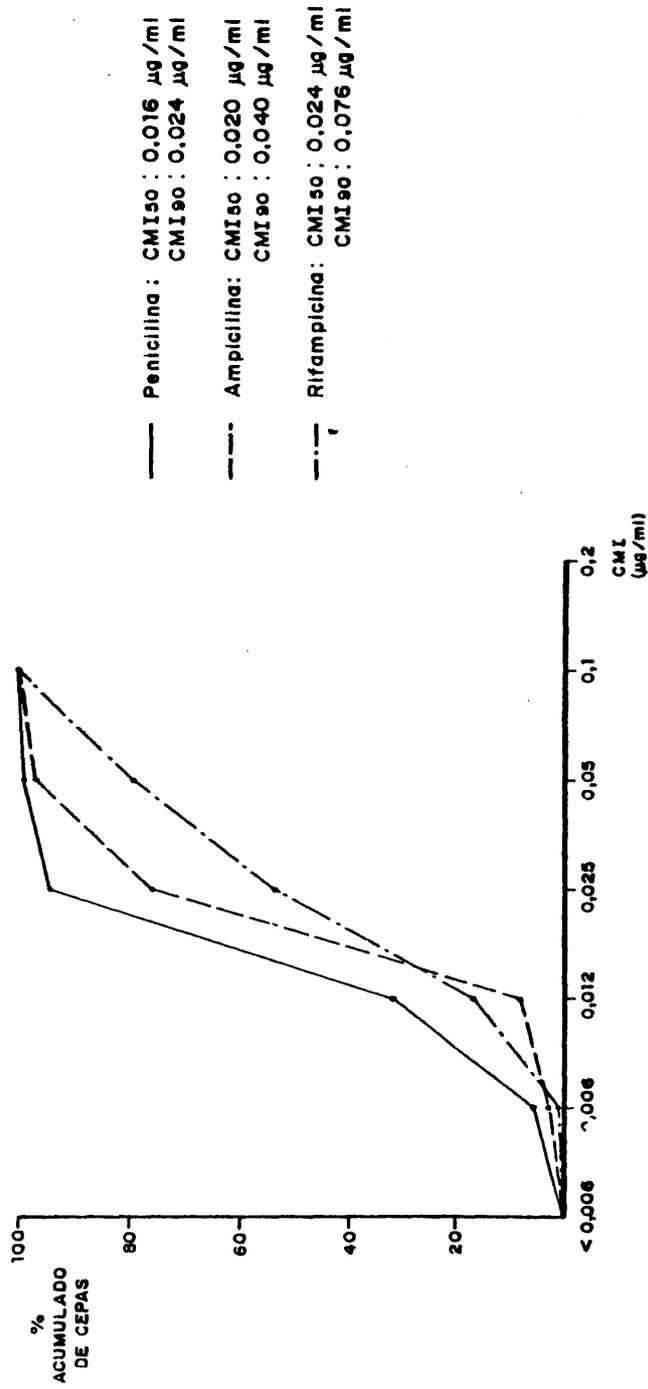
CUADRO 17.- CMIs DE CEPAS SENSIBLES A 0,1 µg/ml. PENICILINA, AMPICILINA Y RIFAMPICINA, EN RELACION CON EL SEROGRUPO DE LAS CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS (1.978-1.981).

ANTIBIOTICO	SEROGRUPO	Nº CEPAS	CMI (µg/ml)						M
			≤ 0,00625	0,0125	0,025	0,05	0,1	(µg/ml)	
Penicilina	A	48	4	15	29	-	-	0,0179	
	B	289	19	69	185	14	2	0,0202	
	C	88	1	26	53	6	2	0,0217	
	Y	1	-	1	-	-	-	-	
	NG	8	-	6	2	-	-	-	
Total	434	24	116	270	20	4	0,0193		
Ampicilina	A	48	-	3	22	23	-	0,0334	
	B	289	13	17	208	47	4	0,0257	
	C	88	-	2	61	20	5	0,0311	
	Y	1	-	-	-	1	-	-	
	NG	8	-	1	5	2	-	-	
Total	434	13	23	296	93	9	0,0276		
Rifampicina	A	48	1	2	1	12	32	0,0707	
	B	289	3	48	114	75	49	0,0333	
	C	88	1	11	48	19	9	0,0302	
	Y	1	-	1	-	-	-	-	
	NG	8	-	2	5	7	1	-	
Total	434	5	63	169	106	91	0,0353		

GRAFICA 10

PORCENTAJE ACUMULADO DE CMIs, CMIs 50 Y CMIs 90 DE 434 CEPAS DE MENINGOCOCO SENSIBLES A 0,1 µg/ml DE PENICILINA, AMPICILINA Y RIFAMPICINA

423



CUADRO 18.- CMI's DE LAS CEPAS RESISTENTES A 0,1 µg/ml. DE AMPICILINA Y RIFAMPICINA, AISLADAS DE ENFERMOS Y SU RELACION CON LOS SEROGRUPOS.

ANTIBIOTICO	Nº							TOTAL	
	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4		
Ampicilina	1	15	8	-	-	-	-	0,24	24
Rifampicina	-	8	31	28	10	4	2	0,65	83

124

AMPICILINA	RIFAMPICINA	
	nº cepas	%
GRUPO A	-	-
GRUPO B	22	(1,2)
GRUPO C	2	(2,3)
	<u>nº cepas</u>	<u>%</u>
	37	(15,0) ^b
	46	(2,4)
	-	-

a Media geométrica.

b Porcentaje de resistentes dentro de su serogrupo.

CUADRO 19.- CMIs DE LAS CEPAS RESISTENTES A 0,1 µg/ml. DE AMPICILINA Y RIFAMPICINA, PROCEDENTES DE PORTADORES Y SU RELACION CON EL SEROGRUPO.

ANTIBIOTICOS	SEROGRUPOS	NACEPAS	CMIs en ug/ ml.			M	% ^a
			0,2	0,4	0,8		
Ampicilina	A	2	2	-	-	-	4,3
	B	-	-	-	-	-	-
	C	2	1	-	-	-	11,1
	NG	3	-	2	1	-	7,0
	Total	7	3	3	1	-	0,33
Rifampicina	A	12	-	8	1	2	26,0
	B	14	4	6	4	-	4,95
	C	1	-	-	-	1	5,55
	29E	1	-	1	-	-	4,35
	NG	4	-	1	-	2	9,3
	Total	32	4	16	5	4	3

125

a Porcentaje de cepas resistentes dentro de su sero-grupo:

7.4.- CMIs de cepas aisladas de enfermos frente a otros antibióticos.

Con objeto de completar la visión de resistencias de las cepas de meningococo, se han ampliado los estudios a otro antibiótico utilizado en la terapia de la meningitis meningocócica (cloranfenicol) y a otros dos antibióticos empleados en quimioprolifaxis (minociclina y espiramicina).

7.4.1.- Cloranfenicol.

Los resultados del estudio de las CMIs de cloranfenicol de 434 cepas aisladas de enfermos se muestra en el CUADRO 20 y la GRAFICA 11. La media geométrica de CMIs es de 0,51 $\mu\text{g./ml.}$ no encontrando diferencias apreciables entre los diferentes serogrupos. Las CMI 50 y 90 son respectivamente 0,37 $\mu\text{g./ml.}$ y 0,70 $\mu\text{g./ml.}$

7.4.2.- Minociclina.

Las CMIs de 300 cepas aisladas de enfermos, nos indican que la media geométrica de las mismas es de 1,15 $\mu\text{g./ml.}$, tampoco se encontraron diferencias significativas entre los serogrupos. Las CMIs 50 y 90 son respectivamente 0,88 $\mu\text{g./ml.}$ y 1,46 $\mu\text{g./ml.}$ (GRAFICA 11).

7.4.3.- Espiramicina.

El estudio de las CMIs de 300 cepas de meningococo aisladas de enfermos frente a la espiramicina, se muestran también en el CUADRO 20 y la GRAFICA 11.

127.

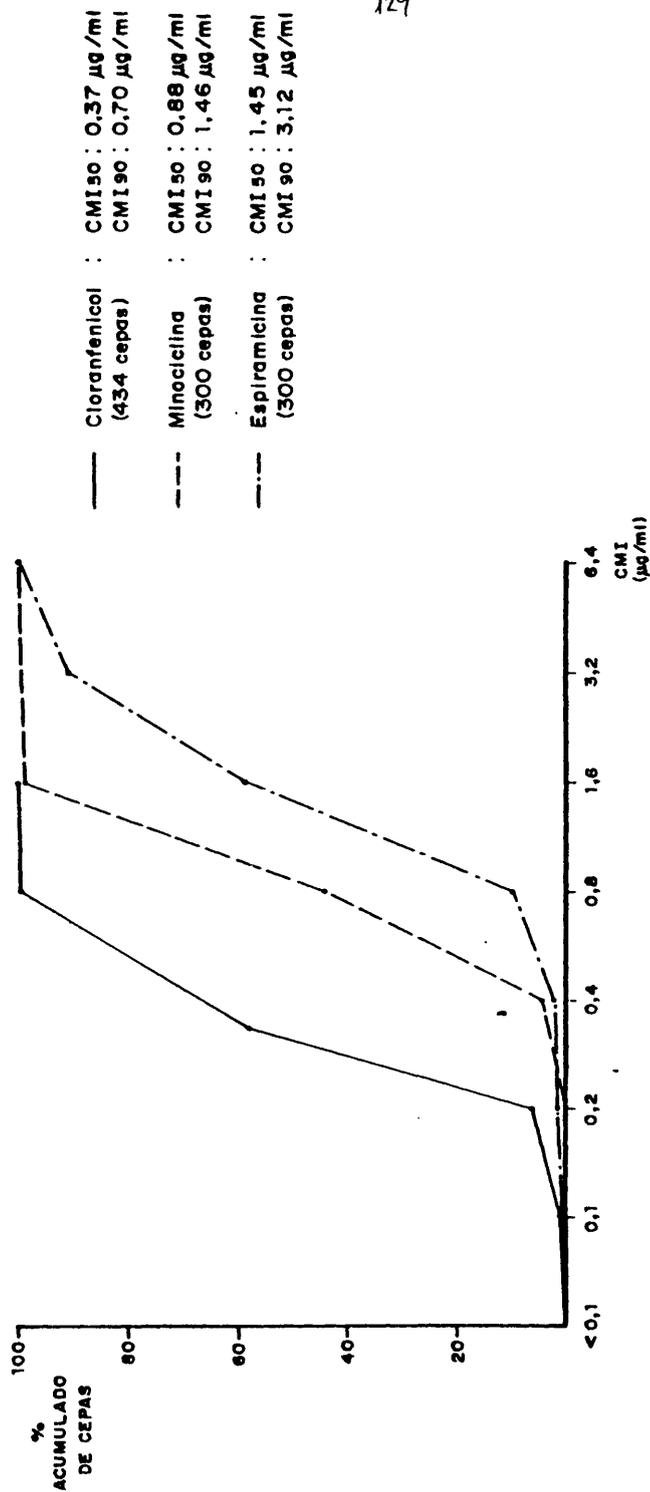
En cuanto a los serogrupos, las cepas de serogrupo A tienen una media geométrica que duplica a las de los grupos B y C. Las CMI_{50} y CMI_{90} son respectivamente de 1,4 $\mu\text{g./ml.}$ y 3,2 $\mu\text{g./ml.}$ (GRAFICA 11).

CUADRO 20.- CMIs DE CLORANFENICOL, MINOCICLINA Y ESPIRAMICINA DE CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS Y RELACION CON EL SEROGRUPO.

Antibióticos	Serogrupo	Nº Cepas	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/ml)						M	
			0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2		6,4
Cloranfenicol	A	48	2	1	12	31	2	-	-	0,62
	B	289	-	24	185	80	-	-	-	0,46
	C	88	-	-	21	67	-	-	-	0,68
	Y	1	-	-	-	1	-	-	-	-
	NG	8	-	-	8	-	-	-	-	-
Total		434	2	25	226	179	2	-	-	0,51
Minociclina	A	35	-	-	1	15	19	-	-	1,14
	B	188	-	-	11	89	86	-	2	1,08
	C	68	-	-	-	12	56	-	-	1,42
	Y	1	-	-	-	-	1	-	-	-
	NG	8	-	-	-	5	3	-	-	-
Total		300	-	-	12	121	165	-	2	1,15
Espiramicina	A	35	1	-	-	-	5	8	21	4,25
	B	188	1	2	2	19	110	50	4	1,76
	C	68	-	-	-	-	28	40	-	2,41
	Y	1	-	-	-	-	1	-	-	-
	NG	8	-	-	-	5	3	-	-	-
Total		300	2	2	2	24	147	98	25	2,04

GRAFICA 11

PORCENTAJES ACUMULADOS, CMI's 50 Y CMI's 90 DE CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS FRENTA A CLORANFENICOL, MINOCICLINA Y ESPIRAMICINA



8.- CEPAS ATIPICAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTA-
DORES, DURANTE LA ONDA EPIDEMICA ACTUAL.

Durante los 4 años del estudio se investigó la utilización de azúcares de 2.223 cepas aisladas de enfermos y 481 cepas aisladas de portadores.

En las cepas de enfermos se aislaron 80 cepas (3,6%) que no produjeron ácidos con maltosa y en portadores 12 cepas (2,5%) fueron igualmente maltosa negativas (CUADRO 21).

No se encontraron diferencias significativas durante los 4 años del estudio, en los porcentajes de cepas atípicas en las cepas de enfermos. Sin embargo en portadores no se aislaron cepas con esta deficiencia en los dos últimos años.

8.1.- Serogrupos y serotipos de las variantes maltosa
negativas.

Todas las cepas maltosa negativas, tanto de enfermos como de portadores pertenecen al serogrupo B, representando en ambos casos un porcentaje dentro de su serogrupo, muy similar (4,3% y 4,25%).

La distribución de los serotipos encontrados se expone en el CUADRO 22.

En enfermos, las cepas tipo 2 representan un elevado porcentaje 70%, seguidas de las no tipables (17,5%) y las de los serotipos 1,8,15 que representan un 12,5%.

En portadores, únicamente se aislaron cepas maltosa negativas del tipo 2 (66,6%) y cepas no tipables (33,3%).

8.2.- CMIs de sulfadiazina.

El CUADRO 23 muestra las CMIs de sulfadiazina de las variantes maltosa negativas y su comparación con las de cepas maltosa positivas.

Como se puede observar, tanto en enfermos como en portadores, no se aíslan cepas con CMIs inferiores a 10 µg./ml.

En la población de cepas maltosa positivas, se puede observar un pequeño porcentaje de cepas con CMI inferior a 10 µg./ml. (5,55%). En portadores el porcentaje de cepas por debajo de esa concentración es mayor (27,8%).

CUADRO 21.- CEPAS ATÍPICAS (VARIANTES MALTOSA NEGATIVAS) AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES DURANTE LA ÚLTIMA ONDA EPIDÉMICA DE INFECCIÓN MENINGOCÓCICA (1.978-1.981).

Origen	Año	Nº Cepas	Cepas maltosa negativas	% B ^a
Enfermos	1.978	369	12 (3,3) ^b	
	1.979	861	38 (4,4)	
	1.980	603	20 (3,3)	
	1.981	390	10 (2,6)	
	1.978-81	2.223	80 (3,6)	4,3
Portadores	1.978	121	6 (4,95)	
	1.979	198	6 (3,00)	
	1.980	61	-	
	1.981	101	-	
	1.978-81	481	12 (2,50)	4,25

a Todas las cepas atípicas pertenecen al serogrupo B.

b Porcentaje.

CUADRO 22.- SEROTIPOS ENCONTRADOS EN LAS CEPAS
 MALTOSA NEGATIVAS AISLADAS DE ENFERMOS
 Y PORTADORES.

433

<u>Serotipos</u>	<u>Enfermos</u>	<u>Portadores</u>
1	3 (3,75) ^a	-
2	56 (70,0)	8 (66,6)
8	5 (6,25)	-
15	2 (2,5)	-
NT ^b	14 (17,5)	4 (33,3)
TOTAL	80	12

a Porcentaje.
 b No tipables.

CUADRO 23.- CMI's DE SULFADIAZINA DE LAS CEPAS DE MENINGOCOCO MALTOSA NEGATIVAS AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES Y SU COMPARACIÓN CON LA DE LAS CEPAS TÍPICAS.

Origen	Cepas	Total	≤ 1	5	10	25	50	≥ 100 (µg/ml.)
Enfermos	Mal -	80	-	-	11(13,75)	40(50,0)	11(13,75)	18 (22,5)
	Mal +	2.143	44(2,05)	76(3,5)	236(11,0)	972(45,35)	602(28,1)	214 (10,0)
Portadores	Mal -	12	-	-	2 (16,7)	5 (41,6)	2 (16,7)	3 (25,0)
	Mal +	469	80(17,0)	74(15,8)	63 (13,4)	127 (27,1)	74 (15,8)	51 (10,9)

9.- ESTUDIO DE PREVALENCIA DE CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS Y DE SUS CONTACTOS FAMILIARES.

Con objeto, por una parte de evaluar la utilidad de los marcadores epidemiológicos basados en los antígenos del meningococo, para una mejor caracterización de las cepas y también para estudiar la prevalencia de cepas epidemiológicamente relacionadas, en contactos familiares, con las cepas productoras de un caso de infección meningocócica; se han estudiado 42 grupos familiares (42 enfermos y 135 contactos). Los enfermos ingresaron en el Hospital de San Juan de Dios de Barcelona, durante el periodo comprendido entre Enero de 1.980 y Julio de 1.981.

9.1.- Proporción de portadores dentro de los grupos familiares.

Como se ha expuesto, se han estudiado 42 grupos familiares. De los miembros familiares 27 (20,0%), poseían meningococos en nasofaringe y de estos, 14 (10,4%), llevaban una cepa similar a la del enfermo (se considera cepa similar ó epidemiológicamente relacionada, aquella que poseía su mismo serogrupo, serotipo y ó su mismo patrón electroforético (CUADRO 25).

De los grupos familiares, 20 (48%) contenían al menos un miembro portador, 17 de los cuales (40,5%) poseían portadores con cepas del mismo serogrupo que la del enfermo y de estos últimos, 13 (30,9%), también mostraban el mismo serotipo que la cepa causante del caso (CUADRO 24).

Podemos observar, que el padre aparece como único portador de la cepa similar a la del enfermo en el 14,3% de los casos (6 familias), seguido de la madre (9,5%) (4 familias). En tercer lugar se hallan los hermanos con un 4,8% y dos familias en un caso se encontraron las cepas similares a las del enfermo tanto en el padre como en la madre.

En otros familiares, tanto niños como adultos no se encontraron cepas similares a la del enfermo, aunque sí cepas del mismo serogrupo.

En el CUADRO 26 se puede observar que aparece una pequeña proporción de portadores de otros serogrupos en varias familias. En el mismo CUADRO, se detallan las características de las cepas de los enfermos y sus contactos de los 20 grupos familiares con portadores de meningococos, así como la CMI de sulfadiazina de todas las cepas.

9.2.- Serogrupos y serotipos de las cepas aisladas de enfermos y de sus contactos.

Los meningococos aisladas de LCR ó sangre de enfermos con infección meningocócica se agrupan dentro del serogrupo B (92,8%) y del C (4,8%). Una cepa aislada de enfermo que fué autoaglutinable se la consideró similar a la de un contacto de su familia, ya que poseía el resto de los marcadores epidemiológicos idénticos (Familia 9).

