

NOTA TÉCNICA

Identificación de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* por reacción en cadena de la polimerasa

Eliana Parra, Elizabeth Castañeda, Jaime Moreno

Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D. C., Colombia

Introducción. *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* son los principales patógenos humanos causantes de meningitis.

Objetivo. Se evaluaron los iniciadores *omp2*, *lytA* y *crgA* en el desarrollo de una reacción en cadena de la polimerasa múltiple, para la identificación simultánea de los tres principales microorganismos responsables de la meningitis bacteriana.

Materiales y métodos. Se evaluaron en un formato de PCR múltiple los iniciadores para la proteína de membrana externa (*omp2*, 1.000 pb) de *H. influenzae*, la autolisina A (*LytA*, 395 pb) de *S. pneumoniae* y el gen regulador de contacto A (*crgA*, 230 pb) de *N. meningitidis* y se determinó la sensibilidad y la especificidad de la técnica.

Resultados. Se obtuvieron resultados reproducibles con una concentración de 50 nM de cada uno de los tres iniciadores y una temperatura de anillamiento de 57°C obteniendo una sensibilidad de 12,5 fg para *H. influenzae* y *S. pneumoniae* y de 3,12 fg para *N. meningitidis*. No se presentaron reacciones cruzadas con otros microorganismos causantes de meningitis o relacionados con los géneros.

Conclusión. Los resultados de sensibilidad y especificidad sugieren que los iniciadores evaluados pueden ser utilizados para el desarrollo de una PCR en formato múltiple que permita la identificación de los tres principales patógenos causantes de meningitis.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, reacción en cadena de la polimerasa, meningitis bacteriana.

Identification of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* by polymerase chain reaction

Introduction: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* are the main human pathogens that cause meningitis.

Objective: Primers *omp2*, *lytA* and *crgA* were evaluated with *H. influenzae*, *S. pneumoniae* and *N. meningitidis* DNA in a multiplex PCR, determining the sensitivity and the specificity of the technique.

Materials and methods: Primers for *H. influenzae* outer membrane protein (*omp2*, 1000 pb), *S. pneumoniae* autolysin (*lytA*, 395 pb) and *N. meningitidis*, contact regulated gene (*crgA*, 230 pb) were evaluated in a multiplex PCR, determining the sensitivity and the specificity of the technique.

Results: Reproducible results were obtained with 50 nM of each of the three primers and annealing temperature of 57°C in the multiplex PCR, obtaining a sensitivity of 12.5 fg for *H. influenzae* and *S. pneumoniae* and 3.12 fg for *N. meningitidis*. No cross reactions with other microorganisms agents of meningitis or related with the genera, appeared.

Conclusions: The results for sensitivity and specificity suggest that the evaluated primers can be used for the development of a PCR in a multiplex format to the identification of the three main pathogens that cause meningitis.

Key words: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, polymerase chain reaction, bacterial, meningitis.

La meningitis bacteriana es una enfermedad infecciosa del sistema nervioso central que se presenta como una inflamación de las meninges en respuesta a la presencia de bacterias (1). Es causada, principalmente, por *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis*. Anualmente se presentan en el mundo más de un millón de casos de meningitis por estos tres microorganismos, que pueden dejar secuelas como sordera y retardo mental, o causar la muerte, afectando a pacientes tanto de países desarrollados como en desarrollo, de forma endémica o epidémica, por lo que representa un grave problema de salud pública (2).

Más de 90% de los casos de meningitis ocasionada por *H. influenzae* serotipo b ocurren en niños menores de cinco años, con la máxima incidencia entre los 6 y 12 meses (3,4). Los casos de meningitis ocasionados por *S. pneumoniae* afectan principalmente a la población infantil menor de cinco años (5) y a adultos de edad avanzada (6) y *N. meningitidis* afecta a niños y jóvenes, en lugares donde ocurren hacinamientos, como los dormitorios escolares o los cuarteles militares (7,8).

En Colombia, la meningitis bacteriana por estos tres patógenos es de vigilancia obligatoria; los casos son reportados al SIVIGILA y los aislamientos recuperados deben ser enviados al Instituto Nacional de Salud (INS) para su confirmación y estudios complementarios. Para el primer periodo de 2006 se reportaron 79 casos por *N. meningitidis*, 47 por *S. pneumoniae* y 26 por *H. influenzae* serotipo b (comunicación personal, SIVIGILA, noviembre 23 de 2006). Sin embargo, muchos de los casos de meningitis bacteriana que ocurren en el país no son reportados.