También se pudieron estudiar 20 cepas aisladas de nasofaringe de los enfermos, en todos los casos, dichas cepas presentaron características semejantes a las que poseía la cepa aislada de LCR ó sangre (CUADRO 27).

En este CUADRO también se muestran los serogrupos encontrados en contactos. La distribución es semejante a la de los enfermos, con una mayoría de cepas del grupo B (81,8%), 4 cepas del grupo Y (encontradas en una misma familia) y una cepa A. También se aislaron 2 cepas de N. lactamica en dos niños (Familias 18 y 20).

Entre los serotipos encontrados en enfermos destaca el serotipo 2 (45%) y las cepas no tipables (47,6%), el resto de las cepas pertenecieron a los serotipos 1,8,15 (7%). En portadores aparece algún otro serotipo.

En las cepas no tipables, se estudió el patrón electroforético en gel de poliacrilamida y se encontraron un 50% de cepas de los patrones I y II y un 40,5% del patrón IV. Esta distribución de patrones se mantiene en portadores.

9.3.- CMIs de sulfadiazina.

En el CUADRO 28 se expresan las CMIs de sulfadiazina de las cepas de enfermos y sus contactos.

Destaca, como cabría esperar la elevada proporción de cepas resistentes (80,9%), similar a la encontrada en el resto del país. Esta proporción se reduce en portadores (69%).

CUADRO 24.- PORTADORES DE MENINGOCOCO DENTRO DE GRUPOS FAMILIARES DE ENFERMOS CON INFECCION MENINGOCOCICA.

<u>Grupos familiares</u> ^a	<u>Totales</u>	<u>%</u>
Nº Estudiado	42	100
Con portadores de meningococo	20	47,6
Con portadores de meningococo del mismo serogrupo que la del enfermo	17	40,5
Con portadores con cepas epidemiológicamente relacionadas con la del enfermo ^b	13	30,9
En los que el padre es el único portador de la cepa e.r. del enfermo	6	14,3
En los que la madre es el único portador de la cepa e.r. con la del enfermo	4	9,5
En los que el padre y la madre son portadores de la cepa epidemiológicamente relacionada con la del enfermo	1	2,4
En los que otro miembro de la familia es portador de la cepa e.r. con la del enfermo	2	4,8

a Cada grupo familiar consiste en el enfermo y sus contactos habituales.

b Se consideran cepas epidemiológicamente relacionadas (e.r), las que poseen el mismo serogrupo y serotipo.

CUADRO 25.- DISTRIBUCION DE LAS CEPAS DE CONTACTOS FAMILIARES, DE ACUERDO CON SU PARENTESCO Y SU IGUALDAD DE SEROTIPO Y SEROTIPO CON LA CEPA DEL ENFERMO.

<u>PARENTESCO CON EL ENFERMO</u>	<u>NUMERO DE MUESTRAS</u>	<u>NUMERO DE PORTADORES</u>	<u>CEPAS DE CONTACTOS CON:</u>	
			<u>IGUAL SEROTIPO</u>	<u>IGUAL SEROTIPO</u>
Padres	38	9	9	7
Madres	38	8	6	5
Hermanos	35	5	4	2
Tios	10	4	1	-
Primos	8	1	1	-
Abuelos	3	-	-	-
Otros	3	-	-	-
Totales	135	27	21	14
%	100,0	20,0	15,6	10,4

CUADRO 26.- DISTRIBUCION EN LOS GRUPOS FAMILIARES DE LOS SEROGRUPOS, SEROTIPOS Y PATRONES ELECTROFORETICOS ADEMAS DE LAS MICR A SULFADIAZINA DE LAS CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS Y DE SUS CONTACTOS FAMILIARES.

Familia	Parentesco	Fuente	Grupo	Tipo	EGP ^a	CM ^b de Sulfa.
1	Enfermo	LCR	B	NT ^c	IV	25
	"	ENF	B	NT	IV	25
	Madre	ENF	B	2	II	5
	Padre	ENF	B	NT	IV	25
2	Enfermo	LCR	B	NT	IV	5
	Madre	ENF	B	NT	IV	5
3	Enfermo	Sangre	B	2	II	25
	"	ENF	B	2	II	25
	Tia	ENF	B	NT	IV	25
4	Enfermo	LCR	B	2	II	10
	"	ENF	B	2	II	10
	Padre	ENF	B	2	II	10
	Madre	ENF	B	2	II	10
	Hermana	ENF	B	NT	X	25
5	Enfermo	LCR	B	2	I	10
	"	ENF	B	2	I	10
	Madre	ENF	B	2	I	10
6	Enfermo	LCR	B	NT	IV	1
	"	ENF	B	NT	IV	1
	Padre	ENF	B	NT	IV	1
7	Enfermo	LCR	B	NT	IV	25
	Padre	ENF	B	1,8,15	IV	25
8	Enfermo	LCR	B	NT	IV	25
	Padre	ENF	B	8	IV	25
9	Enfermo	LCR	AA ^d	2	II	100
	Madre	ENF	B	2	II	100
10	Enfermo	Sangre	B	NT	IV	10
	Hermano	ENF	Y	2	II	100
	Tio	ENF	Y	2	II	100
	Tia	ENF	Y	2	II	100
	Tia	ENF	Y	2	II	100
11	Enfermo	Sangre	B	2	I	25
	Madre	ENF	B	NT	III	50
12	Enfermo	LCR	B	1	IV	25
	"	ENF	B	1	IV	25
	Padre	ENF	B	NT	IV	25
13	Enfermo	LCR	B	NT	IV	100
	"	ENF	B	NT	IV	100
	Padre	ENF	B	NT	IV	100
14	Enfermo	LCR	B	NT	II	25
	Padre	ENF	B	1,8	IV	10
15	Enfermo	LCR	B	NT	II	25
	Hermana	ENF	B	NT	II	50
	Primo	ENF	B	1,8	IV	5

CUADRO 26.- CONTINUACION.

111

Familia	Parentesco	Fuente	Grupo	Tipo	EGP ^a	CMI de sulfa. ^b
16	Enfermo	LCR	B	2	II	50
	Hermano	ENF	B	6	III	25
17	Enfermo	LCR	B	2	II	50
	Madre	ENF	A	-	-	100
18	Enfermo	LCR	B	2	II	50
	Hermano	ENF	Neisseria lactamica			
19	Enfermo	LCR	B	2	II	25
	Hermana	ENF	B	2	II	25
20	Enfermo	LCR	B	2	II	25
	"	ENF	B	2	II	25
	Padre	ENF	B	NT	IV	1
	Madre	ENF	B	2	II	25
	Hermano	ENF	Neisseria lactamica			

a Electroforesis en gel de poliacrilamida.

b Concentración mínima inhibitoria de sulfadiazina.

c No tipable.

d Autoaglutinable.

LCR, líquido cefalorraquídeo.

ENF, exudado nasofaríngeo.

CUADRO 27.- DISTRIBUCION DE SEROGRUPOS, SEROTIPOS Y PATRONES ELECTROFORETICOS DE
89 CEPAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS Y SUS CONTACTOS.

FUENTE	CEPAS	SEROGRUPOS			SEROTIPOS				PATRON					
		A	B	C Y AA ^a	1	2	6	8	NT ^b	I, II	IV	OTROS		
LCR ó sangre de enfermos	42	-	39	2	-	1	2	19	-	1	20	21	17	4
ENF de enfermos	20	-	18	2	-	-	2	8	-	-	10	9	7	4
ENF de contactos	27	1	22	-	4	-	-	11	1	5 ^c	10	12	12	3

a Autoaglutinable.

b No tipable.

c Se incluyen 3 cepas 1,8; 1 cepa 8 y una cepa 1,8,15.

143

CUADRO 28.- CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA
DE SULFADIAZINA EN LAS CEPAS DE
ENFERMOS Y SUS CONTACTOS FAMILIARES.

Fuente	CMI en $\mu\text{g/ml}$.					
	≤ 1	5	10	25	50	≥ 100
LCR 6 sangre de enfermos	2	1	5	23	7	4
ENF de enfermos	2	-	2	11	3	2
ENF de contactos	2	3	4	9	4	7
Total	6	4	11	43	14	13

10.- ESTUDIO DE LOCALIZACION DE SEROTIPOS VIRULENTOS EN POBLACIONES INFANTILES.

10.1.- Distribución de N. lactamica y N. meningitidis. en portadores.

Con objeto de contribuir al conocimiento de la prevalencia de cepas de meningococo virulentas y de otros serogrupos, así como de N. lactamica, se ha elegido una población infantil (6-8 años) de 4 colegios de la población de Alcalá de Henares. En colaboración con los Servicios de Pediatría y Microbiología del Hospital Central de la Cruz Roja, se realizaron las tomas de nasofaringe, que fueron sembradas inmediatamente en placas de medio de Thayer Martin y enviadas al laboratorio para su estudio. En dicho estudio se realizaron 2.064 tomas, desde Julio de 1.979 a Junio de 1.982, con intervalos de 3 a 4 meses (CUADRO 29). Lo primero que se observa es la preponderancia de Neisseria lactamica en todas las tomas a excepción de Marzo de 1.982, en que se iguala con la proporción de meningococo (GRAFICA 12), esta preponderancia va de la mitad a la tercera parte de meningococos con respecto a N. lactamica.

En el estudio se aislaron 409 cepas (19,8%) de N. lactamica por 208 cepas (10,1%) de meningococo. No se puede apreciar una distribución estacional, en cuanto a los meningococos, como cabría esperar, ya que en teoría el porcentaje de portadores iría unido con la incidencia de casos.

10.2.- Serogrupos y serotipos aislados.

Dentro de los meningococos aislados nos encontramos con un claro predominio del serogrupo B (48%) y de las cepas no grupables (32%). También aparecen otros serogrupos en proporciones más reducidas (CUADRO 30).

En cuanto a los serotipos del grupo B, aparece con alta proporción el serotipo 2 (29%), algo menor es la de los serotipos 1,8,15 (21%), apareciendo un 36% de cepas no tipables. Otros serotipos representaron el 14% (CUADRO 30).

10.3.- CMIs de sulfadiazina y sensibilidad a antibióticos.

El CUADRO 31 recoge las CMIs de sulfadiazina de las 208 cepas de meningococo aisladas en la población infantil. Los resultados obtenidos, contrastan grandemente con los obtenidos en enfermos y portadores de la población general. Únicamente el 37% de las cepas fueron resistentes a la sulfadiazina y casi todas ellas pertenecientes al serotipo 2 (datos no recogidos en el cuadro)(CUADRO 31). Las moderadamente resistentes alcanzan el 53% y las sensibles un 9%.

Las resistencias a 0,1 µg./ml. de ampicilina (16,8%) y de rifampicina (24,5%) también difieren de forma significativa con respecto a los estudios ya citados en la población general.

10.4.- Reactividad cruzada de N. lactamica con sueros anti-meningocócicos.

Otra parte importante del estudio de portadores en

la población infantil de Alcalá de Henares, una vez conocida la alta prevalencia de N. lactamica en nasofaringe fué determinar la posible reactividad cruzada de estas cepas, ya observada por otros autores, con los sueros serogrupo-específicos de meningococo. Para ello se estudiaron 130 cepas de N. lactamica mediante aglutinación en porta (CUADRO 32). Unicamente 14 (10,8%) presentaron una aglutinación con el suero B. 13 cepas fueron no aglutinables y 103 (79,2%) fueron autoaglutinables, lo que hizo imposible su estudio por esta técnica. Entonces se utilizó la técnica de agar antisuero (ver material y métodos, apartado 4.3). Con este método se detectan antígenos difundidos en agar y por lo tanto se elimina el problema de la autoaglutinabilidad.

También el CUADRO 32, muestra los resultados encontrados con dicho método. El porcentaje de cepas que presentan alguna reactividad cruzada con los sueros antimeningocócicos se eleva al 90%. Siendo el suero del grupo C, el que produce reacciones cruzadas con un número mayor de cepas (51,5%) (67 cepas). Las cepas que producen halo con varios sueros representaron el 23% y las cepas sin reactividad cruzada detectable por este método engloba un 10,8%.

Los demás sueros que presentaron reactividad cruzada de forma individual fueron el del grupo 29E (8,5%) y el B (6,1%). Las cepas patrón de N. lactamica NCTC 10616, NCTC 10617 y NCTC 10618, resultaron no aglutinables y las dos últimas produjeron halo con el suero C y con el B respectivamente.

10.5.- Evaluación del método agar-suero como técnica de serogrupo directo de meningococos y detección de reactividad cruzada de N. lactamica.

Con objeto de evaluar la utilidad del método agar-antisuero para la detección directa del serogrupo de cepas aisladas de portadores se emplearon placas de agar antisuero a las que se les añadió la mezcla antibiótica inhibidora que se incluye en el medio de Thayer Martin (ver material y métodos).

En el CUADRO 33 se muestran los resultados obtenidos en 100 tomas efectuadas en una escuela de Majadahonda en Abril de 1.980 en niños de 6 a 8 años.

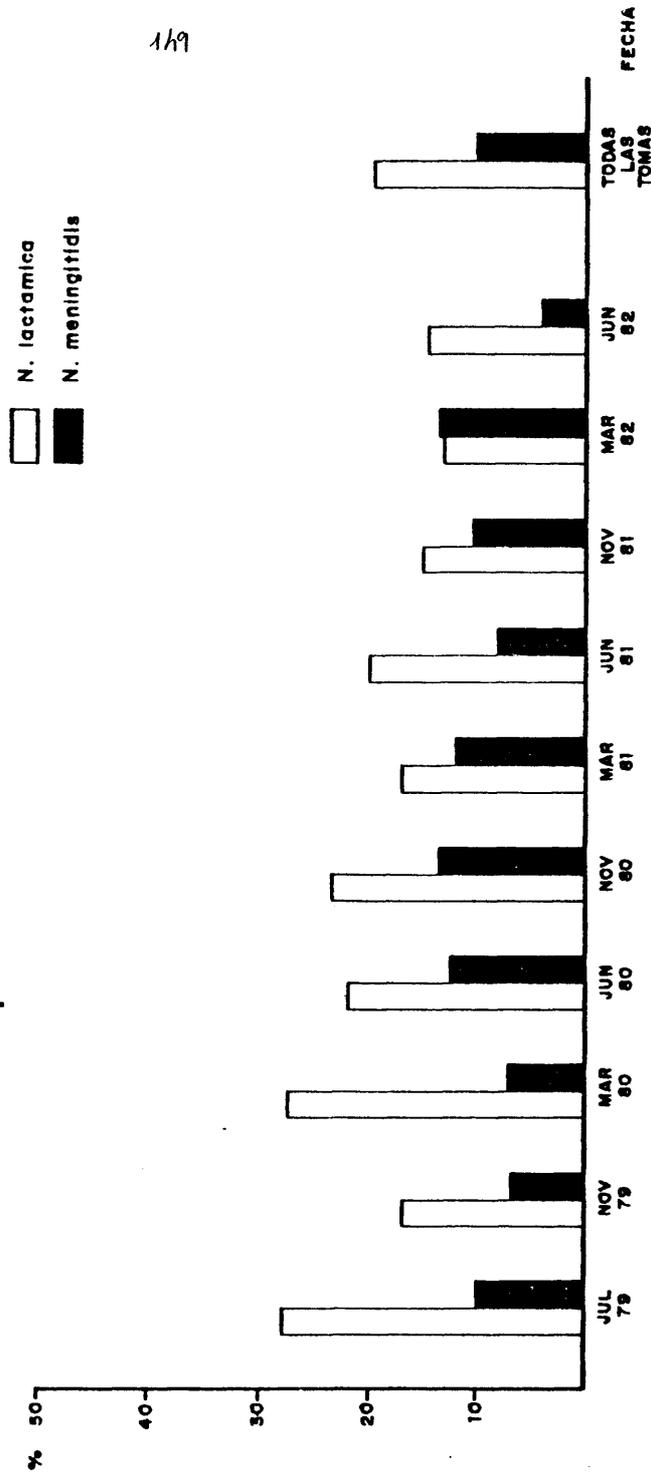
De los serogrupos aislados (11 cepas), 8 produjeron halo directo, en las placas de agar-antisuero-CNV. De las 6 cepas no aglutinables dos pudieron identificarse como del grupo C. De las 26 cepas de N. lactamica aisladas en este estudio 8(30%) poseían cierta reactividad cruzada con algún suero. Dicha reactividad cruzada se confirmó posteriormente por el método habitual aumentando el número de cepas con reactividad cruzada en 5 (datos no recogidos en el cuadro).

CUADRO 29.- DISTRIBUCION DE MENINGOCOCOS Y Neisseria
lactamica EN UNA POBLACION INFANTIL
(ESCUELAS DE ALCALA DE HENARES).

<u>Fecha de las tomas</u>	<u>N. lactamica</u>	<u>Meningococos</u>	<u>Tomas</u>
JULIO 1.979	56 (28,3)	19 (9,6)	198
NOVIEMBRE 1.979	42 (16,8)	17 (6,8)	250
MARZO 1.980	44 (27,5)	11 (6,9)	160
JUNIO 1.980	70 (22,0)	40 (12,6)	318
NOVIEMBRE 1.980	47 (23,5)	27 (13,5)	200
MARZO 1.981	32 (16,9)	23 (12,2)	189
JUNIO 1.981	40 (20,0)	16 (8,0)	200
NOVIEMBRE 1.981	27 (15,3)	18 (10,2)	176
MARZO 1.982	26 (13,0)	27 (13,5)	200
JUNIO 1.982	25 (14,5)	10 (3,7)	173
TOTALES	409 (19,8)	208 (10,1)	2.064

GRAFICA 12

DISTRIBUCION DE N. lactamica Y N. meningitidis
EN PORTADORES DURANTE EL PERIODO
JULIO - 79 , JUNIO - 82



CUADRO 30.- SEROGRUPOS Y SEROTIPOS DEL GRUPO B
ENCONTRADOS EN NIÑOS PORTADORES DE
LAS ESCUELAS DE ALCALA DE HENARES.

<u>Serogrupos</u>	<u>nº cepas</u>	<u>%</u>
A	10	4,8
B	100	48,0
C	7	3,4
X	1	0,5
Y	10	4,8
Z	1	0,5
29E	10	4,8
W135	1	0,5
Autoaglutinables	51	24,5
No aglutinables	17	8,2
Total	208	

Serotipos del grupo B:

<u>1</u>	<u>2</u>	<u>8</u>	<u>15</u>	<u>Otros^a</u>	<u>NT^b</u>
9	29	11	1	14	36
(9,0)	(29,0)	(11,0)	(1,0)	(14,0)	(36,0)

a Se incluyen cepas de los tipos 5, 6, 11 y 12.

b No tipables.

CUADRO 31.- SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS MENINGOCOCOS AISLADOS
EN UNA POBLACION INFANTIL (ALCALA DE HENARES).

<u>No CEPAS</u>	CMI de SULFADIAZINA (µg/ml)					Resistentes a 0,1 µg/ml de:		
	≤1	5	10	25	50	≥100	Ampicilina	Rifampicina
208	19	79	32	48	23	7	35	51
%	9,1	53,4		37,5			16,8	24,5

CUADRO 32.- REACTIVIDAD CRUZADA DE CEPAS DE NEISSERIA
LACTAMICA CON SUEROS ANTIMENINGOCOCICOS.

Cepas con aglutinación	Cepas	Cepas productoras de halo (ASA) ^a				
		B	C	29E	HM ^b	Sin halo
B	14 (10,8)	5	-	-	2	7
AA ^c	103 (79,2)	3	60	10	10	20
NG ^d	13 (10,0)	-	7	1	2	3
TOTALES	130 (100)	8	67	11	14	30
%		(6,1)	(51,5)	(8,5)	(23,1)	(10,8)

a Técnica de agar-suero.

b Halos multiples.

c Autoaglutinable.

d No grupable.

CUADRO 33.- EVALUACION DEL METODO ASA (AGAR-SUERO) PARA EL SEROGRUPADO DE MENINGOCOCOS AISLADOS DE PORTADORES Y DETECCION DE REACTIVIDAD CRUZADA CON NEISSERIA LACTAMICA.

Escuela de Majadahonda (100 Tomas)

<u>Meningococos</u> : 18 cepas	<u>Serogrupos</u>	<u>Halo directo</u>
	B 8	5
	C 1	1
	29E 1	1
	Z 1	1
	AA 6	2 (C)
	NA 1	-

<u>N. lactamica</u> : 26 cepas	<u>Halo directo en ASA</u>
	B 1
	W 1
	B+W 2
	E+B+W 1
	B+E 1
	29E 2
	Sin halo 14

11.- ESTUDIO DE UN BROTE DE INFECCION MENINGOCOCICA.

Como ejemplo de aplicación de los marcadores epidemiológicos en el control de brotes de infección meningocócica, hemos estudiado un brote especialmente dramático, debido a su número de casos en una población reducida (guardería), muy próximos en el tiempo y el desenlace fatal de algunos de ellos.

Las características de la guardería "La Inmaculada" de Logroño, donde tuvo lugar el brote, son similares a las habituales en estos establecimientos. En la fecha del brote albergaba a 190 niños comprendidos entre los 3 meses y los 5 años, distribuidos en varias aulas. Casi todos los niños eran hijos del personal sanitario de la Residencia Sanitaria de la Seguridad Social muy próxima a la guardería.

El cuidado de los niños estaba a cargo de una congregación de religiosas (16 hermanas entre 22 y 30 años).

11.1.- Cronología del brote.

El brote comenzó en Noviembre de 1.981, con la aparición de 6 casos de meningitis, en un intervalo de 3 días y con un fallecimiento por sepsis meningocócica.

De los casos antes citados solo se pudo aislar una cepa, la cual fué estudiada en el laboratorio.

En ese mismo mes se produjo un caso en un niño de 12 años no asistente a la guardería, pero que tenía una hermana en la misma y además se comprobó que era portadora de la cepa causante del caso, por lo que éste se consideró como asociado al brote.

En ese mismo mes se realizó un primer estudio de portadores (222 tomas) y se realizó quimioprofilaxis masiva durante 4 días.

A finales de Diciembre de 1.981, se presenta un nuevo caso y otro en Enero de 1.982, del cual se pudo aislar y estudiar la cepa.

A raíz de este nuevo caso se realizó un nuevo estudio de portadores (219 tomas). Durante el estudio se produjeron dos nuevos casos con ~~un~~ fallecimiento.

Se realizó una nueva quimioprofilaxis, esta vez, solo en los portadores de la cepa virulenta (ver mas adelante) así como la vacunación de los niños con polisacárido C).

Hasta la actualidad no han aparecido nuevos casos.

Simultaneamente al segundo estudio de portadores se realizó un estudio similar en una guerderia con características semejantes a las de la del brote (CUADRO 34).

11.2.- Marcadores epidemiológicos de las cepas aisladas de enfermos y portadores.

En el CUADRO 35 se exponen los marcadores epidemiológicos de las cepas aisladas de enfermos y portadores. Todas las cepas aisladas de enfermos pertenecieron al serogrupo C serotipo 2, patrón electroforético II y tenían una CMI de sulfadiazina de 50 µg./ml., además eran sensibles a 0,1 µg./ml. de penicilina, ampicilina y rifampicina (C2II 50 SSS).

En los contactos de la guardería (hermana) y madre del caso asociado del niño de 12 años, se aisló la misma cepa, con la particularidad de que la aislada de la madre era resistente a la rifampicina (6,4 µg./ml.).

En los estudios de portadores de Noviembre de 1.981 y Febrero de 1.982, se obtuvieron los mismos porcentajes de portadores de meningococo, alrededor del 8%, pero la proporción de cepas relacionadas con el brote se duplicó en el segundo estudio (2,25% y 4,1%).

En el primer muestreo destaca, la aparición de dos cepas con CMI's de 6,4 µg./ml. que previamente a la quimioprofilaxis eran sensibles a 0,1 µg./ml., las dos cepas eran del grupo C tipo 2, cepas productoras de los casos. También es notable la ausencia del serogrupo B en los portadores, serogrupo cláramente predominante en enfermos y en la mayoría de las encuestas de portadores realizadas en nuestro país.

11.3.- Estudio de portadores en una guardería similar a la del brote, libre de casos de infección meningocócica.

En un estudio realizado, en la guardería Santa Justa de iguales características a la que sufrió el brote, se encontraron cepas de meningococo en portadores en una proporción similar a la encontrada en otra guardería (11%). Sin embargo, no se encontró la cepa virulenta productora de los casos, aunque si aparecieron algunas cepas del serogrupo C. Como dato interesante se puede señalar, la sensibilidad de las cepas a menos de 10 µg./ml. sulfadiazina y el porcentaje alto de resistencia a la rifampicina. (CUADRO 36).

CUADRO 34.- CARACTERISTICAS DE UN BROTE DE
INFECCION MENINGOCOCICA EN LA
GUARDERIA "LA INMACULADA" (RIOJA).

Noviembre 1.981

4 casos en la misma clase + 2 casos en otra.
Los casos se produjeron con un intervalo de 3 dias.
1 Fallecimiento
1 Cepa aislada y estudiada.

1 caso asociado de un hermano de una niña portadora
asistente a la guarderia. Posteriormente la misma
cepa se aisla de la madre.

Se realiza el 1º estudio de portadores (222 tomas)
Quimioprofilaxis con rifampicina (4 dias).

Diciembre 1.981

1 caso

Enero 1.982

1 nuevo caso con cepa aislada y estudiada.

Febrero 1.982

Nuevo estudio de portadores (219 tomas).
Durante el estudio se producen 2 casos con 1 fallecimiento.
Quimioprofilaxis en los portadores de la cepa virulenta.
Vacunacion con polisacárido C.

Marzo 1.982

Estudio de portadores en una guarderia de semejantes
caracteristicas.

CUADRO 35.- CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES EN LA GUARDERIA "LA INMACULADA" (LOGROÑO).

Enfermos Marcadores epidemiológicos

Caso Nov. 1.981 C 2 II 50 S S S
 Caso asociado 1.981 C 2 II 50 S S S
 Contactos del caso anterior: Hermana C 2 II 50 S S S
 Madre C 2 II 50 S S R
 Caso Enero 1.982 C 2 II 50 S S S

1º Estudio de portadores (Noviembre 1.981)

222 Tomas (portadores de meningococo: 18 (8,1%)).

Cepas

no

C 2 II 50 S S S 5 (2,25%)

Otros serogrupos 7 (Se incluyen 1 Y, 1 29E y 5 no grupables).

2º Estudio de portadores

219 Tomas (portadores de meningococo: 19 (8,7%)).

Cepas

no

C 2 II 50 S S S 9 (4,1%)

Otros serogrupos 10 (Se incluyen 1 B, 2 Y, 1 A y 6 no grupables).

CUADRO 36.- ESTUDIO DE PORTADORES EN LA GUARDERIA SANTA JUSTA
Logroño - Marzo 1.982.

150 Tomas Portadores de meningococo: 17 (11,3%)

<u>Serogrupo</u>	<u>nº cepas</u>	
C	2	Ambas no tipables
W135	1	
AA	8	
NA	6	

Todas las cepas fueron sensibles a las sulfamidas y resistentes a 0,1 µg./ml. de rifampicina.

J.

D I S C U S S I O N
=====

Como se ha mencionado en la introducción, nos encontramos en la mayor onda epidémica de infección meningocócica que se ha registrado en nuestro país.

A partir de 1.977, se ha ido incrementando el número de casos, alcanzando el acmé de la onda en 1.979 y descendiendo en los dos años posteriores.

En los 4 años en los que se ha desarrollado este estudio se contabilizaron 21.086 casos. Como es sabido el conocimiento epidemiológico es indispensable para decidir las medidas de control a utilizar en una situación altamente epidémica de infección meningocócica ó de cualquier otra enfermedad infecciosa. Toda la información, que incluiría datos de morbilidad, mortalidad, letalidad y otros, debe ir unida incuestionablemente a los datos que el laboratorio puede aportar. sobre el agente causal, los cuales se basan fundamentalmente en los marcadores epidemiológicos, indicadores de virulencia y susceptibilidad a antimicrobianos de dicho agente causal.

Todos estos datos proporcionan, la información necesaria para poder abordar el control de la infección meningocócica con más éxito, contando con las armas de que se dispone en la actualidad (quimioprofilaxis, vacunas polisacáridas, modificación de los factores de virulencia).

En la presente tesis se ha pretendido caracterizar, desde el punto de vista del agente causal, la onda epidémica actual y proporcionar la información adecuada, para un más efectivo control de la enfermedad meningocócica en nuestro país.

Así mismo se han realizado estudios, utilizando los marcadores epidemiológicos, con objeto de aportar algún conocimiento a la dinámica de transmisión de las cepas de meningococo, dentro de poblaciones sanas y de otras en contacto con enfermos.

1.- CARACTERISTICAS DE LA ONDA EPIDEMICA ACTUAL, RELACION CON EL AGENTE CAUSAL.

La onda epidémica actual (1.978-1.981), presenta los rasgos descritos como propios de la meningitis meningocócica, en cuanto a su presentación estacional en nuestras latitudes, con un máximo invierno-primavera, distribución desigual de los casos en el espacio y su acumulación en menores de 10 años (SERRE-BOISSEAU, 1.973).

Atendiendo a los casos confirmados (a los cuales nos vamos a referir a lo largo de esta discusión), observamos una distribución etaria, ya mencionada. En el CUADRO 1 y las GRAFICAS 3 y 4 se plasma la distribución por grupos de edad de 1.211 casos confirmados bacteriológicamente. Se puede apreciar que el 50% de los mismos se producen en menores de 5 años, alcanzando los menores de 14 años, el 80%. En cuanto a la importancia de los grupos de edad, se aprecia que, entre 1 y 4 años se alcanza el mayor porcentaje de casos para ir descendiendo paulatinamente hacia edades superiores (GRAFICA 4).

La representatividad de los datos obtenidos con los casos confirmados se puede apreciar si se comparan las gráficas obtenidas con los casos acumulados en los grupos de edad confir-

mados bacteriológicamente y en los casos declarados, observando que ambas gráficas son similares (SAEZ-NIETO y cols., 1.981). Con respecto a la onda anterior, no parece haber variación en cuanto a la distribución etaria, a juzgar por los datos disponibles (FIGUEROA y cols., 1.976).

La acumulación de casos (50%) en los menores de 5 años se observa igualmente en otros países de nuestra área, aun en distintas situaciones epidémicas (W.H.O. Wly. Epic. Rec. nº 48 (1.977), nº 29 (1.980) y nº 35 (1.978)).

Esta acumulación es algo inferior en la distribución observada en la epidemia de Noruega (33%) en menores de 5 años, dándose una afectación especial en jóvenes de ambos sexos, entre los 15 y los 19 años, que no se registra en nuestro medio (BØVRE y GEDDE-DAHL, 1.980).

En cuanto a la distribución por sexos de los casos confirmados bacteriológicamente (1.790 casos)(CUADRO 2, GRAFICA 5), se observa un ligero predominio de los varones en el conjunto de los casos, con la distribución desplazada hacia los varones sobre todo en niños menores de 5 años y jóvenes, y hacia las mujeres en las edades superiores.

Una distribución semejante se ha descrito en Francia en 1.978 (W.H.O., W.E.R. nº 29 (1.980)). Las variaciones de distribución de sexos de la meningitis meningocócica es un hecho no suficientemente analizado. La mayor parte de los trabajos realizados en este sentido, tanto en enfermos como en portadores, indican una mayor incidencia de la enfermedad en el sexo masculino.

En un estudio reciente, realizado por MELTON y cols., en 1.977, se intentó corregir las diferencias en las condiciones epidemiológicas en los dos sexos, encontrándose una distribución similar de portadores entre ellos.

2.- DISTRIBUCION DE SEROGRUPOS AISLADOS DE ENFERMOS Y PORTADORES.

Los resultados obtenidos en las cepas aisladas de enfermos se muestran en el CUADRO 3 y su localización geográfica en el CUADRO 4.

El serogrupo B es cláramente predominante, alcanzando en todo el periodo un 84,5%, seguido del A (11,1%) y el C (4%). Aunque no se han apreciado diferencias notables en los porcentajes del serogrupo mayoritario, a lo largo de los cuatro años del estudio. En los otros grupos si se aprecia una cierta disminución del grupo A, que pasa de un 13,5% en 1.978 a un 3,8% en 1.981, en favor de un incremento paulatino del grupo C, que pasa de 1,4% en 1.978 hasta un 14% en 1.981. El incremento del grupo C continua en los primeros meses de 1.982, en que alcanza un 18% (datos sin publicar) y en este periodo, dicho incremento se produce no solo en detrimento del grupo A, que sigue descendiendo hasta un 1,6%, sino que también se manifiesta en un descenso del grupo B hasta un 74,5%. Toda esta variación de porcentajes va unida a un descenso notable del número de casos declarados en los primeros 6 meses de 1.982 en relación con los del año anterior (1.981), último de nuestro estudio.

El predominio del serogrupo B es un hecho constante y característico de la mayoría de los países europeos. Salvo la epidemia de Finlandia de 1.974, que fué debida al grupo A (MAKELA y cols., 1.977), el serogrupo B ha sido aislado como el serogrupo más frecuente en todos los periodos de máxima incidencia de la enfermedad en los países de nuestra área. Este predominio se mantiene igualmente, aunque en menor proporción en los periodos de menor incidencia, registrándose algunas pequeñas variaciones en la dinámica e importancia relativa de los distintos serogrupos (W.H.O., W.E.R. 1.972 a 1.981).

A continuación se señalan algunos porcentajes del serogrupo B en países de nuestra área, tanto en años de máxima incidencia como en años de menor número de casos:

País	Máxima incidencia	Mínima incidencia
Bélgica	1.971 (90%)	1.975 (60%)
Escocia	1.974 (76%)	1.979 (60%)
Inglaterra	1.974 (66%)	1.977 (54%)
Noruega	1.974 (88%)	1.978 (76%)
Francia	1.979 (82%)	1.974 (73%)

La fuente empleada la constituye el Boletín Epidemiológico de la Organización Mundial de la Salud.

En los escasos antecedentes de que disponemos en nuestro país, de datos de serogrupo de meningococo aisladas de en-

fermos, nos encontramos ya en la onda de 1.971 con un predominio del grupo B (77%) no describiéndose aislamientos del grupo C (FADON, 1.976). En los años 1.976 y 1.977, previos a la última onda epidémica, en una muestra hospitalaria de 90 casos estudiada por PEREZ-TRALLERO y cols. en 1.979, se describe un 70% de cepas del serogrupo B. En estos dos años, los datos aportados por nuestro laboratorio que más tarde sería de referencia, sobre un total de 133 cepas procedentes de enfermos de Galicia, Valencia y Madrid, indicaban casi un 100% de las cepas como pertenecientes al grupo B (Bol Epidem. Sem., Ministerio de Sanidad nº 1.342 ,1978).

En el CUADRO 4, se recogen los lugares de procedencia de las 2,223 cepas aisladas de enfermos. Aunque no se aprecian diferencias en cuanto al predominio del serogrupo B en todas las regiones , existen algunas zonas con un cierto aumento de otros grupos, como en el caso de Rioja y Aragón con respecto al C y Rioja, Murcia y Castilla-León para el grupo A. Estos incrementos podrían explicarse por la posible existencia de brotes locales, algunos de ellos confirmados, los cuales alterarían el porcentaje de estas zonas en relación con la media nacional.

En el CUADRO 5 y la GRAFICA 6, se puede apreciar la relación entre el serogrupo y los diferentes grupos de edad. No se aprecian diferencias en la distribución etária de los grupos B y C con una acumulación de casos típica, del 50% en los menores de 5 años, mientras que en el grupo A, la distribución etária presenta dos particularidades dignas de mención, en primer lugar

el 50% de los casos no se alcanza hasta los menores de 14 años y también se puede apreciar una cierta acumulación de casos (26%) en adultos mayores de 45 años.

Este fenómeno sin embargo queda enmascarado en parte si se representan las frecuencias relativas de los diferentes serogrupos por grupos de edad (GRAFICA 7), observándose un claro predominio del serogrupo B, en todos los grupos de edad.

En cuanto a las cepas aisladas de portadores, se observa un predominio del grupo B, aunque menor (58%), apareciendo la particularidad de que se aíslan todos los serogrupos existentes en mayor ó menor proporción (CUADRO 16).

3.- SEROTIPOS PROTEICOS DE CEPAS AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTADORES.

Los resultados obtenidos con el serogrupo, de las cepas de meningococo aisladas de enfermos nos indica el bajo poder discriminatorio de este marcador ya que el 84% de las cepas pertenecían al mismo serogrupo y prácticamente el resto se lo repartían otros dos.

Como es sabido la descripción de esquemas de serotipia ha permitido una mayor información y discriminación de las cepas causantes de enfermedad (FRASCH y CHAPMAN, 1.972a y b; GOLD y WYLE, 1.970; ZOLLINGER y MANDRELL, 1.980). Por ello, en nuestro trabajo, hemos aplicado este marcador antigénico con el análisis de los patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida, en 1,300 cepas del serogrupo B aisladas de enfermos, durante los 4 años de la onda epidémica actual.

En los CUADROS 10 y 11, se muestran los resultados de este estudio. Nos encontramos con tres grupos mayoritarios de cepas: las del tipo 2 (25,7%), las de los serotipos relacionados 1,8,15 (27,2%) y las cepas no tipables que engloban un 43%.

No se aprecian diferencias significativas en cuanto a la distribución temporal, aunque parece apreciarse un ligero aumento de las cepas 1,8,15. Este fenómeno ha sido observado en Inglaterra en los últimos años por JONES y ABBOTT (1.981).

En cuanto a la distribución geográfica de los serotipos, al igual que en los serogrupos, los serotipos mayoritarios

se localizan en todas las regiones, aunque se pueden observar algunas particularidades ya señaladas en los resultados.

Los primeros estudios de serotipia del meningococo B fueron realizados en 1.973 por FRASCH y CHAPMAN, utilizando el esquema descrito por ellos mismos un año antes.

El análisis de 55 cepas de meningococo aisladas de enfermos durante el periodo 1.963-1.971 en U.S.A., mostró que el serotipo 2 constituía mas del 50% de las cepas, no encontrando variaciones apreciables de los serotipos, en cuanto a su localización geográfica ó temporal de las cepas.

En sucesivos estudios realizados por FRASCH (1.977 y 1.981), analizando cepas de Bélgica y Alemania, encontró que en Bélgica aparecían cifras semejantes a las de U.S.A., sin embargo en Alemania las cepas tipo 2 no llegaban al 40%. En estudios posteriores realizados en Bélgica por DE MAEYER y cols., en 1.981, con cepas aisladas en 1.976 y 1.979, encuentran porcentajes muy elevados de de serotipo 2 (73,7% y 65,5%).

La disminución de las cepas del tipo 2 en Alemania se produce en beneficio de las cepas 1,8,15 que constituyen un 39%, mientras que en U.S.A. y Bélgica, estas cepas representan un 9% y un 7% respectivamente.