Las metodologías utilizadas para el diagnóstico de la meningitis bacteriana están basadas en el examen directo del líquido cefalorraquídeo coloreado con Gram, el cultivo y la detección

antigénica por aglutinación de partículas de látex o coagulación (9,10). El tratamiento previo con antibióticos, la baja concentración de bacterias en el líquido cefalorraquídeo y, la recolección, el transporte y el procesamiento inadecuados de las muestras, disminuyen la sensibilidad de estas metodologías porque generan resultados falsos negativos (8,11,12).

La detección de los agentes infecciosos, mediante la amplificación de diferentes genes bacterianos específicos por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha adquirido durante los últimos años gran importancia para el diagnóstico de la meningitis bacteriana, debido a que se pueden obtener resultados en menor tiempo, con buenas sensibilidad y especificidad (13).

En el presente estudio se evaluaron los iniciadores omp2, lytA y crgA descritos previamente en la literatura, en el desarrollo de una prueba de PCR múltiple, para la identificación de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*, como una primera fase en el desarrollo de una técnica molecular útil en el diagnóstico clínico de la meningitis bacteriana.

Materiales y métodos

Aislamientos

Para la estandarización de la PCR múltiple se utilizaron los aislamientos consignados en el cuadro 1, los cuales pertenecen al cepario del Grupo de Microbiología del INS y se encontraban almacenados en leche descremada al 20% a -70°C.

Extracción de ADN

Los aislamientos se cultivaron en los medios apropiados para su crecimiento y se realizó la extracción del ADN siguiendo la metodología descrita por Pitcher et al. (14). Finalmente, se trabajó utilizando el ADN de los microorganismos a una concentración de 200 ng/μl.

Iniciadores

Para el desarrollo de la técnica molecular de PCR en formato múltiple se utilizaron los iniciadores omp2, lytA y crgA. El iniciador omp2 (outer membrane protein), descrito por Forbes et al. (15), amplifica una secuencia que codifica para una

Correspondencia:

Jaime Moreno, Grupo de Microbiología, INS, Avenida calle 26 No. 51-20, zona 6 CAN, Bogotá, D. C., Colombia.
Teléfono: (+571) 220 7700; fax: (+571) 220 0901

Recibido: 19/12/06; aceptado: 11/05/07

Cuadro 1. Microorganismos utilizados en este estudio.

Microorganismos	Código del cepario INS
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Spn 132 - ATCC 49619
<i>Streptococcus bovis</i>	St. bo 7
<i>Streptococcus mitis</i>	St. vi 16
<i>Streptococcus pyogenes</i>	St. A 4
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Stap.e 1- ATCC 12228
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stap. A 1- ATCC 25923
<i>Haemophilus influenzae</i>	H.inf 1 - ATCC 49247
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	H.par 1 - ATCC 49146
<i>Neisseria meningitidis</i>	N.m 598
<i>Neisseria lactamica</i>	N.l 4 - ATCC 49147
<i>Neisseria subflava</i>	N.s 5
<i>Listeria monocytogenes</i>	Lm 104
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kp 34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ps. A 44
<i>Escherichia coli</i>	Esc 582
<i>Enterococcus faecalis</i>	Ent.fe 1 - ATCC 29212
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H0058-I-2370

proteína externa de membrana de *H. influenzae* y genera un producto de amplificación de 1.000 pb. El iniciador *lytA*, descrito por Messmer *et al.* (16), amplifica la región que codifica para la autolisina (*lytA*) en *S. pneumoniae* y genera un producto de amplificación de 395 pb. Finalmente, el iniciador *crgA* (contact-regulated gene A), descrito por Taha (17), amplifica la secuencia del gen A regulador de contacto que codifica para una proteína involucrada en la adhesión de *N. meningitidis* a las células blanco y genera un producto de 230 pb.

El análisis bioinformático de los iniciadores se realizó con los programas BLAST (18) y los programas de diseño de iniciadores PrimerSelect (19) y FastPCR (20).

Diseño de la PCR

Las concentraciones de los reactivos y las condiciones del termociclador en la PCR múltiple se determinaron teniendo en cuenta el tamaño y la intensidad de las bandas correspondientes a cada uno de los microorganismos. Se realizó un gradiente de concentración de los iniciadores de 25 a 200 ng/μl. La concentración de cloruro de magnesio (MgCl₂) se determinó evaluando concentraciones de 1 a 4 nM y la temperatura óptima de anillamiento con un gradiente de 55°C a 65°C.