Posteriormente FRASCH, estudiando cepas de U.S.A. aisladas entre 1.978 y 1.980, encuentra un aumento de las cepas 1,8,15 hasta un 18%.

JONES y TOBIN en 1.976, encuentran también un 60% de cepas del serotipo 2 en Inglaterra y Gales, durante los años 1.974-75. Como hemos indicado JONES observó posteriormente un cambio desplazándose las cepas hasta los serotipos 1,8,15 en años posteriores.

La importancia de las cepas del tipo 15 se pone de manifiesto en la epidemia de Noruega de 1.978 (HOLTEN, 1.979), las cuales alcanzaron un 89%, por un 2% de las cepas del tipo 2.

En nuestro análisis de cepas del grupo B, por otra parte el más extenso por el número de cepas estudiadas, observamos un equilibrio entre las cepas del tipo 2 y las de los tipos 1, 8, 15. Así mismo encontramos un número de cepas no tipables más elevado que en otros países.

Estos datos nos sugirieron la posible existencia de algún nuevo serotipo no identificado por el esquema existente y que puede agrupar un cierto número de cepas causantes de casos en nuestro país.

Con objeto de discriminar entre el alto porcentaje de cepas no tipables por inmunodifusión doble, se estudiaron los patrones electroforéticos de 439 cepas no tipables, observando que una elevada proporción de las mismas pertenecían al patrón IV del esquema de FRASCH (1.979). Este patrón IV, también lo poseen las cepas pertenecientes a los serotipos 1, 8, 12 y 15. Según esto y abundando en la posible existencia de nuevos serotipos, éstos podrían estar antigénicamente relacionados con

los antes citados ya que poseerían semejantes proteínas antigénicas, algo parecido a lo que ocurriría en los serotipos 1 y 8 que aún poseyendo las mismas proteínas antigénicas, estas se hallan en diferente proporción en ambos serotipos (FRASCH y GOTSCHLICH, 1.974).

Los estudios de serotipia no solo han permitido conocer mas detalles de las cepas productoras de casos en diferentes países sino que, como estudiaron CRAVEN y cols. en 1.979, también han permitido, seguir la pista de estas cepas mas virulentas en poblaciones alta ó baja incidencia de la enfermedad. Estos autores encontraron que en una población libre de casos, no se aislaban en portadores, las cepas virulentas B2 ó CII. Como veremos más adelante hemos utilizado estos marcadores en estudios de localización de cepas en poblaciones infantiles y en contactos familiares de enfermos.

En este sentido también se analizaron los serotipos de 200 cepas aisladas de portadores de diversa procedencia (CUADRO 12), pudiendo observar que casi todas las cepas 1,8,15 han sido aisladas de contactos de enfermos, mientras que las cepas del tipo 2 se aislaron en un 50% en la población general y otro 50% en contactos de enfermos. También es destacable el que la mayoría de las cepas no tipables se aíslan de portadores no contactos. Estas cepas no tipables presentaban en mas de un 85% el patrón electroforético IV. Este hecho ha sido observado por varios autores, entre ellos MARCKS y cols.(1.979), que encontraron este patrón cláramente predominante en contactos de enfermos.

La aparición de otros serotipos en portadores (15%) contrasta con la escasa implantación de estas cepas aisladas de enfermos (4%). Este fenómeno de aparición de otros serotipos en mayor proporción en portadores ya fué descrito por FRASCH y CHAPMAN en 1.973 y DE MAEYER y cols. en 1.981.

Podemos concluir que, para comprender mejor la transmisión de los meningococos dentro de la comunidad, se deben utilizar el mayor número de métodos que contribuyan a una mejor caracterización de las cepas especialmente patógenas. Estos métodos (serotipia, electroforesis, lipopolisacáridotipia), deben ser indispensables en los estudios epidemiológicos y de transmisión de las cepas virulentas. El conocimiento de los serotipos en cepas de enfermos y portadores, nos permite estar preparados para utilizar las medidas de control que en el futuro no demasiado lejano puedan proporcionarnos las vacunas proteicas que se están desarrollando. Estos futuros medios de control serán aplicables en países que, como España, poseen el serogrupo B como causante mayoritario de los casos de infección meningocócica, para el cual no existe una vacuna polisacárida efectiva, como la existente para otros serogrupos.

4.- RESISTENCIAS A SULFAMIDAS Y SU RELACION CON LOS MARCADORES ANTIGENICOS.

Las sulfamidas constituyeron hasta los años 40, el quimioprofiláctico de elección en la erradicación de portadores de meningococo. Tras la aparición de cepas resistentes descritas por MILLAR en 1.963, estas cepas se han aislado en todos los lugares del mundo, produciendo epidemias tan importantes como la de Brasil de 1.974.

Sin interrupción se ha ido elevando el porcentaje de resistencias en la mayoría de los países, como veremos mas adelante. Si bien con menor intensidad que en nuestro medio en muchos países europeos se ha registrado este incremento de resistencias: En Escocia-Inglaterra (15-26% y 6-14% respectivamente), en Francia, con un ligero mejoramiento en 1.979 que puede relacionarse con la menor utilización de las sulfamidas en los últimos años (Informe del Centro colaborador de la O.M.S, Marsella 1.979) y en Bélgica en que el aumento de las resistencias es apreciable sobre todo en las cepas del serogrupo A (DE MAEYER y cols., 1.981).

Nuestra dinámica de adquisición de resistencias a las sulfamidas al igual que la importancia relativa de los distintos serogrupos, es mal conocida en los años anteriores a la realización de este estudio, mediante la creación del Laboratorio de Referencia y la recepción y estudio de cepas de casi todo el país.

En la onda epidémica de 1.971, ya se describen resis-

tencias apreciables de las cepas a la sulfadiazina; para el periodo 1.971-75 se estimó en un 65% de resistencias con porcentajes semejantes dentro de los serogrupos A y B (FADON, 1.976). En los años 1.976 y 77, en una muestra hospitalaria de 90 casos se describieron un 90% de cepas resistentes (PEREZ-TRALLERO y cols., 1.979). En cepas estudiadas por nuestro laboratorio para estos mismos años, se encontraron cifras de resistencia similares (88%). En la presente tesis hemos analizado las resistencias a sulfadiazina de 2.223 cepas aisladas de enfermos durante la presente onda epidémica y 481 cepas aisladas de portadores. Los resultados del estudio se recogen en los CUADROS 7 y 9 y la GRAFICA 8.

Se observa un elevado porcentaje de cepas resistentes (83,5%) que permanece constante en los cuatro años del estudio, las cepas moderadamente resistentes constituyen un 14% y las cepas sensibles únicamente engloban un 2%. En las cepas aisladas de portadores se mantiene la proporción elevada de cepas resistentes, aunque no llega al porcentaje anterior (54,5%), constituyendo las cepas moderadamente resistentes un 28% y las sensibles un 16%.

Aunque la proporción de las cepas sensibles es mucho mayor que en las cepas de enfermos, se puede apreciar en el periodo de 4 años, un descenso paulatino de las mismas, del 22% alcanzado en 1.978 a un 7% en 1.981, acompañado primero de una elevación de las cepas moderadamente resistentes, que se traduce en el último año en el aumento de las cepas resistentes (GRAFICA 8).

El mayor número de cepas sensibles a la sulfadiazina en portadores podría explicarse debido a la existencia de otros serogrupos distintos a los encontrados en enfermos, estos serogrupos particularmente el X, Y y Z son significativamente más sensibles que los considerados como virulentos A, B y C.

El menor aislamiento de los serogrupos antes citados (X,Y,Z) podría explicar también el incremento registrado en las resistencias en los últimos años.

Se han comparado también la CMI_{50} y CMI_{90} de las cepas de enfermos y portadores (GRAFICA 9), apreciándose como cabría esperar una diferencia notable en las CMI_{50} de enfermos (21 $\mu\text{g./ml.}$) y portadores (12,4 $\mu\text{g./ml.}$), siendo similares las CMI_{90} .

En el CUADRO 8, se analiza la posible relación entre el serogrupo de las cepas aisladas de enfermos y su resistencia a sulfadiazina. No se han encontrado diferencias apreciables entre los serogrupos, si exceptuamos un porcentaje algo mayor de sensibilidad en cepas del grupo C (5,7%).

En el CUADRO 14 se expresan también las relaciones entre las resistencias a sulfadiazina y los serotipos. Tampoco se encuentran diferencias importantes en la resistencia, en relación con los serotipos. Esta observación no coincide con la de otros autores (FRASCH y CHAPMAN, 1.973), quienes encuentran mayor porcentaje de cepas resistentes dentro del serotipo 2, que en los otros serotipos. Según nuestros datos, no se pueden

establecer que un determinado serotipo sea mas resistente a las sulfamidas que otro y quizás al menos en nuestro medio, el fenómeno de resistencias pueda explicarse de forma independiente de los serotipos virulentos, ya que la proporción de resistencias encontradas en las cepas del serogrupo B es muy elevada.

La relación entre el fenómeno de resistencias y la situación epidémica es sin embargo bastante oscuro. Por un lado hay situaciones en las que aparecen como fenómenos estrechamente relacionados, como en el caso de U.S.A. a mediados de los 60, en que se produce un cambio brusco en la resistencia de las cepas a la sulfadiazina, a costa sobre todo del grupo C, que desplaza al B hasta entonces predominante (BENNET y YOUNG, 1.969 y ARTENSTEIN y cols., 1.971). La alta resistencia de cepas del grupo C se mantiene en años sucesivos (Meningococcal Disease Surveillance Group, 1.976), apreciándose en los tres últimos un declive que se relaciona con la disminución de la quimioprofilaxis con sulfamidas (JACOBSON y cols., 1.975). Esta aparición brusca de la resistencia, con consecuencias epidémicas se dió también en Noruega, con un aumento de la resistencia global al 92% en 1.973, año anterior a la epidemia y siendo en este caso el B el serogrupo predominante. Sin embargo en la situación americana, el análisis de las tasas de incidencia anuales por los serogrupos resistentes y sensibles denota, que no siempre son los mas resistentes los causantes de las mas altas tasas de ataque, como indicaron JACOBSON y cols. en 1.975. Si consideramos además la existencia de brotes epidémicos descritos que tienen como protagonista a cepas sensibles de meningococo B (FARRIES y cols.,

1.975; JACOBSON y cols., 1.977), parece claro considerar que no es suficiente el fenómeno de aparición de resistencias como explicativo del hecho epidémico.

5.- SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIOTICOS Y SU RELACION CON LOS MARCA- DORES ANTIGENICOS.

Con objeto de completar el estudio de vigilancia epidemiológica de la actual onda epidémica se realizó un muestreo a una concentración de 0,1 µg./ml. de penicilina, ampicilina y rifampicina de las 2.223 cepas aisladas de enfermos, cuyos resultados se muestran en el CUADRO 15. La elección de estos antibióticos se realizó, en base a que los dos primeros son los principales quimioterápicos en el tratamiento de la enfermedad y la rifampicina, el principal quimioprofiláctico sustituto de las sulfamidas.

En dicho estudio se observa la no aparición de cepas resistentes a la concentración probada de penicilina, únicamente un 1% lo fueron a ampicilina y un 3,7% lo fueron a rifampicina. El estudio recogido en el CUADRO 16, nos indica los resultados obtenidos en un muestreo similar con 481 cepas aisladas de portadores. Hay una similitud en cuanto a ausencia de resistencias a penicilina y el porcentaje de resistencias a ampicilina con respecto a las cepas de enfermos. Observándose un ligero aumento de la proporción de cepas resistentes a rifampicina (6,6%).

Para comparar las cifras encontradas por otros autores en cuanto a las CMIs de cepas sensibles en el muestreo, se estudiaron 434 cepas aisladas de enfermos en los cuatro años del

estudio. Los resultados se presentan en el CUADRO 17 y la GRÁFICA 10. Las CMIs 50 y 90 de penicilina (0,016 y 0,024 µg./ml.) son inferiores a las encontradas por ENGELEN y cols. en 1.981 en 59 cepas aisladas en Bélgica (CMIs de 0,03 y 0,06 respectivamente), cifras similares a estas fueron encontradas por EICKHOFF en 1.971 en 150 cepas de U.S.A.

En cuanto a la ampicilina sucede lo mismo, las CMIs son más bajas en las cepas españolas que en las cepas estudiadas por los autores citados.

La rifampicina que posee CMIs 50 y 90 mayores (0,024 y 0,076 µg./ml.), éstas son más parecidas a las de los autores antes mencionados (ENGELEN: 0,015 y 0,06 µg./ml.) y (EICKHOFF: 0,05 y 0,2 µg./ml.) cifras estas últimas algo superiores.

También se evaluaron las posibles relaciones entre el serogrupo y las CMIs de estos antibióticos, encontrando únicamente un incremento significativo de la media geométrica en el serogrupo A con respecto a la rifampicina, duplicando la de otros serogrupos.

Así mismo con objeto de conocer la magnitud de las resistencias por encima de 0,1 µg./ml. de ampicilina y rifampicina, en las cepas resistentes a dicha concentración, aisladas tanto de enfermos como de portadores (CUADROS 18 y 19), se han estudiado sus CMIs.

En enfermos no se han encontrado cepas resistentes a más de 0,4 µg./ml. de ampicilina con una media de 0,24 µg./ml., sucediendo algo similar en las cepas de portadores.

Con respecto a la rifampicina, el 90% de las cepas se inhiben con una concentración de 1,6 $\mu\text{g./ml.}$ (media geométrica de 0,6) y cifras semejantes en portadores.

En la relación de estas resistencias con el serogrupo, se puede apreciar un porcentaje alto de cepas dentro del serogrupo A que son resistentes a 0,1 $\mu\text{g./ml.}$ de rifampicina (15%) en enfermos y (26%) en portadores. También es destacable la ausencia de resistencias a ampicilina en el grupo A y a la rifampicina en el grupo C en cepas de enfermos.

La tendencia del serogrupo A a la resistencia ó al menos a elevar sus CMIs se pone de manifiesto en el muestreo antes descrito en concentraciones por debajo de 0,1 $\mu\text{g./ml.}$, en que este serogrupo presentaba unas CMIs muy superiores a las de otros serogrupos.

Una vez conocida la susceptibilidad de las cepas de meningococo a los principales quimioterápicos y quimioprofilácticos. Nos propusimos averiguar la sensibilidad de cepas de enfermos frente a otros tres antibióticos: cloranfenicol, minociclina y espiramicina, el primero, antibiótico empleado en el tratamiento y los segundos, que en la actualidad se vienen empleando con diversa eficacia como quimioprofilácticos.

Las CMIs de cloranfenicol de 434 cepas se muestran en el CUADRO 20. La media geométrica se sitúa en 0,51 $\mu\text{g./ml.}$ no encontrándose diferencias apreciables en los distintos serogrupos. Las CMIs 50 y 90 son respectivamente 0,37 y 0,70 $\mu\text{g./ml.}$,

estos resultados son cláramente inferiores a los encontrados por ENGELLEN y cols. (1.981), en cepas procedentes de Bélgica (CMI₅₀ y CMI₉₀ de 1 µg./ml.) y de los obtenidos por DEVINE y HAGERMAN en 1.970 (1,13 µg./ml. de media geométrica). Nuestros resultados tampoco se acercan a los obtenidos por EICKHOFF en 1.971 que encontró una CMI₅₀ de 0,6 µg./ml. y una CMI₉₀ de 1,2 µg./ml. Por tanto podemos concluir que las CMIs de cloranfenicol encontradas en nuestras cepas son inferiores a las encontradas en otros países.

En el CUADRO 20 y la GRAFICA 11, también se recogen los resultados obtenidos con 300 cepas frente a antibióticos: minociclina y espiramicina.

La CMI₅₀ y CMI₉₀ de minociclina son mas elevadas que las encontradas por los autores antes citados, que obtienen unas medias geométricas de 0,25 (ENGELLEN) 0,33 (DEVIN) y 0,20 (EICKHOFF) mientras que en nuestras cepas, los valores obtenidos, llegan a 0,88 µg./ml. (CMI₅₀) y la media geométrica es de 1,15 µg./ml.

En este antibiótico tampoco se han encontrado diferencias entre las CMIs de los diferentes serogrupos. Por último, en la espiramicina, la media geométrica de las CMIs es similar a la encontrada por ENGELLEN y cols. (2,11 µg./ml.) ya que en nuestras cepas fué de 2,04 µg./ml. Siendo así mismo inferiores nuestras CMIs 50 y 90. Los valores encontrados por estos autores y los encontrados en nuestro estudio son algo mayores a los encontrados por ALBERT y cols. en 1.979, que observaron como el 95%

de las cepas eran inhibidas por una concentración de 1,6 µg./ml. mientras que en las cepas de ENGELEN la CMI₉₀ era de 2 µg./ml. y la encontrada por nosotros es de 3,2 µg./ml.

Como dato similar al encontrado para la rifampicina, el serogrupo A duplica la media geométrica de resistencias con respecto a los grupos B y C.

6.- ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE QUIMIOPROFILAXIS EN EL CONTROL DE LA INFECCION MENINGOCOCICA EN NUESTRO PAIS.

Hasta la realización de los estudios a nivel comunitario de la infección meningocócica en la onda epidémica actual, la política quimioprolifáctica en nuestro medio estaba retrasada con respecto a las modificaciones introducidas en otros países. Esto se debió fundamentalmente a la falta de información de las resistencias a sulfamidas de las cepas a nivel general. En este sentido debemos señalar que las recomendaciones sistemáticas del abandono de las sulfamidas, datan de los últimos tres años.

Por otra parte, esta información epidemiológica de resistencias es especialmente importante en nuestro medio, ya que al ser el serogrupo B predominante, la quimioprolifaxis es el único arma disponible para ejercer un control en la propagación de la infección, con las limitaciones que indicaremos más adelante. Esto no ocurre en otros serogrupos tales como el A y el C en los que se cuenta con vacunas efectivas para prevenir la enfermedad.

De los datos obtenidos con la sulfadiazina, se desprende claramente la falta de eficacia de las sulfamidas para eliminar el estado de portador, salvo en los casos concretos en que se pueda determinar fehacientemente que las cepas a eliminar sean sensibles a esta droga.

De los demás quimioprolifáticos, la rifampicina es el antibiótico que en la actualidad se recomienda en muchos países como sustituto de las sulfamidas, ya que en numerosos trabajos se ha demostrado que el porcentaje de erradicación del meningococo de nasofaringe es alto y que la persistencia de su acción es análoga a la de las sulfamidas (BEAM y cols., 1.973; ENGELEN y cols., 1.981; GUTTLER Y cols., 1.971 y MUNFORD y cols., 1.974).

Este antibiótico también podemos considerarlo útil en España, pues según nuestros resultados, la susceptibilidad de las cepas a este antibiótico es alta, por lo que se ha recomendado como sustituto de las sulfamidas en nuestro medio (Ministerio de Sanidad, Bol. Epid. Sem. nº 1.417).

El único problema que presenta este antibiótico es la aparición de resistencias tras el tratamiento (BEAM y cols., 1.973; GUTTLER y cols., 1.971 y WEIDMER y cols., 1.971), por lo que en cualquier caso, su uso debe ser restringido y controlada la aparición de resistencias.

La minociclina, según nuestros resultados, presenta CMI's superiores a las encontradas por otros autores. Este hecho, unido a sus características químicas (tetraciclina), potencialmente peligrosa para los niños y sus efectos secundarios

comprobados en estudios de portadores, principalmente de tipo vestibular (DREW y cols., 1.976 y MENENDEZ y cols., 1.980), hace que no sea aconsejable su uso en nuestro medio, salvo que se evalúe cuidadosamente el probable beneficio de su utilización frente al riesgo de aparición de efectos secundarios, ante la hipotética aparición masiva de resistencias a la rifampicina ó a otros quimioprofilácticos.

Finalmente se ha estudiado la susceptibilidad de 300 cepas frente a la espiramicina. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados en Francia y Bélgica (ALBERT y cols., 1.979 y ENGELEN y cols., 1.981). Aunque el porcentaje de erradicación en portadores es inferior al alcanzado con la rifampicina, sin embargo la no existencia de resistencias y su inocuidad, le sitúan como un quimioprofiláctico a tener en cuenta en el futuro.

A todo lo anteriormente expuesto, se debe añadir que la utilización de la quimioprofilaxis en la actualidad, es recomendada como una medida restringida y dirigida fundamentalmente a poblaciones de alto riesgo, tales como cuarteles, guarderías y sobre todo a contactos familiares de los enfermos, que como se ha demostrado presentan el mayor riesgo de aparición de casos secundarios (ARTENSTEIN, 1.975; EICKHOFF, 1.975 y FINLEY, 1.976).

7.- CEPAS ATIPICAS DE MENINGOCOCO AISLADAS DE ENFERMOS Y PORTA-
DORES.

La mayoría de los laboratorios de microbiología clínica ó de salud pública, utilizan las pruebas de utilización de azúcares para diferenciar las especies del género Neisseria, particularmente las especies reconocidas como patógenas dentro del género: N. gonorrhoeae (gonococo) y N. meningitidis (meningococo). Las dos especies citadas difieren en la producción de ácido con maltosa. Esta reacción es positiva para el meningococo y negativa para el gonococo.

La existencia de las variantes maltosa negativas de meningococo fué descrita por KINGSBURY en 1.967, el cual obtuvo estas variantes en experimentos de transmisión genética de resistencias a sulfadiazina; este autor encontró que un 93% de las cepas maltosa negativas eran resistentes a mas de 50 µg./ml. de sulfadiazina.

El aislamiento de una cepa de meningococo con esta característica, del serogrupo Y, en un paciente con meningitis ha sido descrita recientemente por GRANATO y cols. en 1.980, no encontrándose mas antecedentes en la literatura.

Normalmente el meningococo y el gonococo colonizan lugares diferentes en el organismo. Sin embargo el aislamiento de estos microorganismos de lugares no habituales cada vez aparece con mayor profusión en las revistas especializadas.

Así, el meningococo, aislado de forma primordial de líquido cefalorraquídeo, sangre ó nasofaringe, se ha descrito produciendo infecciones en el tracto genital (BECK y cols., 1.974 y FALLON y ROBINSON, 1.974) ó bien como saprofito en dicha zona (FAUR y cols., 1.975 y LEWIS y ALEXANDER, 1.974).

Por otra parte, independientemente de las localizaciones típicas en asociación con gonorrea y prostatitis (MORELLO y BONHNOFF, 1.980), el gonococo ha sido aislado en numerosos procesos infecciosos incluyendo faringitis, meningitis, artritis y otros (COOKE y cols., 1.971; FIUMARA y cols., 1.967; HOLMES y cols., 1.971 y SAYEED y cols., 1.972), y lugares sin una clara implicación infecciosa (BRØ-JORGENSEN y JENSEN, 1.971; SHAHIDULLAH, 1.976). Es claro que el incremento de estos aislamientos atípicos hace necesario una correcta diferenciación de dichas especies, particularmente en los laboratorios en que ésta se basa fundamentalmente en las pruebas de azúcares.

En nuestro estudio de vigilancia epidemiológica, se ha estudiado como prueba confirmativa de identificación de todos los meningococos recibidos, la prueba de utilización de azúcares tanto las cepas de portadores como de enfermos.

Los resultados de este estudio se presentan en los CUADROS 21, 22 y 23. La proporción de variantes maltosa negativas encontradas en nuestras cepas fué similar en las de los enfermos y en las de portadores. No se encontraron diferencias importantes en los porcentajes de aislamiento a lo largo de los 4 años del estudio, si bien en los portadores no se detectaron

cepas con esta deficiencia en los dos últimos años.

Todas las cepas con esta característica pertenecieron al serogrupo B, pudiéndolo explicar quizás por el claro predominio de dicho serogrupo en nuestro país, pero este fenómeno no se circunscribe a un solo serogrupo, ya que GRANAIO y cols. en 1.980 describieron dos cepas, una aislada de enfermo (grupo Y) y una de portador (grupo C), con esta deficiencia.

Al analizar las CMI's de sulfadiazina de estas cepas observamos una concordancia con KINGSBURY, en el sentido de que todas las cepas son resistentes a más de 10 µg./ml. de sulfadiazina (el 90% en enfermos y más del 80% en portadores poseen CMI's iguales ó mayores de 25 µg./ml. (CUADRO 23)).

El serotipo 2 fué prevalente dentro de las cepas maltosa negativas, seguido de las cepas no tipables (esta distribución podría explicarse por tratarse de las cepas más frecuentes dentro del grupo B.

De todos estos datos se desprende que sobre todo en los aislamientos de lugares no habituales, se deben utilizar pruebas alternativas de confirmación de las cepas patógenas de Neisseria, tales como aglutinación, inmunofluorescencia y otras. Ya que el crecimiento en medios selectivos es común y en ciertos casos de flora mixta ó en cepas fastidiosas en su crecimiento.

8.- ESTUDIOS DE PREVALENCIA DE CEPAS AISLADAS DE CONTACTOS FAMILIARES DE ENFERMOS, EPIDEMIOLOGICAMENTE RELACIONADAS CON LAS AISLADAS DE ESTOS.

Numerosos trabajos han establecido la importancia que, desde el punto de vista epidemiológico, tienen los contactos íntimos de los enfermos con infección meningocócica, tanto en la propagación de nuevos casos, como por el mayor riesgo que presentan de adquisición de casos secundarios con respecto a la población general.

Así en un estudio realizado en Bélgica por DE WALSH y cols., en 1.981, se observan tasas de ataque secundario de 685/100.000 en contactos familiares, de 404/100.000 en guarderías y de 77/100.000 en escuelas primarias, tasas muy superiores a las encontradas para la población general durante el periodo del estudio (3,3/100.000). Otros estudios que han revelado también altas tasas de riesgo en contactos familiares han llevado a recomendar las medidas profilácticas fundamentalmente en estos grupos de población (JACOBSON y cols., 1.976; GREENWOOD y cols., 1.978 y Meningococcal Disease Surveillance Group, 1.974). Todos estos trabajos están basados en datos estadísticos, para determinar el mayor riesgo de los contactos íntimos de los enfermos.

Como hemos indicado anteriormente, las técnicas de serotipia se emplearon en una primera fase, para determinar la virulencia relativa de los distintos serotipos en enfermos y una vez establecido que algunos de los mismos son más frecuentes en los casos, estos métodos se han utilizado para localizar las

cepas virulentas en poblaciones con ó sin casos de infección meningocócica. Para evaluar, la transmisión de las cepas virulentas, se han realizado algunos estudios en grupos familiares. FRASCH y LaMOCCA en 1.981, en un estudio con 25 familias de enfermos con portadores, descubrieron que el 70% de las mismas contenían un portador de la misma cepa del enfermo (serogrupo y serotipo) y el 30% restante poseían cepas diferentes a las del enfermo.

En otros trabajos de estos mismos autores, establecieron que la madre era la portadora más frecuente de la cepa del enfermo 8/24 mientras que el padre como portador se dió en 1 de las 24 familias.

En nuestro estudio hemos pretendido, por una parte, aplicar los marcadores epidemiológicos basados en los antígenos del meningococo para caracterizar las cepas de los enfermos y sus contactos familiares y de paso determinar la prevalencia de las cepas epidemiológicamente relacionadas con las de los enfermos. Para ello hemos estudiado 42 grupos familiares compuestos por el enfermo y sus convivientes. Los resultados de este estudio se muestran en los CUADROS 24, 25, 26 y las características de las cepas aisladas en los CUADROS 27 y 28.

Hemos encontrado proporciones similares a las de FRASCH, en relación con los portadores familiares de la cepa del enfermo, ya que 13/20 familias presentaban algún portador con la cepa del enfermo y 7/20 familias poseían portadores con cepas

distintas a la causante de la infección (65% y 35%, respectivamente). En nuestro caso es el padre el miembro de la familia que aparece con mas frecuencia como portador de la cepa del enfermo, seguido de la madre (7/20 y 5/20).

Estos datos concuerdan con los de FARRIES y cols. de 1.975 que establecieron que los adultos son los miembros de la familia que mas frecuentemente presentan la cepa del enfermo (aunque en su trabajo solo utilizaron los serogrupos).

Este hecho fué apuntado tambien por MUNFORD y cols. (1.975) quienes expusieron la hipótesis de que la infección meningocócica es introducida en las familias a través de los adultos.

Una demostración clara de la utilidad de los marcadores finos, para una mejor caracterización de las cepas de este tipo de estudios, lo da el hecho de que a medida que se introducen marcadores mas precisos, el porcentaje de cepas que se pueden considerar iguales desciende (CUADRO 24). Si consideramos únicamente el serogrupo, el porcentaje de familias que poseerían una cepa similar a la del enfermo es del 40% y si incluimos el serotipo el porcentaje desciende a un 30%.

Según estos datos podemos concluir que en este tipo de estudios es fundamental utilizar los marcadores antigénicos mas finos para aproximarse más a la realidad epidemiológica de estos grupos de población.

En los últimos años, el bagaje de marcadores epidemiológicos se ha enriquecido con esquemas para la determinación

del lipopolisacárido (ZOLLINGER y MANDRELL, 1.977 y antígenos protéicos del serogrupo A (ZOLLINGER Y MANDRELL, 1.980). Estos esquemas unidos a los ya existentes, pueden jugar un papel importante en futuros estudios epidemiológicos.

Finalmente, en los serotipos encontrados en enfermos de estos grupos familiares, hay una clara predominancia del serotipo 2 (45%). Este hecho concuerda con el elevado porcentaje de este serotipo encontrado en Cataluña, donde está situado el Hospital que colaboró en el presente estudio.

También se detecta un 81% de cepas resistentes a sulfadiazina, cifras semejantes a las del resto del país (CUADROS 27 y 28.

9.- LOCALIZACION DE SEROTIPOS VIRULENTOS EN POBLACIONES INFANTILES SUSCEPTIBLES DE ADQUIRIR LA INFECCION MENINGOCOCICA.

Una vez establecida la estimación de los serotipos prevalentes en enfermos, lo que confirió a algunos serotipos una mayor virulencia, por ser mayoritarios entre las cepas productoras de casos, en una segunda fase se investigó la prevalencia de estos serotipos virulentos en poblaciones con alta ó baja incidencia de enfermedad. Entre ellos destaca el realizado por CRAVEN y cols, en 1.979 en una población militar libre de casos de meningitis, observando que los serotipos considerados como virulentos no estaban presentes en dicha población. Este dato sirve para abundar en la necesidad de utilizar métodos mas exactos en la caracterización de cepas de meningococo en estudios de portadores, ya que el estudio mencionado, mostró un elevado porcentaje de portadores (64,5%), siendo serogrupables el 60% de las cepas y repartiéndose estas entre los grupos B, Y, 29E y W135. Sin embargo y aun existiendo este elevado número de portadores no se produjo ningún caso de infección meningocócica en dicha población, durante un periodo superior a un año, antes de la realización del estudio.

Ya AYCOCK y MUELLER en 1.950, revisaron el problema de los portadores de meningococo y observaron que la incidencia de la enfermedad no estaba en función del porcentaje de portadores, ya que se podía comprobar que, en poblaciones con un porcentaje de portadores semejantes, no se producían brotes con la misma intensidad ó bien algunas de ellas permanecían indemnes.

WENZEL y cols., en 1.973 también discutieron la poca utilidad de la determinación del porcentaje de portadores grupo-específicos. Estos autores observaron, que lo que influía en la dinámica de la infección, no era la proporción de portadores sino la frecuencia de la aparición de cepas específicas.

Todos estos trabajos partieron de la limitación que imponía la no utilización de la serotipia, la cual como puede apreciarse añade una información importante en la localización de cepas virulentas y así poder determinar el posible riesgo de aparición de nuevos casos en una determinada población.

Estos estudios se hacen necesarios en poblaciones infantiles, por otra parte las mas susceptibles a la enfermedad. En la literatura no abundan los trabajos de prevalencia ó incidencia de portadores nasofaríngeos en poblaciones infantiles. Entre los estudios realizados en nuestro país podemos destacar los realizados por CASAL y MARTIN-BOURGON en 1.975 y los de RODRIGUEZ-CONTRERAS y cols. en 1.981, sin embargo estos estudios son limitados por las razones antes expuestas, ya que únicamente presentan los datos basados en el serogrupo como marcador epidemiológico y aunque en ambos casos se pone de manifiesto la preponderancia del serogrupo B, este dato acerca relativamente a la realidad epidemiológica y al riesgo real de la aparición de casos en dichas poblaciones, pues como hemos indicado, dentro del serogrupo B existen diferencias significativas de virulencia entre los serotipos y precisamente en estudios realizados en otros países, los serotipos menos virulentos son mas abundantes en los

portadores (FRASCH y LaMOCCA, 1.981).

En nuestro caso hemos tratado de añadir información que nos proporciona la serotipia, para acercarnos lo mas posible a la realidad epidemiológica de estas cepas más virulentas en poblaciones susceptibles. Para ello hemos estudiado una población escolar de Alcalá de Henares, en colaboración con los Servicios de Pediatría y Microbiología del Hospital Central de la Cruz Roja, durante un periodo de 3 años, con tomas trimestrales, cuyos resultados se muestran en los CUADROS 29 y 30 y la GRAFICA 12.

En el estudio se realizaron 2.064 tomas de exudado nasofaríngeo de niños entre 6 y 8 años. La elección de esas edades se basó fundamentalmente en facilidades de orden técnico y por tratarse de un grupo de población en que aparece Neisseria lactamica en alta proporción (GOLD y cols., 1.978); otra parte del estudio se desarrolló con objeto de conocer la prevalencia de este microorganismo en dicha población por las razones que mas adelante indicaremos.

Los porcentajes de portadores encontrados durante este periodo no difieren significativamente con relación a la distribución temporal, hecho que cabría esperar, si se tiene en cuenta la clara distribución temporal de los casos de meningitis. El porcentaje de meningococos oscila entre el 7% y el 13,5% a excepción de la última toma de Junio de 1.982, en que desciende significativamente hasta un 3,7%.

Este fenómeno de no estacionalización de los porcentajes de portadores ya fué observado por GOLD y cols., en 1.978 en una población similar, aunque con tasas de portadores inferiores (entre 0,5% y 2%). En nuestro estudio, destaca como cabría esperar, el serogrupo B con un 48%, así como las cepas no grupables que alcanzan un 32%.

Los serotipos encontrados dentro del grupo B (CUADRO 30) nos muestran una población elevada de cepas virulentas (tipo 2: 29%), (tipos 1,8,15: 21%). La abundante circulación de estas cepas podría explicarse por el periodo altamente epidémico en que se hallaba la población durante el estudio, por lo que teóricamente, esta población era susceptible de que aparecieran en su seno casos de infección meningocócica.

La distribución temporal de los serotipos virulentos no difirió desde el punto de vista estacional, hecho curioso si se tiene en cuenta la mencionada distribución estacional de los casos, lo que nos lleva a pensar en la concurrencia de otros factores epidemiológicos, en la aparición de casos en una población, que si inciden en la presentación estacional de los mismos.

Por último un hecho significativo es la relativamente baja proporción de cepas resistentes a sulfadiazina (37,5%), casi todas ellas pertenecientes al grupo B, tipo 2; este porcentaje bajo puede deberse al abandono paulatino de las sulfamidas en este medio, a nivel de profilaxis infantil, aunque este hecho debe evaluarse en un contexto mas general.

En contraste llama la atención el alto porcentaje de cepas resistentes a 0,1 µg./ml. de rifampicina, muy superior al encontrado en las cepas aisladas de enfermos y portadores de la población general (CUADRO 31). Sin embargo, son cifras similares a las encontradas por CASAL y MARTIN-BOURGON en 1.975 en una población escolar semejante, en 102 cepas que presentaron un 28% de resistencias a dicha concentración.

10.- EL PROBLEMA DIAGNOSTICO Y EPIDEMIOLOGICO DE NEISSERIA LACTAMICA EN ENCUESTAS DE PORTADORES DE MENINGOCOCO.

La otra parte del estudio en las Escuelas de Alcalá de Henares, fué la investigación de la prevalencia de N. lactamica y su comparación con la observada para el meningococo.

Neisseria lactamica es una especie particularmente interesante para aquellos microbiólogos que trabajan con meningococos, bien desde el punto de vista meramente microbiológico ó bien desde el punto de vista de las encuestas de portadores.

N. lactamica y N. meningitidis poseen similitudes que hacen posible la confusión entre ambas, en determinados casos.

- 1) Habitat común en nasofaringe humana.
- 2) Requerimientos nutritivos semejantes y crecimiento de N. lactamica en medio selectivo de neisserias patógenas (CATLIN, 1.973).
- 3) Reactividad cruzada de N. lactamica con sueros antimeningocócicos (GOLD y cols., 1.978; HOLLIS y cols., 1.969 y MICHAEL y cols., 1.965).

Todos estos hechos, unidos a la alta incidencia de esta neisseria en niños (GOLD y cols., 1.978), han producido en años anteriores a los 70, el que posiblemente muchas encuestas de portadores anormalmente altas, hubieran visto reducido su porcentaje si se hubiera discriminado N. lactamica, ya que la lactosa (azúcar cuya utilización es positiva para esta especie y negativa para el meningococo) no se utilizaba, por considerarla como una prueba de carácter genérico.

No obstante, existen algunas diferencias notables, entre ambos microorganismos, que se unen a la mencionada de la lactosa; estas son: la baja virulencia de N. lactamica, ya que sólo se han descrito tres aislamientos de este microorganismo en sangre ó LCR (HOLLIS y cols., 1.970; LAUER y FISHER, 1.976 y WILSON y OVERMAN, 1.976); así como el alto porcentaje de cepas autoaglutinables, entre un 60% y un 80% encontrados por varios autores (GOLD y cols., 1.978 y HOLLIS y cols., 1.969).

En nuestro estudio hemos analizado, la prevalencia de esta especie en la población mencionada, encontrando una proporción que oscila entre 2 y 3 veces mayor que la encontrada para el meningococo (GRAFICA 12 y CUADRO 29). Los porcentajes encontrados para la N. lactamica son incluso superiores a los encontrados por GOLD y cols., 1.978, en el mismo grupo de edad (11%), por un 19,8% encontrado por nosotros.

Con objeto de comprobar las observaciones de otros

autores sobre los porcentajes de cepas rugosas y sobre la detección de reactividad cruzada con sueros antimeningocócicos, estudiamos 130 cepas de N. lactamica (CUADRO 32) por aglutinación en porta con sueros de meningococo.

Encontramos que un 10,8% de las cepas aglutinaron con suero del grupo B, un 10% no aglutinaron con ningún suero y un 79% fueron autoaglutinables, estas cifras son semejantes a las encontradas por los autores antes mencionados.