La amplificación se realizó en un termociclador PTC 100 (MJ Research, Watertown, MA, USA);

los productos obtenidos y el marcador de peso molecular de 50 pb (Promega) se corrieron por electroforesis convencional en geles de agarosa (Ultra pure, Invitrogen) al 1,5 % con bromuro de etidio (0,4 μg/ml), a 100 voltios por una hora, se observaron con un transiluminador de luz UV y se fotografiaron con una cámara Polaroid.

Sensibilidad y especificidad de la PCR múltiple

La sensibilidad de la técnica se determinó por diluciones seriadas del ADN de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* partiendo de una concentración de 200 ng, hasta la menor concentración en la que se obtuvo banda de amplificación. La especificidad se realizó con extractos de ADN de microorganismos relacionados con el género o causantes de meningitis (cuadro 1).

Aspectos éticos

El estudio se realizó con aislamientos provenientes del banco de cepas del Grupo de Microbiología del INS. No se utilizaron muestras clínicas, por lo cual no existió intervención alguna con pacientes.

Resultados

El análisis bioinformático de las secuencias indicó que los iniciadores presentaron alineamientos con los respectivos microorganismos blanco, y no se

obtuvieron reacciones cruzadas. Las temperaturas de anillamiento de los iniciadores variaron de 51,8°C a 66,8°C (promedio de 57,8°C) y los porcentajes de guanina (G):citosina (C) estuvieron entre 42,9% y 62,5%, siendo mayor para *crgA*. Todos los iniciadores presentaron formación de autodímeros y dímeros con deltas de energía entre -8,2 y -1,0 kc/mol. Los datos obtenidos in silico demostraron que los tres iniciadores podían ser utilizados en una reacción múltiple.

Las concentraciones de los reactivos para obtener la amplificación de los tres iniciadores fueron: solución tampón 1X, dNTP 200 nM, Taq polimerasa 2 unidades, 50 nM para cada uno de los iniciadores y 2 nM de $MgCl_2$ en un volumen final de reacción de 25 μ l. Las condiciones del termociclador constaron de un ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 94°C por 1 minuto, 57°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, con un ciclo final de 75°C por 5 minutos.

Como resultado de la amplificación, se observaron tres bandas intensas en el control positivo, el cual contenía ADN de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*, y se obtuvieron las bandas correspondientes para cada uno de los tres patógenos (figura 1).

La concentración mínima del ADN que se detectó con la técnica fue de 12,5 fg para *H. influenzae* y *S. pneumoniae* y de 3,12 fg para *N. meningitidis*. Según el equivalente genómico para cada bacteria, estas cantidades corresponden a 5,6, 5,0 y 1,3 UFC, respectivamente. No se observaron productos de amplificación cuando se realizó la PCR múltiple con ADN de microorganismos diferentes a los tres mencionados (no se muestran datos).

Establecidas las condiciones de la PCR múltiple, se realizaron cinco réplicas con los controles positivos en diferentes días y preparando nuevos controles con ADN, obteniendo resultados reproducibles de la amplificación de cada una de las bandas.

Discusión

Durante los últimos años se han desarrollado técnicas de detección de microorganismos basados en la amplificación de los ácido nucleicos, en especial la PCR, con la cual se pueden detectar de una forma rápida y precisa microorganismos de difícil crecimiento por sus necesidades nutricionales (13).

En el diagnóstico de la meningitis bacteriana se han desarrollado varios protocolos de PCR, en