Con objeto de detectar la posible existencia de antígenos de reactividad cruzada en las cepas autoaglutinables, empleamos el método de agar suero, que eliminaba el problema de la autoaglutinabilidad, al reaccionar el suero con antígenos difundidos en agar. Este método ha sido utilizado para la identifica- ción del serogrupo de meningococos en el laboratorio y en encues- tas de portadores (CRAVEN y cols., 1.978 y KUZEMENSKA y cols., 1.977).

Los resultados obtenidos se muestran en el CUADRO 32. Podemos observar que el porcentaje de cepas que presentaron reac- tividad cruzada se eleva con respecto a la aglutinación de un 10,8 hasta un 90%. Siendo el suero C el que presenta una mayor reac- tividad cruzada.

La existencia de antígenos similares con los del me- ningococo podría constituir uno de los factores de protección en los niños colonizados por este microorganismo, frente a la colonización del meningococo y posible riesgo de enfermedad.

Este fenómeno ha sido demostrado por GOLD y cols. en 1.978 quienes observaron que el 40% de los niños colonizados por Neisseria lactamica incrementaban los títulos de anticuerpos bactericidas frente a los meningococos de los grupos A, B, y C, frente al 7% de niños no portadores.

Queda sin dilucidar la naturaleza de estos antígenos similares a los del meningococo, aunque al ser capaces de inducir anticuerpos bactericidas, se puede pensar en antígenos de la membrana externa de la pared ó en algunos casos de posibles polisacáridos capsulares.

Por otra parte, la utilización del método agar-suero para la detección directa de portadores, ha sido utilizada recientemente por CRAVEN y cols., 1.979; sin embargo de nuestros resultados con este método se desprende la necesidad de un análisis cuidadoso de los resultados obtenidos con este método, ya que el crecimiento de N. lactamica en medios selectivos y la aparición de reactividad cruzada puede inducir a error.

Para evaluar la existencia de reactividad cruzada detectada directamente realizamos un estudio en 100 niños de una escuela de Majadahonda, cuyos resultados se muestran en el CUADRO 33. Los porcentajes de ambos microorganismos se mantienen con respecto a la encuesta de Alcalá de Henares. Sin embargo pudimos comprobar que 8/26 cepas de N. lactamica (30,3%) produjeron diversos halos de reactividad cruzada con varios sueros antimeningocócicos.

11.- CARACTERIZACION DE BROTES DE INFECCION MENINGOCOCICA EN
COMUNIDADES SEMICERRADAS (GUARDERIAS).

Como ejemplo de aplicación de los marcadores antigénicos como auxiliares para caracterizar un brote de infección meningocócica y así poder las medidas de control disponibles en una determinada situación epidemiológica, hemos estudiado un brote de infección meningocócica en una guardería de Logroño (Rioja) cuya cronología y características de las cepas estudiadas se expresan en los CUADROS 34, 35 y 36.

Los hechos mas significativos de este brote son los siguientes:

La cepa causante de todos los casos estudiados era idéntica y sus características eran: Serogrupo C, serotipo II, patrón electroforético II y una CMI de sulfadiazina de 50 µg./ml. La cepa a 0,1 µg./ml. de penicilina, ampicilina y rifampicina.

Después de las primeras medidas profilácticas (CUADRO 34), con rifampicina, se aislaron dos cepas resistentes en portadores iguales a las aisladas previamente al tratamiento, las cuales presentaban CMIs de 6,4 µg./ml.

La caracterización completa del microorganismo causal y su presencia dentro de los contactos, permitió el control de los portadores de la cepa virulenta (segunda quimioprofilaxis) así como la vacunación con polisacárido C del resto de los niños.

Llama la atención, la ausencia de portadores del sero grupo B que como se ha indicado es el más extendido, tanto en enfermos como en portadores en todo el país.

La caracterización de cepas virulentas, la extendimos a una guardería libre de casos de similares características a la del brote y aunque se encontraron proporciones parecidas de portadores, sin embargo, las pocas cepas del grupo C que se aislaron no pertenecían al serotipo II, responsable del brote.

Este serotipo II del grupo C, constituyó en U.S.A. entre el 60% y el 80% de los casos producidos generalmente en brotes en establecimientos militares durante los años 60 y principio de los 70 (GOLD y cols., 1.971).

Permanece sin aclarar, la falta de efectividad de la primera medida quimioprolifática, ya que el porcentaje de portadores permaneció constante y además el porcentaje de cepas virulentas aumentó (CUADRO 35).

Este hecho nos sugiere la posibilidad de una incorrecta dosificación de la quimioprolifaxis en algunos casos que permitió la circulación posterior de las cepas virulentas.

La aparición de este brote se puede enmarcar, por una parte en el aumento experimentado por el serogrupo C en el último año de la onda epidémica actual (14,5%), el cual continúa en los 6 primeros meses de 1.982 (18,8%), año este último de clara declinación de los casos declarados de infección meningocócica en nuestro país y además por la abundancia relativa de el citado serogrupo en la provincia donde se produjo el brote, con relación a la media nacional (16% y 4% respectivamente).

12.- ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE NUESTRO SISTEMA DE VIGILANCIA
EPIDEMIOLOGICA Y MEDIDAS DE CONTROL DE LA INFECCION MENINGO-
COCICA EN ESPAÑA.

La validez de los sistemas de vigilancia de las enfermedades transmisibles, basados en la declaración de casos, incluyendo la meningitis meningocócica, ha sido cuestionada como fuente de información epidemiológica, sobre todo en lo que respecta a la valoración ajustada de la incidencia y otras características de la enfermedad, incluidas la distribución etaria de los casos y la letalidad (GOLDRACE y MILLER, 1.976), sin embargo parece aceptado su valor como reflejo de la tendencia del comportamiento epidemiológico y con las debidas precauciones, permite ciertos análisis comparativos.

En el caso de España, la incorporación del laboratorio de referencia de meningococos en 1.978, ha supuesto una mejora cualitativa del sistema de vigilancia basado en la declaración de casos, pero es indudable, según se desprende del análisis de la información que se deriva de este, que es necesario introducir mejoras en los mecanismos de canalización de la información.

En este sentido habria que intentar: evaluar la sensibilidad y especificidad de la actual declaración y determinar su cobertura; mejorar el seguimiento de los casos y defunciones; diferenciar entre casos aislados y asociados en brotes, en el registro general para poder analizar la importancia en nuestro medio de la presentación en forma de brotes; controlar mejor las

medidas de prevención y profilaxis con una mayor integración entre los servicios epidemiológicos y de laboratorio. Para ello sería necesario revisar los distintos niveles de responsabilidad en el sistema de vigilancia actual e introducir en cada caso los mecanismos de mejora que se estimasen oportunos. Este esfuerzo estaría plenamente justificado, dada la importancia la importancia de la infección meningocócica en nuestro país.

RESUMEN Y CONCLUSIONES
=====

La meningitis meningocócica se encuentra en España, en la onda epidémica mas importante en cuanto al número de casos, de nuestro siglo. Habiéndose registrado en el periodo 1.978-1.981, 21.086 casos de infección meningocócica (meningitis y/o sepsis meningocócica).

En el presente estudio hemos pretendido analizar la situación epidemiológica de esta enfermedad en la actual onda epidémica, desde el punto de vista del agente causal.

Para ello hemos estudiado los marcadores antigénicos del meningococo (serogrupo, serotipo) y se ha realizado la vigilancia epidemiológica de resistencias a los principales agentes terapéuticos (penicilina, ampicilina y cloranfenicol) y quimio-profilácticos (sulfadiazina, rifampicina, minociclina y espiramicina).

Con el aporte de estos datos se conoce por primera vez en nuestro país, las características a nivel comunitario del agente causal de la citada onda epidémica y por tanto la posible aplicación de las medidas de control que se pueden emplear en función de las características de la onda.

Una segunda parte de la memoria ha consistido en aplicación de estos marcadores epidemiológicos en estudios que permitan un mejor conocimiento de la transmisión de cepas virulentas. Para ello hemos investigado estas cepas en tres poblaciones de riesgo de infección meningocócica: familiares de enfermos, una población infantil y en un brote de infección meningocócica en una guardería.

Por último y como corolario de estos estudios, se exponen algunas consideraciones sobre la vigilancia epidemiológica en nuestro país, así como un comentario sobre la utilización de la quimioprofilaxis como medida de control en nuestro medio.

De los estudios realizados podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1) El meningococo responsable de la mayoría de los casos de infección meningocócica en la actual onda epidémica ha sido el de serogrupo B (84,5%), seguido de lejos por el grupo A (11,1%) y el grupo C (4%). Este predominio podemos encuadrarlo en su contexto europeo, en el que aparece el citado serogrupo con elevados porcentajes en todos los países. También podemos destacar el aumento paulatino a lo largo del periodo del estudio del grupo C. Este hecho podría significar un cambio de estrategia en el control de la infección meningocócica en nuestro país. Por otra parte también es notable el descenso del grupo A a lo largo del periodo, altamente epidémico en otras latitudes (Africa y Brasil).
- 2) De los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos de cepas de enfermos podemos destacar la sensibilidad de las cepas a los principales antibióticos usados en terapéutica (penicilina, ampicilina y cloranfenicol). No encontrándose cepas resistentes a 0,1 µg./ml. de penicilina, el 100% de las cepas de ampicilina lo hicieron a 0,4 µg./ml. (únicamente un 1,1% fueron resistentes a 0,1 µg./ml. de este antibiótico, mientras que para el

cloranfenicol, en un muestreo realizado con 434 cepas se obtiene una CMI_{90} de 0,7 $\mu\text{g./ml.}$ Estas concentraciones encontradas para los tres antibióticos que inhiben a las cepas son inferiores a las encontradas en U.S.A y en Europa.

- 3) Los estudios con los agentes quimioprolifáticos (sulfadiazina, rifampicina, minociclina y espiramicina), nos muestran una elevada resistencia a la sulfadiazina (83%) de las cepas aisladas de enfermos y un 54% en las de portadores. La sensibilidad a 0,1 $\mu\text{g./ml.}$ de rifampicina engloba un 86,3%, siendo el resto inhibidas por concentraciones no superiores a 6,4 $\mu\text{g./ml.}$ En cuanto a la minociclina y espiramicina, aunque sus CMIs no son elevadas, en el primero de ellos son algo superiores a las encontradas por otros autores.
- 4) La elevada proporción de resistencias a la sulfadiazina le elimina como quimioprolifático en el control de portadores de meningococo, según nuestros datos, el quimioprolifático utilizado sería la rifampicina, con las restricciones indicadas en la discusión y con una vigilancia adecuada de la aparición de resistencias. La espiramicina puede jugar un papel futuro en la quimioprolifaxis, ante la aparición de resistencias a la rifampicina. En cuanto a la minociclina, la aparición de efectos secundarios en adultos y la naturaleza química de este antibiótico (tetraciclina), unido a las CMIs mas elevadas que las de otros países le hacen no aconsejable en nuestro

país.

- 5) Los serotipos encontrados dentro del serogrupo B de cepas productoras de casos, muestran un predominio de las cepas de los serotipos 2, y complejo 1,8,15; siendo notable el porcentaje de cepas no tipables (43%), lo que nos hace pensar en la posibilidad de la existencia de nuevos serotipos no descritos y que podrían tener cierta incidencia en nuestro medio. La abundancia del patrón electroforético IV en las cepas no tipables, nos sugiere la relación de estos serotipos no descritos con el complejo 1, 8,15, cuyos serotipos poseen el citado patrón.
- 6) En el estudio del agente causal aislado tanto de enfermos como de portadores, se ha encontrado una cierta proporción de cepas deficientes en la producción de ácidos a partir de la maltosa, lo que las hace en parte indistinguibles de los gonococos, atendiendo únicamente a esta característica. Este hecho puede plantear problemas diagnósticos, sobre todo en localizaciones atípicas de ambos gérmenes.
- 7) Se han aplicado los marcadores antigénicos del meningococo en el estudio de localización de cepas virulentas y/o epidemiológicamente relacionadas con las del enfermo en contactos familiares. En estos estudios hemos encontrado un 30% de portadores de la cepa del enfermo, siendo los miembros adultos de la familia los que con mas frecuencia poseen la cepa del enfermo.

- 8) En una población infantil de 6 a 8 años de escuelas de Alcalá de Henares se encuentra una proporción de cepas virulentas semejante a la encontrada en el resto del país en cepas de enfermos, lo cual podría explicar el periodo inténsamente epidemico en que nos encontramos y el posible riesgo de aparición de nuevos casos por la abundante circulación de dichas cepas.
- 9) En esta población se aísla también una proporción de 2 a 3 veces mayor de Neisseria lactamica con respecto al meningococo, este hecho unido a la reactividad cruzada de este microorganismo con el meningococo, nos puede sugerir un papel protector de la colonización de este microorganismo en relación con la colonización del meningococo, lo que frenaría en parte el riesgo teórico de aparición de nuevos casos, esta similitud antigénica se ha demostrado por la aparición de anticuerpos protectores frente al meningococo en niños colonizados por Neisseria lactamica (GOLD y cols., 1.978).
- 10) Por último se han empleado los marcadores antigénicos en la caracterización de un brote de infección meningocócica en una guardería de Logroño. Se demostró que todos los casos producidos en la misma en un periodo relativamente corto fueron producidos por la misma cepa C tipo II y se demostró la circulación de la misma en los contactos, arbitrándose medidas de control que impidieron la aparición de nuevos casos.

Como sugerencias que pueden extraerse del presente estudio, aparecen en primer lugar una mejora e integración de los sistemas de vigilancia de la infección meningocócica en nuestro país y desde el punto de vista de las vías de investigación que pueden continuar la línea de nuestro trabajo, las cuales consideramos que pueden tener cierta relevancia dentro de la salud pública, podemos señalar:

- 1) Investigación de nuevos serotipos, dentro del elevado porcentaje de cepas no tipables por el esquema existente, encontradas en nuestro país. Así como aplicación de otros marcadores que puedan discriminar dichas cepas, tales como la lipopolisacáridotipia.
- 2) Estudios de adquisición de N. lactamica y meningococo en poblaciones de alto riesgo y análisis del papel protector de esta neisseria. Este estudio incluiría el análisis de los antígenos semejantes encontrados en ambos microorganismos.
- 3) Investigación de serotipos virulentos dentro del serogrupo C.
- 4) Puesta a punto de técnicas serológicas tanto de medición de respuesta inmune, como de detección de antígenos en muestras tales como líquido cefalorraquídeo ú otros fluidos.
- 5) Pruebas de campo de inmunización con vacunas polisacáridas y proteicas y medida de la respuesta inmune.

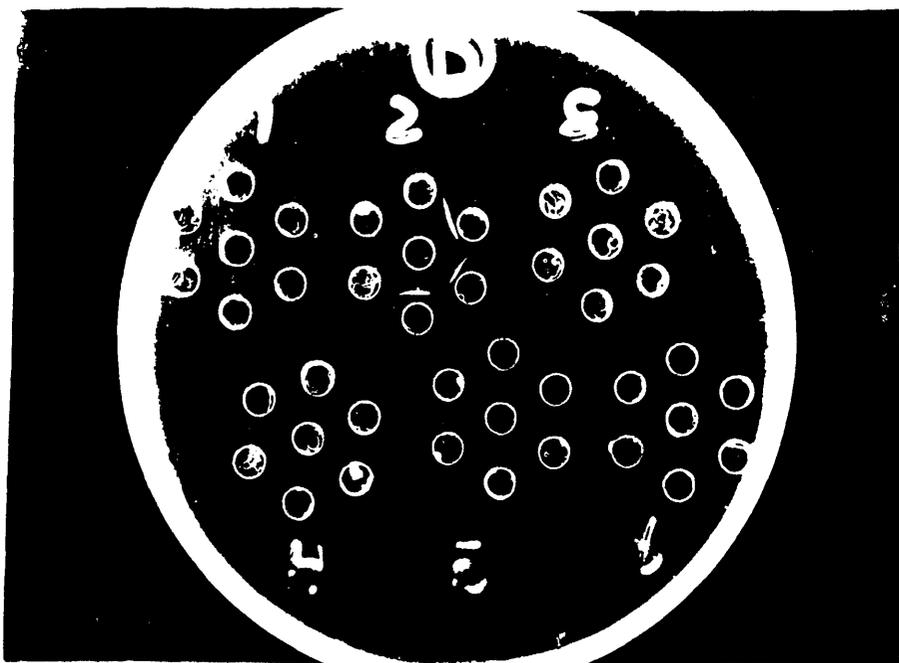
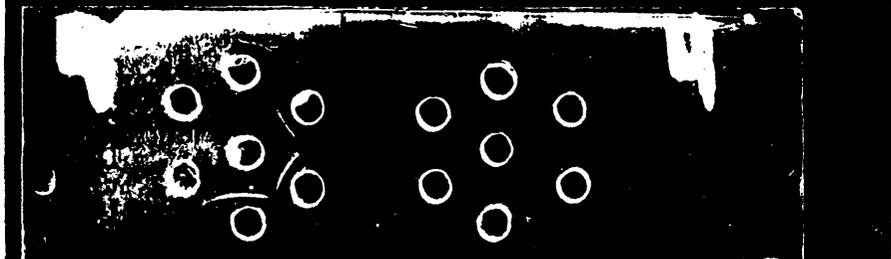
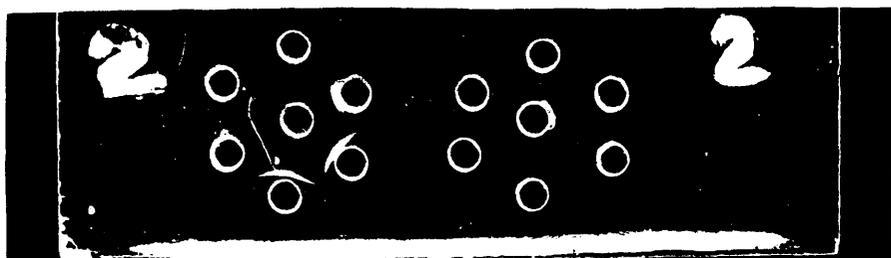
216

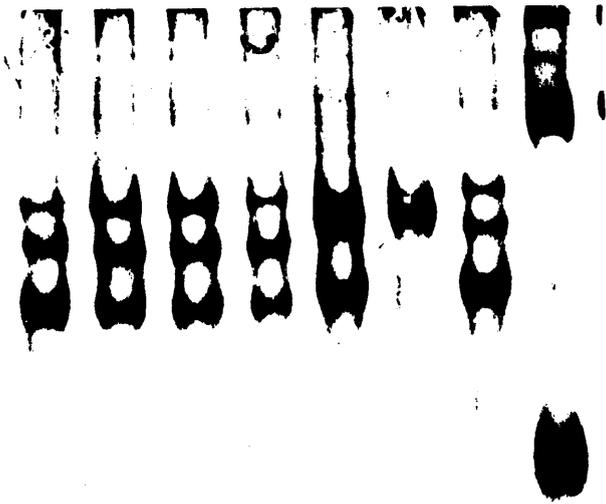
F O T O G R A F I A S
=====

- Fotografía 2.- Inmunodifusión doble en gel (ID).
Pocillos centrales: Izquierda: Suero tipo 2.
Derecha : Suero tipo 8.