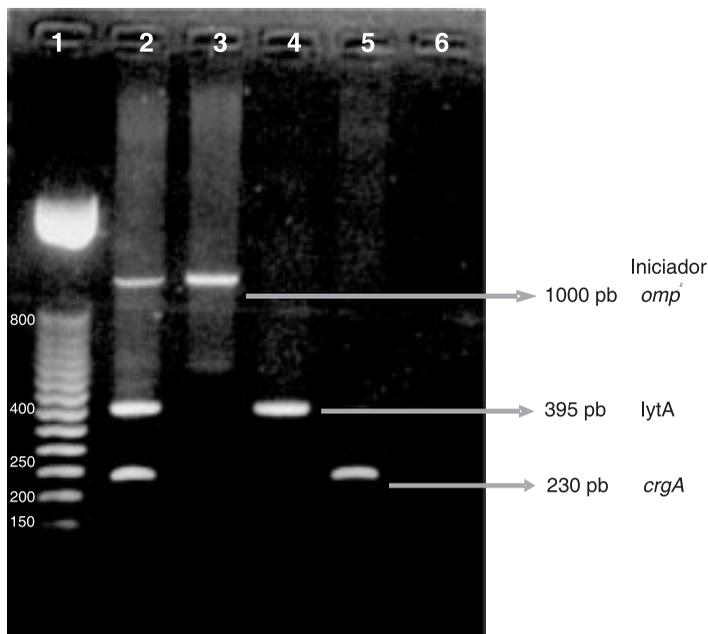


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los productos de amplificación de ADN a concentración de 200 ng de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* obtenidos con la prueba de PCR múltiple, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control positivo con 200 ng de ADN de los tres microorganismos; carril 3, ADN *H. influenzae*; carril 4, ADN *S. pneumoniae*; carril 5, ADN *N. meningitidis*; carril 6, control negativo.

los cuales se identifica sólo un microorganismo como *H. influenzae* (21,22), *S. pneumoniae* (16) y *N. meningitidis* (7,17) y formatos múltiples con diferentes iniciadores a los utilizados en el presente estudio (23-25).

La selección de los iniciadores es uno de los pasos más importantes en el diseño y la estandarización de una PCR múltiple (26). En el presente trabajo se evaluaron los iniciadores omp2, lytA y crgA, que se han utilizado en PCR en formatos convencionales con buenas sensibilidad y especificidad (7,15-17,22), pero no se habían reportado en el desarrollo de PCR en formato múltiple. Se eligió el iniciador omp2 debido a que permite identificar los aislamientos encapsulados y no encapsulados de *H. influenzae*, a diferencia del gen *bexA* que está asociado con el proceso de la expresión de la cápsula y que permite identificar sólo aislamientos encapsulados (21,24). Para la identificación de *S. pneumoniae* se escogió el iniciador lytA en lugar de ply; este último amplifica el gen que codifica para la neumolisina, el cual es un factor de virulencia que se ha detectado en otras especies relacionadas, como *S. mitis*, *S. oralis* y *S. salivarius*, y por lo tanto, no es específico (16,24). Para la detección de *N. meningitidis* se usó el gen crgA, el cual ha demostrado ser específico para este microorganismo (7,17,25).

Los iniciadores fueron diseñados para PCR en formato convencional y no en múltiple; al someterlos a un análisis bioinformático, éste reveló que se podía utilizar de manera eficiente los tres iniciadores en un formato múltiple; los porcentajes de guanina y citosina estuvieron en un rango que permite una buena reacción. De igual forma, los valores delta de energía libre de los dímeros fueron muy bajos (menores de -8,5 kcal/mol) como para presentar interferencias en la mezcla de reacción, debido a que se pueden evitar con incremento de la temperatura de anillamiento o disminuyendo la concentración de los iniciadores en la mezcla de reacción. Las temperaturas de anillamiento estuvieron entre 51,8°C y 66,8°C, con rangos de coincidencia que permiten que sean utilizados en un formato múltiple (27). Los datos obtenidos in silico no variaron al realizar físicamente la mezcla, obteniéndose experimentalmente

una buena amplificación de las tres bandas, con una alta sensibilidad para los tres microorganismos correspondientes, eligiéndose a los 57°C como la temperatura óptima de anillamiento de la reacción. Una temperatura inferior a la óptima podría generar productos de amplificación inespecíficos, afectando la especificidad, y una temperatura superior puede generar la pérdida de la amplificación de algunos de los productos, disminuyendo la sensibilidad de la PCR (26,27).

En la estandarización se determinó que la concentración óptima de MgCl₂ fue de 2 nM. La concentración de MgCl₂ es un parámetro importante en una PCR múltiple, debido a que la Taq polimerasa es una enzima dependiente del Mg²⁺ y los iniciadores y los dNTP se unen al MgCl₂ afectando su viabilidad como cofactor enzimático. Además, el exceso de MgCl₂ puede favorecer la formación de productos inespecíficos y disminuir la sensibilidad de la técnica (27,28).

Los tres microorganismos que se pudieron identificar con la PCR múltiple estandarizada en el presente estudio, son los que ocasionan meningitis bacteriana con mayor frecuencia, pero eventualmente esta enfermedad puede ser ocasionada por otras bacterias (2); por esta razón, es importante que los iniciadores sean específicos. No se observaron reacciones cruzadas con ninguno de los microorganismos utilizados diferentes a *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* (cuadro 1), lo que indica que son específicos en el formato de PCR múltiple, lo cual concuerda con el análisis bioinformático y con lo informado por los autores que diseñaron los iniciadores (15-17). Con la PCR establecida en este estudio se lograron detectar concentraciones bajas del ADN, lo cual demuestra que la técnica puede detectar un reducido número de bacterias en las muestras.