Pocillos externos: 6 cepas del grupo B.
Las cepas 2, 3, 4 son del tipo 2.
Se observa la eliminación de reacciones inespecíficas en las cepas 5 y 6, mediante absorción con LPS del suero 2. Porta 2: (antes de la absorción) y porta 4 (después).
- Fotografía 3.- Placa de serotipia (ID). En los pocillos centrales, sueros de los tipos: 1, 2, 4, 5, 6 y 8.
En los pocillos periféricos 6 cepas del grupo B aisladas de enfermos. Las cepas 2, 3 y 4 pertenecen al serotipo 2.
- Fotografía 4.- Patrones electroforéticos en gel de poliacrilamida de cepas de referencia. De izquierda a derecha: cepas de los tipos 1, 8, 12 y 15 (todas de patrón IV), cepa 2,7 (I), cepa 2 (II) y cepa 1,8,15. En la última columna controles de pesos moleculares: seroalbúmina bovina y ribonucleasa.
- Fotografía 5.- Patrones electroforéticos de 10 cepas no tipables por ID. De izquierda a derecha: Todas poseen el patrón IV menos la primera (X) y la 4ª (I). La undécima columna muestra controles de peso molecular: seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, pepsina y tripsinógeno.

212





B I B L I O G R A F I A

=====



- ABBOTT, J.D. and J.F.R. GRAVES. Serotypes and sulphonamide sensitivity of meningococci isolated from 1966-1971. J. CLIN. PATH. 25: 528-530 (1.972).
- ALBERT, J.P., J. ETIENNE et J. CATZ. Sensibilifé des méningocoques à la spiramycine. Etude de 325 souches. Conclusions pratiques pour une conduite prophylactique éventuelle. MED. MAL. INFECT. 9: 443-449 (1.979).
- ALBRECHT, H. and A. GHON. Zur frage der morphologischen charakterisierung des Meningococcus intracellularis. ZENTRABL. BACT. PARASI. INFEK. HYG. ABT. 33: 496-510 (1.903).
- APICELLA, M.A. Identification of a subgroup antigens on the N. meningitidis group C capsular polysaccharide. J. INFECT. DIS. 129: 147-153 (1.974).
- ARTENSTEIN, M.S. Prophylaxis for meningococcal disease. J.A.M.A. 231, 10: 1035-1037 (1.975).
- ARTENSTEIN, M.S. Neisserial vaccines: Meningococcus=yes, gonococcus=no; en D. Schlessinger, Microbiology-1.975. pag. 406-408. Amer. Soc. for Microbiol. Washintong D.C. (1.976).
- ARTENSTEIN, M.S., W.C. BRANCHE, J.G. ZIMMERLY, R.L. COHEN, E.C. TRAMON, D.L. KASPER and C. HARKIN. Meningococcal infections. III. Studies of \bar{A} polysaccharide vaccines. BULL. W.H.O. 45: 283-286 (1.971).
- ARTENSTEIN, M.S., H. SCHNEIDER and M.D. TINGLEY. Meningococcal infections. I. Prevalence of serogroups causing disease in U.S. Army personnel 1.964-1.970. BULL. W.H.O. 45: 275-278 (1.971).

- AYCOCK, W.L. and J.H. MUELLER. Meningococcus carrier rates and meningitis in populations. BACTERIOL. REV. 14: 115-159 (1.950).
- BEAM, W.E., N.R. NEWBERG, L.F. DEVINE, W.E. PIERCE and J.A. DAVIES. The effect of rifampin on the nasopharyngeal carriage of N. meningitidis in a military population. J. INFECT. DIS. 124: 39-46 (1.973).
- BECK, A., J.L. FLUKER and D.J. PLATT. N. meningitidis in urogenital infection. BR. J. VENER. DIS. 50: 367-369 (1.974).
- BENNETT, J.V. and L.S. YOUNG. Trends in meningococcal disease. J. INFECT. DIS. 120: 634-635 (1.969).
- BEUVERY, E.C. Immunization against bacterial meningitis. J. INF. 3, Supp. 1: 71-79 (1.981).
- BØVRE, K. and T.W. GEDDE-DAHL. Epidemiological patterns of meningococcal disease in Norway 1975-1979. NIPN ANNALS 3,2: 9-22 (1.980).
- BØVRE, K., E. HOLTEN, H. VIK-MO, A. BRØNDBØ, D. BRATLID, P. BJARK and P.J. MOE. Neisseria meningitidis infections in Northern Norway: An epidemic in 1974-75 due mainly to group B organisms. J. INFECT. DIS. 135: 669-672 (1.977).
- BRANHAM, S.E. Serological relationship among meningococci. BACTERIOL. REV. 17: 175-188 (1.953).
- BRANHAM, S.E. Milestones in the history of the meningococcus. CAN. J. MICROBIOL. 2: 175-188 (1.956).
- BRØ-JORGENSEN, A. and T. JENSEN. Gonococcal tonsillar infections. BR. MED. J. 4: 660-661 (1.971).

- BUCHANAN, T.M. Antigenic heterogeneity of gonococcal pili. J. EXP. MED. 141: 1470-1475 (1.975).
- CASAL, J. y C. MARTIN-BOURGON. Estudio bacteriológico e inmunológico de meningococo en una población escolar. REV. SAN. HIG. PUB. 49: 179-192 (1.975).
- CATLIN, B.W. Nutritional profiles of N. gonorrhoeae, N. meningitidis and N. lactamica in chemically defined media and the use of growth requirements for gonococcal typing. J. INFECT. DIS. 128: 178-194 (1.973).
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. Meningococcal disease U.S.A. 1.970. MORB. MORT. WLY. REP. 19, nº 42, 414 (1.970).
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. Meningococcal disease U.S.A. 1.971. MORB. MORT. WLY. REP. 20, nº 41, 372 (1.971).
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. Meningococcal disease U.S.A. Annual summary 1.979. MORB. MORT. WLY. REP. 53-56 (1.979).
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. Meningococcal disease U.S.A. 1.981. MORB. MORT. WLY. REP. 30, nº 10, 113-115 (1.981).
- COOKE, C.L., D.S. OWEN, R. IRBY and E. TOONE. Gonococcal arthritis. J.A.M.A. 217: 204-205 (1.971).
- CRAVEN, D.E. and C.E. FRASCH. Pili and non pili mediated adherence of N. meningitidis and its relationship to invasive disease. In Brooks G.F., E.E. Gotschlich et al. (Ed.) Immunobiology of N. gonorrhoeae. Washington, D.C. A.S.M. 1.978.
- CREVEN, D.E., C.E. FRASCH, L.F. LaMOCCA, F.B. ROSE and R. GONZALEZ. Rapid serogroup identification of N. meningitidis by antiserum agar: Prevalence of serotypes in a disease free military population. J. CLIN. MICROBIOL. 10: 302-307. (1.979).

- CRAVEN, D.E., C.E. FRASCH, J.B. ROBBINS, H.A. FELDMAN. Serogroup identification of N. meningitidis: Comparison of an antiserum agar method with bacterial slide agglutination. J. CLIN. MICROBIOL. 7: 410-414 (1.978).
- DAVIS, C.E. and K. ARNOLD. Role of meningococcal endotoxin in meningococcal purpura. J. EXP. MED. 140: 159-171 (1.974).
- De MAEYER, S. J.M. SEBA and G. REGNIER. Epidemiology of meningococcal meningitis in Belgium. J. INFECTION 1, supp. 63-70 (1.981).
- DEVINE, L.F. and C.R. HAGERMAN. Spectra of susceptibility of N. meningitidis to antimicrobial agents in vitro. APPLIED MICROBIOL. 19: 329-334 (1.970a).
- DEVINE, L.F. and C.R. HAGERMAN. Relationship of serogroup of N. meningitidis. I. Microagglutination, gel diffusion and slide agglutination studies of meningococcal antisera before and after absorption with RAS-10 strain of meningococci. INFECT. IMMUN. 1: 226-231 (1.970b).
- DEVINE, L.F., D.P. JOHNSON, C.R. HAGERMAN, W.E. PIERCE, S.L. RHODE and R.O. PECKINPAUGH. The effect of minocycline on meningococcal nasopharyngeal carrier state in naval personnel. AMER. J. EPIDEMIOLOG. 93: 337-345 (1.971).
- De VOE, I. and J.E. GILCHRIST. Ultrastructure of pili and annular structures on the cell wall surface of Neisseria meningitidis. INFECT. IMMUN. 10: 872-876 (1.974).
- DOPTER, C.H. Etude de quelques germes isolées du rhinopharynx, voisins du méningocoque (paraméningocoques). COMP. REND. SOC. BIOL. 67: 74-76 (1.909).
- DOPTER, C.H. L'infection meningococcique. Ed. Billere-Paris (1.921).

- DOPTER, C.H. and C. PAURON. Différenciation des paraméningocoques entre eux par la saturation des agglutinins. COMPT. REND. SOC. BIOL. 77: 231-233 (1.914).
- DREW, T.M. R.ALMANT, E. BLACK and M. GOLDFIELD. Minocycline for prophylaxis of infection with N. meningitidis: high rate of side effects in recipients. J. INFECT. DIS. 133: 194-198 (1.976).
- EICKHOFF, T.C. In vitro and in vivo studies of resistance to rifampin in meningococci. J. INFECT. DIS. 123: 414-420 (1.971).
- EICKHOFF, T.C. Meningococcal prophylaxis. J.A.M.A. 234: 150-151 (1.975).
- ENGELN, F., J. VANDEPITTE, L. VERBIST, S. DeMAEYER. Effect of spiramycin on the nasopharyngeal carriage of Neisseria meningitidis. CHEMOTHERAPY 27: 325-333 (1.981).
- EVANS, A.C. The tropin reactions of antimeningococcus serum. U.S. PUB. HLTH. SER. HYG. LAB. BULL. 124: 43-87 (1.920).
- EVANS, J.R., M.S. ARTENSTEIN and D.H. HUNTER. Prevalence of meningococcal serogroups and description of three new serogroups. AMER. J. EPIDEMIOL. 87: 643-646 (1.968).
- FADON, A. Experiencia de cinco campañas de detección de portadores nasofaríngeos de meningococo (1.971-72 a 1.974-75) en relación con la última epidémica de meningitis, efectuadas en el Hospital Nacional de Enfermedades Infecciosas. REV. SAN. HIG/ PUB. 50: 507-521 (1.976).
- FADON, A. Bacteriología de las meningitis purulentas a través de 5 campañas de epidemia (70-71, 71-72, 72-73, 73-74 y 74-75). REV. SAN. HIG. PUB. 51: 325-339 (1.977).

- FAIRBROTHER, R.W. Cerebrospinal meningitis. The use of sulphonamide derivatives in prophylaxis. BRIT. MED. J. 2: 859-862 (1.940).
- FALLON, R.J. The relationship between N. meningitidis of serogroups Z'y 29E. J. MED. MICROBIOL. 9: 239-243 (1.976).
- FALLON, R.J. and E.T. ROBINSON. Meningococcal vulvovaginitis. SCAND. J. INFECT. DIS. 6: 295-296 (1.974).
- FARRIES, J.S., W. DICKSON, E. GREENWOOD, T.R. MALHOTRA, J.D. ABBOTT and D.M. JONES. Meningococcal infection in Bolton 1.971-1.974. LANCET 2: 118-121 (1.975).
- FAUR, Y.C., M.H. WEISBURD and M.E. WILSON. Isolation of N. meningitidis from the genitourinary tract and anal canal. J. CLIN. MICROBIOL. 2: 178-182 (1.975).
- FIGUEROA-EGEA, J., T. SICILIA y B. DOMINGUEZ. Nuestra experiencia en las infecciones meningocócicas. 50º Aniversario del Hospital del Rey. Escuela Nacional de Puericultura. pp. 147-160 (1.976).
- FINLEY, R.A. Prophylaxis against meningococcal disease. J.A.M.A. 236: 459-461 (1.976).
- FIUMARA, N.J., M.M. WIŚE and M. MANY. Gonorrhoeal pharyngitis. N. ENG. J. MED. 276: 1248-1250 (1.967).
- FRASCH, C.E. Role of protein serotype antigens in protection against due to N. meningitidis. J. INFECT. DIS. 136: supp. 584-590 (1.977).
- FRASCH, C.E. Non capsular surface antigens of N. meningitidis. SEM. INFECT. DIS II: 304-337 (1.979).

- FRASCH, C.E. and S.S. CHAPMAN. Classification of Neisseria meningitidis group B into distinct serotypes. I. Serological typing by a microbactericidal method. INFECT. IMMUN. 5: 98-102 (1.972a).
- FRASCH, C.E. and S.S. CHAPMAN. 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 (1.972b).
- FRASCH, C.E. and S.S. CHAPMAN. Classification of Neisseria meningitidis group B into distinct serotypes. IV. Preliminary chemical studies on the nature of the serotype antigens. INFECT. IMMUN. 6: 674-681 (1.972c).
- FRASCH, C.E. and S.S. CHAPMAN. Classification of Neisseria meningitidis group B into distinct serotypes. III. Application of a new bactericidal inhibition technique to distribution of serotypes among cases and carriers. J. INFECT. DIS. 127: 149-154. (1.973).
- FRASCH, C.E. and G.L. FRIEDMAN. Identification d'un serotype meningococique associe a la maladie et rompon aux meningococques des groups B, C, Y, et W135. MED. TROP. Marseille 37: 155-159 (1.977).
- FRASCH, C.E. and E.C. GOTSCHLICH. An outer membrane protein of N. meningitidis group B responsible for serotype specificity. J. EXP. MED. 140: 87-104 (1.974).
- FRASCH, C.E. and L.F. LaMOCCA. Heat-modifiable outer membrane proteins of N. meningitidis and their organization within the membrane. J. BACTERIOL. 136: 1127-1134 (1.978).

- FRASCH, C.E. and L.F. LaMOCCA. Determinación del serogrupo y del serogrupo y del serotipo en los grupos epidemiológicos de la enfermedad meningocócica. LABORATORIO (Granada) 71,425: 437-454 (1.981).
- FRASCH, C.E., R.M. McNELIS and E.C. GOTSCHLICH. Strain-specific variation in the protein and lipopolysaccharide composition of the group B meningococcal outer membrane. J. BACTERIOL. 127: 973-981 (1.976).
- FRASCH, C.E., L. PARKES, R.M. McNELIS and E.C. GOTSCHLICH. Protection against group B meningococcal disease. I. Comparison of group-specific and type-specific protection in the chick embryo model. J. EXP. MED. 144: 319-329 (1.976).
- FRASCH, C.E. and J.D. ROBBINS. Protection against group B meningococcal disease. II. Infection and resulting immunity in a guinea pig model. J. EXP. MED. 147: 519-528 (1.978a).
- FRASCH, C.E. and J.D. ROBBINS. Protection against group B meningococcal disease. III. Immunogenicity of serotype 2 vaccines and specificity of protection in a guinea pig model. J. EXP. MED. 147: 629-644 (1.978b).
- GOLD, R. Immunogenicity of meningococcal polysaccharides in man. En: Rudbach and Baker (Ed.) Immunology of bacterial polysaccharides. pp. 121-156. DEVELOP. IMMUNOL. 2 (1.979).
- GOLD, R. and M.S. ARTENSTEIN. Meningococcal infections. II. Field trial of group C meningococcal polysaccharide vaccine in 1.969-70. BULL. W.H.O. 45: 279-282 (1.971).
- GOLD, R., I. GOLDSCHNEIDER, M.L. LEPOW, T.F. DRAPER and M. RANDOLPH. Carriage of *N. meningitidis* and *N. lactamica* in infants and children. J. INFECT. DIS. 137: 112-121 (1.978).

- GOLD, R., M.L. LEPOW, I. GOLDSCHNEIDER and E.C. GOTCHLICH.
Immune response of human infants to polysaccharide vaccines of group A and group C Neisseria meningitidis. J. INFECT. DIS. 136, supp.: 31-35 (1.977).
- GOLD, R., J.L. WINKLEHAKE, R.S. MARS and M.S. ARTENSTEIN.
Identification of an epidemic strain of group C Neisseria meningitidis by bactericidal serotyping. J. INFECT. DIS. 124: 593-597 (1.971).
- GOLD, R. and F.A. WYLE. New classification of N. meningitidis by means of bactericidal reactions. INFECT. IMMUN. 1: 479-484 (1.970).
- GOLDRACRE, M.J. and D.L. MILLER. Completeness of statutory notification for acute bacterial meningitis. BRIT. MED. J. 2: 501-503 (1.976).
- GOLDSCHNEIDER, I., E.C. GOTCHLICH and M.S. ARTENSTEIN. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. J. EXP. MED. 129: 1307-1326 (1.969a).
- GOLDSCHNEIDER, I., E.C. GOTCHLICH and M.S. ARTENSTEIN. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. J. EXP. MED. 129: 1327-1348 (1.969b).
- GOLDSCHNEIDER, I., M.L. LEPOW, E.C. GOTCHLICH, T.T. MAUNK, F. BACHL and M. RANDOLPH. Immunogenicity of group A and C meningococcal polysaccharides in human infants. J. INFECT. DIS. 128: 769-776 (1.973).
- GOTCHLICH, E.C., R. AUSTRIAN, B. CVJETANOVIC and J.B. ROBBINS.
Prospects for the prevention of bactericidal meningitis with polysaccharide vaccines. BULL. W.H.O. 56: 509-518 (1.978).

- GOTSCHLICH, E.C., I. GOLDSCHNEIDER and M.S. ARTENSTEIN. Human immunity to the meningococcus. IV. Immunogenicity of group A and C meningococcal polysaccharides in human volunteers. J. EXP. MED. 129: 1367-1384 (1.969).
- GOTSCHLICH, E.C., T.Y. LIU and M.S. ARTENSTEIN. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. J. EXP. MED. 129: 1349-1365 (1.969).
- GRANATO, P.A., R. HOWARD, B. WILKINSON and J. LASER. Meningitis caused by maltose negative variant of N. meningitidis. J. CLIN. MICROBIOL. 11: 270-273 (1.980).
- GREENWOOD, B.M., M. HASSAN-KING, H.C. WHITTLE. Prevention of secondary cases of meningococcal disease in household contacts by vaccination. BRIT. MED. J. 1: 1317-1319 (1.978).
- GUTTLER, R.B., G.W. COUNTS, C.K. AVENT and H.N. BEATY. Effect of rifampin and minocycline on meningococcal carrier rates. J. INFECT. DIS. 124: 199-205 (1.971).
- HANKINS, W.A., J.M. GWALTNEY, J. OWEN HENDLEY, J.D. FARQUHAR and J.S. SAMUELSON. Clinical and serological evaluation of a meningococcal polysaccharide vaccine groups A, C, Y and W135. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED. 169: 54-57 (1.982).
- HILL, J.C. and E. WEISS. Protein fraction with immunogenic potential and low toxicity isolated from the cell wall of N. meningitidis group B. INFECT. IMMUN. 10: 605-615 (1.974).
- HIRSCH, A. Handbook of geographical and historical pathology. TRANS. NEW. SYDENHAM SOC. Vol 3 pag. 547. LONDON.
- HOLBEIN, B.E. Enhancement of N. meningitidis infection in mice by addition of iron bound to transferrin. INFECT. IMMUN. 34: 120-125 (1.981).

- HOLLIS, D.G., G.L. WIGGINS and J.H. SCHUBERT. Serological studies of ungroupable N. meningitidis. J. BACTERIOL. 95: 1-4 (1.968).
- HOLLIS, D.G., G.L. WIGGINS and R.E. WEAVER. Neisseria lactamicus sp. n. a lactose fermenting species resembling Neisseria meningitidis. APP. MICROBIOL. 17: 71-77 (1.969).
- HOLLIS, D.G., G.L. WIGGINS, R.E. WEAVER and J.H. SCHUBERT. Current status of lactose fermenting Neisseria. ANN. N.Y. ACAD. SCI. 174: 444-449 (1.970).
- HOLMES, K.K., P.J. WIESNER and A.H.B. PEDERSEN. The gonococcal arthritis-dermatitis syndrome. ANN. INTERN. MED. 75: 470-471 (1.971).
- HOLTEN, E. Serotypes of N. meningitidis isolated from patients in Norway during the first six months of 1.978. J. CLIN. MICROBIOL. 9: 186-188 (1.979).
- JACOBSON, J.A., P.A. MOREIRA, J. TEUBNER FERREIRA and J.B. McCORNICK. The risk of meningitis among classroom contacts during an epidemic of meningococcal disease. AMER. J. EPIDEMIOLOG. 104: 552-555 (1.976).
- JACOBSON, J.A., T.J. CHESTER and D.W. FRASER. An epidemic of disease due to serogroup B N. meningitidis in Alabama: Report of an investigation and community wide prophylaxis with a sulphonamide. J. INFECT. DIS. 136: 104-107 (1.977).
- JACOBSON, J.A., R.E. WEAVER and C. THORNSBERRY. Trends in meningococcal in meningococcal disease, 1.974. J. INFECT. DIS. 132: 480-484 (1.975).

- JONES, D.M. and J.D. ABBOTT. Serotypes of group B meningococci in England and Wales 1.978-1.980: A chaining pattern. En W.H.O. Fourth International Conference on Immunity and Immunization in Cerebrospinal Meningitis (Abstract) Siena, Italia. (1.981).
- JONES, D.M. and B.M. TOBIN. Serotypes of group B meningococci. J. CLIN. PATHOL. 29: 746-748 (1.976).
- KABAT, E.A. H. KAISER and H. SIKORSKI. Preparation of the type specific polysaccharide of the type I meningococcus and a study of its effectiveness as an antigen in human beings. J. EXP. MED. 80: 299-307 (1.945).
- KASPER, D.L., J.L. WINKELHAKE, B.L. BRANDT and M.S. ARTENSTEIN. Antigenic specificity of bactericidal antibodies in antisera to N. meningitidis. J. INFECT. DIS. 127: 378-387 (1.973).
- KINGSBURY, D.T. Relationship between sulfadiazine resistance and the failure to ferment maltose in N. meningitidis. J. BACT. 94: 557-561 (1.967).
- KUHNS, D.M., C.T. NELSON, H.A. FELDMAN and L.R. KUHNS. The prophylactic value of sulphadiazine in the control of meningococcal meningitis. J.A.M.A. 123: 335 (1.943).
- KUZEMENSKA, P., V. BURIAN, C.E. FRASCH y E. SVANDOVA. A comparison of the serum agar grouping and slide agglutination methods for the identification of N. meningitidis strains. BULL. W.H.O. 55: 659-661 (1.977).
- LaPEYSSONNIE, L. La méningite cérébrospinal en Afrique. BULL. W.H.O. 28, supp. 1-114 (1.963).
- LaPEYSSONNIE, L. Las meningitisi por meningococos. Un pasado claro un futuro incierto. LABORATORIO (Granada) 71,425:377-406 (1.981).

- LAUER, B.A. and C.E. FISHER. N. lactamica meningitis. AMER. J. DIS. CHILD. 130: 198-199 (1.976).
- LEHMANN, V. and C.O. SOLBERG. Group B meningococcal opsonins in serum measured by polymorphonuclear leucocyte chemiluminescence. ACTA PATH. MICROBIOL. SCAND. Sec. C. 88: 227-231 (1.980).
- LEWIS, J.F. and J.J. ALEXANDER. Isolation of N. meningitidis from the vagina and cervix. AMER. J. CLIN. PATHOL. 61: 216-217 (1.974).
- LYSTAD, A. Principles and practice of control of meningococcal disease in Norway. NIPH ANNALS 3: 103-107 (1.980).
- MAKELA, P.H., H. PELTOLA, H. KAYHTY, H. JOUSIMIES, O. PETTAY, E. RUOSSLAHTI, A. SIVONEN, O.V. RENKONEN. Polysaccharide vaccines of group A N. meningitidis and H. influenzae type b, A field trial in Finland. J. INFECT.DIS. 136. supp: 43-50 (1.977).
- MAKELA, P.H. H. PELTOLA, H. KAYHTY, H. JOUSIMIES, and A. SIVONEN. Use of group A meningococcal polysaccharide vaccine to combat an epidemic in Finland 1.974-76. 2nd. International Conference on Immunity and Immunization in Cerebrospinal Meningitis (1.977) Málaga, España.
- MANDRELL, R.E. and W.D. ZOLLINGER. Lipopolysaccharide, serotyping of N. meningitidis by haemagglutination inhibition. INFECT. IMMUN. 16: 471-475 (1.977)
- MARKS, M.I., C.E. FRASCH and R.M. SHAPERA. Meningococcal colonization and infection in children and their household contacts. AMER. J. EPIDEMIOLOG. 109: 563-571 (1.979).

- McCORMICK, J., R.E. WEAVER, C. THORNSBERRY and R.A. FELDMAN.
Trends in disease caused by Neisseria meningitidis. Informe C.D.C.(1.978).
- MELTON III, L.J., E.A. EDWARDS and L.F. DEVINE. Differences between sexes in the nasopharyngeal carriage of N. meningitidis AMER. J. EPIDEMIOLOG. 106: 215-221 (1.977).
- MENENDEZ, M., C. CINTADO and P. MACIAS. Chimioprofilaxie des affections méningococcales par la minocycline. Effects secondaires observés chez l'enfant. MED. MAL. INFECT. 10: 212-216 (1.980).
- MENINGOCOCCAL DISEASE SURVEILLANCE GROUP. 1.974. Meningococcal disease. Secondary attack rate and chemoprophylaxis in the United States, 1.974. J.A.M.A. 235: 261-265 (1.976).
- MENINGOCOCCAL DISEASE SURVEILLANCE GROUP. Analysis of endemic meningococcal disease by serogroup and evaluation of chemoprophylaxis. J. INFECT. DIS. 134: 201-204 (1.976).
- MEZQUITA LOPEZ, M. Meningitis meningocócica. Información epidemiológica. Dirección General de Sanidad. pag. 37-43. (1.973).
- MILLAR, J.V., E.E. SIESS, H.A. FELDMAN, C. SILVERMAN and P. FRANK. In vivo and in vitro resistance to sulphadiazine in strains of N. meningitidis. J.A.M.A. 186: 139-141 (1.963).
- MINISTERIO DE SANIDAD Y SEGURIDAD SOCIAL. Estudio de resistencias de cepas de meningococo aislados en nuestro país, a sulfadiazina, penicilina, ampicilina y rifampicina. BOL. EPIDEM. SEM. nº 1.342 (1.978).
- MINISTERIO DE SANIDAD Y SEGURIDAD SOCIAL. Infección meningocócica en 1.980. Comentario epidemiológico. BOL. EPIDEM. SEM. nº 1.468 (1.980).

- MINISTERIO DE SANIDAD Y SEGURIDAD SOCIAL. Recomendaciones sobre acciones sanitarias preventivas frente a la meningitis meningocócica. BOL. EPIDEM. SEM. nº 1.417 (1.980).
- MINISTERIO DE SANIDAD Y SEGURIDAD SOCIAL. Meningitis meningocócica, 1.979. BOL. EPIDEM. SEM. nº 1.416 (1.980).
- MITCHELL, M.S., D.L. RHODEN and E.O. KING. Lactose fermenting organisms resembling N. meningitidis. J. BACTERIOL. 90: 560 (1.965).
- MORELLO, J.A. and M. BOHNHOFF. Neisseria and Branhamella. In E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler and J.P. Truant. (Eds.) pp. 111-130. Manual of Clinical Microbiology 3rd. ED. A.S.M. Washington D.C. 1.980.
- MULKS, M.H. and A.G. PLANT. IgA protease production as a characteristic distinguishing pathogenic from harmless Neisseriaceae NEW. ENGL. J. MED. 299: 973 (1.978).
- MUNFORD, R.S., A.E. TANNAY, J. SOUZA DE MORAIS, D.W. FRASER and R.A. FELDMAN. Spread of meningococcal infection within households. LANCET i: 1275-1278 (1.974).
- MUNFORD, R.S., C.M. PATTON and G.W. GORMAN. Epidemiologic studies of serotype antigens common to group B and C N. meningitidis. J. INFECT. DIS. 134: 286-290 (1.975).
- MUNFORD, R.S., Z.J.S. VASCONCELOS de, C.J. PHILIPS, D.S. GELLI, G.W. GORMAN, J.B. RISI and R.A. FELDMAN. Erradication of carriage of N. meningitidis in families: a study in Brazil. J. INFECT. DIS. 129: 644-649 (1.974).
- NOAH, N.D. Epidemicity of meningococcal meningitis in England and Wales: A review. J. INFECTION 1: 205-209 (1.979).

- NOVOTNY, P. and W.H. TURNER. Immunological heterogeneity of pili of N. gonorrhoeae. J. GEN. MICROBIOL. 89: 87-92 (1.975).
- PAYNE, S.M. and R.A. FRIKELSTEIN. The critical role of iron in host-bacterial interactions. J. CLIN. INVEST. 61: 1428-1440 (1.978).
- PEREZ TRALLERO, E., E. PEREZ YARZA, C. RUIZ BENITO y I. MUÑOZ BAROJA. Profilaxis meningocócica. MED. CLIN. (Barcelona) 73: 367-370 (1.979).
- PIZZI, M.A. A severe epidemic of meningococcus meningitis in Chile 1.941-42. AMER. J. PUB. HEALTH 34: 231-238 (1.944).
- PUNSALANG, A.P. and W.D. SAWYER. Role of pili in the virulence of N. gonorrhoeae. INFECT. IMMUN. 8: 255-266 (1.973).
- RAPPORT D'ACTIVITE POUR L'ANNEE 1979. Centre Colaborateur O.M.S. de Reference et de Recherche pour les meningocoques. Marseille. France. (1.979).
- RAPPORT D'ACTIVITE POUR L'ANNEE 1981. Centre Colaborateur O.M.S. de Reference et de Recherche pour les meningocoques. Marseilla. France. (1.981).
- REYN, A. Neisseria. En R.E. Buchanan and N.E. Gibbons. Ed. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 8 th. Ed. pag. 428-432. Williams and Wilkins / Baltimore. 1.974.
- ROBERTS, R.B. The interaction in vitro between group B meningococci and rabbit polymorphonuclear leukocytes. J. EXP. MED. 126: 795-818 (1.967).
- ROBERTS, R.B. The relationship between group A and group C meningococcal polysaccharide an serum opsonins in man. J. EXP. MED. 131: 499-513 (1.970).

- RODRIGUEZ-CONTRERAS, R., J. FERNANDEZ-CREHUET, M. ROSALES,
J.A. PEREZ LOPEZ, M. C. MAROTO VELA y G. PIEDROLA ANGULO.
Estudio de portadores de N. meningitidis en la población
infantil granadina. LABORATORIO (Granada) 71, nº 425: 483-
502 (1.981).
- SAEZ NIETO, J.A., F. CATALA, A. LLACER, A. FENOLL y J. CASAL.
Análisis de la onda epidémica de infección meningocócica
en España (1.978-1.981). Libro de Resúmenes. VIII Congre-
so Nacional de Microbiología (Madrid)(1.981).
- SAYEED, Z.A., V. BHADURY, E. HOWELL and H.L. MEYERS. Gonococcal
meningitis. J.A.M.A. 219: 1730-31 (1.972).
- SHERP, H.W. and G. RAKE. Studies on meningococcus infection.
VIII. The type I specific substance. J. EXP. MED. 61: 753-
759 (1.935).
- SCHMID, A.W. and A.L.A. GALVAO. Alguns aspectos epidemiologicos
da meningite meningocócica no municipio de Sao Paulo. ARQ.
HIG. SAUDE PUBLICA 26: 15-39 (1.961).
- SERRE-BOISSEAU, F. La méningite a méningocoques en France de
1.968 à 1.972. BULL. W.H.O. 48: 675-683 (1.973).
- SHAHIDULLAH, M. Pharyngeal gonorrhoea in homosexual males. BR.
J. VENER. DIS. 52: 449-469 (1.976).
- SILVA-GEDES, J. da. Results observed during the vaccination
compaign against meningococcal meningitis. 2nd. International
Conference on Immunity and Immunization in Cerebrospinal
Meningitis. Málaga. España. (1.977).
- SILVERTHORE, N. and D.T. FRASER. Observation on the action of
human and animal blood on the meningococcus. J. IMMUNOL.
29: 523-530 (1.935).

- SLATERUS, K.W. Serological typing of meningococci by means of micro-precipitation. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK 27: 305-315 (1.961).
- SLATERUS, K.W., A. CHARLOTTE RUYS and J.S. SIEBERG. Types of meningococci isolated from carriers and patients in a non-specific period in the Netherlands. ANTONIE VAN LEEUWENHOEK 29: 265-271 (1.963).
- SOUZA DE MORAIS, J., R.S. MUNFORD, J.BAP-RISI, E. ANTEZANA and R.A. FELDMAN. Epidemic disease due to serogroup C N. meningitidis in Sao Paulo, Brazil. J. INFECT. DIS. 129: 568-71 (1.974).
- THAYER, J.D. and J.E. MARTIN. Improved medium selective for cultivation of N. gonorrhoeae and N. meningitidis. PUB. HLT. REP. 81: 559-562 (1.966).
- VARNGHESE, P. and S. ACRES. Meningococcal meningitis. CANADA DIS. WKLY. REP. pag. 243-248 (1.980).
- VEDROS, N.A. Serology of meningococcus. En Methods in Microbiology 10: 293-314. Academic Press, N.Y. (1.978).
- VEDROS, N.A. Clasificación de los géneros Neisseria y Branhamella con dedicación especial a la serología del meningococo. LABORATORIO (Granada) 71, 425: 407-415 (1.981).
- VEDROS, N.A., J. NG. and G. CULVER. A new serological group E of Neisseria meningitidis. J. BACTERIOL. 95: 1300-1304 (1.968).
- VIEUSSEUX, J. Mémoire sur la maladie qui a régné à Genève au printemps de 1.805. J. MED. CHIR. PHARMA. 11:163-182 (1.806).

WAHDAN, M.H., F. RIZK, A.M. EL AKKAD, A.A. EL GHOROUSY, R. HABLAS, N.I. GIRGIS, A. AMER, W. BOCTAR, J.E. SIPPEL, E.C. GOTSCHLICH, R. TRIAU, W.R. SAVBORN and B. CVJETANOVIC. A controlled field trial of a serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine. BULL. W.H.O. 48: 667-673 (1.973).

WAHDAN, M. H., S.A. SALLAM, M.N. HASSAN, A.A. GAWAD, A.S. RAKNA, J.E. SIPPEL, R. HABLAS, W.R. SAVBORN, N.M. KASSEM, S.M. RIAD and B. CVJETANOVIC. A second controlled field trial of a serogroup A meningococcal polysaccharide vaccine in Alexandria. BULL. W.H.O. 55: 645-651 (1.977).

WALS, P. de, L. HERTOGHE, J. BORLEE-GRIMEE, S. deMAEYER, G. REGNISTER, A. DACHY, A. BOUCKAERT and M.F. LECHAT. Meningococcal disease in Belgium. Secondary attack rate among household, day care nursery and pre-elementary school contact. J. INFEC. 3, supp:1:53-61 (1.981).

WATSON, R.G. and H.W. SCHERP. The specific haptens of group C (group IIalpha) meningococcus. I. Preparation and immunological behavior. J. IMMUNOL. 81: 331-337 (1.958).

WEBER, K. and M. OSBORN. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. BIOL. CHEM. 244: 4406-4412 (1.969).

WEICHSELHAUM, A. Ueber die aetiologie der akuten meningitis cerebrospinalis. FORSCH. MED. 5: 573-583 (1.887)

WEIDMER, C.E., T.B. DUNKEL, F.S. PETTYJOHN, C.D. SMITH and A. LEIBOVITZ. Effectiveness of rifampin in erradicating the meningococcal carrier state in a relatively closed population emergence of resistant strains. J. INFECT. DIS. 124: 172-178 (1.971).

WENZEL, R.P., J.A. DAVIS, J.R. MITZEL and W.E. BEAM Jr. Non-usefulness of meningococcal carrier rates. LANCET ii: 205 (1.973).

- W.H.O. Meningococcal meningitis. Belgium. WKLY. EPIDEM. REC. n° 25 (1.971).
- W.H.O. Meningitis. Argentina. WKLY. EPIDEM. REC. n° 17 (1.975).
- W.H.O. Meningococcal infections in Scotland. 1.974. WKLY. EPIDEM. REC. n° 16 (1.975).
- W.H.O. Meningococcal infections. United Kingdom. WKLY. EPIDEM. REC. n° 23 (1.974).
- W.H.O. Meningococcal infections in Scotland, 1.975. WKLY. EPIDEM. REC. n° 34 (1.976).
- W.H.O. Meningococcal meningitis, Belgium. WKLY. EPIDEM. REC. n° 43. (1.976).
- W.H.O. Meningococcal meningitis, Belgium. WKLY. EPIDEM. REC. n° 48 (1.977).
- W.H.O. Meningococcal disease surveillance. WKLY. EPIDEM. REC. n° 26 (1.978).
- W.H.O. Meningococcal disease surveillance. United Kingdom. WKLY. EPIDEM. REC. n° 35 (1.978).
- W.H.O. Surveillance of meningococcal infections. France. WKLY. EPIDEM. REC. n° 49 (1.979).
- W.H.O. Surveillance of meningococcal meningitis. France. WKLY. EPIDEM. REC. n° 29 (1.981).
- W.H.O. Meningococcal disease surveillance. England. WKLY. EPIDEM. REC. n° 26 (1.980).
- W.H.O. Meningococcal disease surveillance. Norway. WKLY. EPIDEM. REC. n° 30 (1.981).

WILSON, J.F. A serological study of the meningococcus. J. PATH. BACTERIOL. 72: 111-119 (1.956).

WILSON, H.D. and T.L. OVERMAN. Septicemia due to N. lactamica. J. CLIN. MICROBIOL. 4: 274-275 (1.976).

WYLE, F.A., M.S. ARTENSTEIN, B.L. BRANDT, E.C. TRAMONT, D.L. KASPER, P.L. ALTIERI, S.L. BERNAM and J. P. LOWENTAL. Immunologic response of man to group B meningococcal polysaccharide vaccines. J. INFECT. DIS. 126: 514-522 (1.972).

ZIMMERMAN, T.S. and H.J. MULLER-EBERHARD. Blood coagulation initiation by a complement mediated pathway. J. EXP. MED. 134: 1601-1606 (1.971).

ZOLLINGER, W.D. and R.E. MANDRELL. Outer membrane protein and lipopolysaccharide serotyping of N. meningitidis by inhibition of a solid-phase radioimmunoassay. INFECT. IMMUN. 18: 424-433 (1.977).

ZOLLINGER, W.D. and R.E. MANDRELL. Type-specific antigens of group A N. meningitidis: Lipopolysaccharide and heat modifiable outer membrane protein. INFECT. IMMUN. 28: 451-458 (1.980).

ZOLLINGER, W.D., C.L. PENNINGTON and M.S. ARTENSTEIN. Human antibody response to three meningococcal outer membrane antigens: Comparison by specific haemagglutination assays. INFECT. IMMUN. 10: 975-984 (1.974).

ZHAO-QUING, D., Ye REN BANG and Z. HUAN CHUN. Three new serogroups of Neisseria meningitidis. J. BIOL. STAND. 9: 307-315 (1.981).