Este estudio demostró que los iniciadores evaluados se pueden utilizar en conjunto en una PCR múltiple para la identificación de *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis* con buenas sensibilidad y especificidad. Sin embargo, es necesario validar su utilidad en muestras clínicas como método de diagnóstico comparándola con las metodologías tradicionales.

Agradecimientos

A Clara Inés Agudelo por la revisión y comentarios a este manuscrito.

Conflicto de interés

Los autores declaran no haber incurrido en conflicto de interés alguno durante la realización de este estudio.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el Instituto Nacional de Salud, número de proyecto CTIN 30-06.

Referencias

- Zwijenburg PJ, van der Poll T, Roord JJ, van Furth AM. Chemotactic factors in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis. *Infec Immun*. 2006;74:1445-51.
- Bartfield AA. Bacterial meningitis. *Prim Care Update Ob Gyns*. 2000;7:49-54.
- Saez LX, McCracken GH. Bacterial meningitis in children. *Lancet*. 2003;361:2139-48.
- Gutiérrez CE. Infecciones por *Haemophilus influenzae* en la población pediátrica. *Biomédica*. 2001;21:369-88.
- Dagan R, Englehad D, Piccar E, Engelhard D, Israeli Pediatric Bacteremia and Meningitis Group. Epidemiology of invasive childhood pneumococcal infections in Israel. *JAMA*. 1992;268:3328-32.
- Weisfelt M, de Gans J, van der Poll T, van de Beek D. Pneumococcal meningitis in adults: new approaches to management and prevention. *Lancet Neurol*. 2006;5:332-42.
- Lee SO, Ryu SH, Park SJ, Ryu J, Woo JH, Kim YS. Meningococcal disease in the Republic of Korea army: incidence and serogroups determined by PCR. *J Korean Med Sci*. 2003;18:163-6.
- Pathan N, Faust SN, Levin M. Pathophysiology of meningococcal meningitis and septicaemia. *Arch Dis Child*. 2003;88:601-7.
- Gray L, Fedorko D. Laboratory diagnosis of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5:130-45.
- Correa A, Echavarría E, Estrada S, Lopera T, Ortis LE, Uribe MV, et al. Taller sobre meningitis bacteriana aguda. *Infectio*. 2001;5:31-4.
- Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, Kaufman BA, Roos KL, Scheld WM, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1267-84.
- Overturf GD. Defining bacterial meningitis and other infections of the central nervous system. *Pediatr Crit Care Med*. 2005;6(3 Suppl.):14-8.
- Louie M, Louie L, Simor AE. The role of DNA amplification technology in the diagnosis of infectious diseases. *CMAJ*. 2000;163:301-9.
- Pitcher D, Saunders N, Owen R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letts Appl Microbiol*. 1989;8:151-6.
- Forbes K, Bruce K, Ball A, Pennington T. Variation in length and sequence of porin (*omp2*) alleles of non-capsulate *Haemophilus influenzae*. *Mol Microbiol*. 1992;6:2107-12.
- Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004;49:249-54.
- Taha MK. Simultaneous approach for nonculture PCR-based identification and serogroup prediction of *N. meningitidis*. *J Clin Microbiol*. 2000;38:855-7.
- NCBI. BLAST. [Consultada: julio 13 de 2006]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.
- DNASTAR. Software for molecular biology [Consultada: julio 13 de 2006]. Disponible en: <http://www.dnastar.com>.
- University of Helsinki. FastPCR © 1998-2007 (for Windows). [Consultada: julio 13 de 2006]. Disponible en: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>.
- Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1994;32: 2382-6.
- Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, Forbes KJ. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. 1994;114:93-103.
- Uzuka R, Kawashima H, Hasegama D, Ioi H, Amaha M, Kashiwagi Y, et al. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by using multiplex PCR and real time PCR. *Pediatr Int*. 2004;46:551-4.
- Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1553-8.
- Chanteau S, Sidikou F, Djibo S, Moussa A, Mindadou H, Boisier P. Scaling up of PCR-based surveillance of bacterial meningitis in the African meningitis belt: indisputable benefits of multiplex PCR assay in Niger. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:677-80.
- Schoske R, Vallone PM, Ruitberg CM, Butler JM. Multiplex PCR design strategy used for the simulta-

- neous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal Bioanal Chem.* 2003;375:333-43.
27. **Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vance GM, Vogt PH.** Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques.* 1997;23:504-11.
28. **Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M.** Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002; 16:47-51.