

## Tipificación capsular mediante PCR de aislamientos de *Haemophilus influenzae* no tipificables por aglutinación

G. WELTMAN<sup>1</sup>, M.S. FOSSATI<sup>1</sup>, C. CORREA<sup>1</sup>, M. REGUEIRA<sup>1</sup>, M. MOLLERACH<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas-ANLIS "Dr. Carlos Malbrán", Vélez Sarsfield 563, (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; <sup>2</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, Junín 956, (1113) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina

\* Correspondencia. E-mail: mmollera@ffyba.uba.ar

### RESUMEN

*Haemophilus influenzae* es reconocido como un agente patógeno responsable de infecciones localizadas y sistémicas. Se han descrito 6 tipos de polisacáridos capsulares antigénicamente distintos (a, b, c, d, e, y f) que se pueden identificar por aglutinación en lámina con antisueros específicos. También existen cepas no capsuladas (NC) fenotípicamente no tipificables (NT). La introducción de la vacuna conjugada produjo una marcada disminución de las enfermedades invasivas causadas por *H. influenzae* tipo b. En este contexto, la tipificación capsular mediante PCR es el método más apropiado para distinguir las cepas no capsuladas de las mutantes b deficientes en cápsula (b) y detectar la presencia de cepas pertenecientes a otros serotipos que no puedan ser tipificables por aglutinación. Se determinó el genotipo capsular a 38 aislamientos de *Haemophilus influenzae* no tipificables por aglutinación, derivados al servicio de Bacteriología Clínica del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" en el período 2002-2004. El 78,9% de los aislamientos provenían de hemocultivos y la mayor parte de ellos estaban asociados a foco respiratorio. El 100% de los aislamientos fueron identificados como *H. influenzae* no capsulados mediante la técnica de PCR.

**Palabras clave:** *Haemophilus influenzae*, aislamientos no capsulados, genotipificación capsular por PCR

### SUMMARY

**PCR-based capsular typing of *Haemophilus influenzae* isolates non-typeable by agglutination.** *Haemophilus influenzae* is recognized as a pathogenic agent responsible of localized and systemic infections. Six antigenically different capsular polysaccharide types have been described (a, b, c, d, e, and f) which can be identified by slide agglutination with specific antisera. Besides there are non capsulated strains that cannot be typed by slide agglutination. The introduction of the conjugated vaccine produced an important reduction of invasive diseases caused by *H. influenzae* type b. Capsular typing by PCR is the most appropriated method for distinguishing non capsulated strains from capsule deficient type b mutants (b) and for detecting strains of other serotypes that cannot be detected by slide agglutination. Capsular genotype was studied in 38 isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae* received at INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" between 2002-2004. Of the isolates included in this study 78.9% of them were recovered from blood cultures and most of them were associated with a respiratory focus. By PCR technique 100% of the isolates were identified as non-capsulate *H. influenzae* and genotype b was not detected.

**Key words:** *Haemophilus influenzae*, non-capsulate isolates, PCR capsular typing

*Haemophilus influenzae* es reconocido como un agente patógeno responsable de infecciones sistémicas y localizadas tales como meningitis, neumonía, conjuntivitis y otitis. Su reservorio natural es el tracto respiratorio superior humano. Se han descrito 6 tipos de polisacáridos capsulares antigénicamente distintos que se pueden identificar por aglutinación en lámina con antisueros específicos en serotipos a, b, c, d, e, y f. También existen cepas no capsuladas (NC) fenotípicamente no tipificables (NT).

La introducción de la vacuna conjugada produjo una marcada disminución de las enfermedades invasivas causadas por *H. influenzae* tipo b en aquellos países donde la vacuna fue utilizada extensivamente (3, 14, 15). Diversos laboratorios han producido diferentes vacunas

conjugadas, todas ellas utilizan el polisacárido capsular como hapteno aunque difieren en la proteína transportadora, en el tipo de enlace y en el tamaño del polisacárido conjugado. En Argentina fue introducida al Calendario Nacional de Vacunación en el año 1998 y el esquema recomendado consiste en tres dosis a los 2, 4 y 6 meses, con un refuerzo a los 18 meses.

Algunas publicaciones han documentado la emergencia de enfermedades invasivas asociadas a serotipos distintos de b o a cepas NC (2, 6, 7, 9, 16). Se han reportado aislamientos que, a pesar de presentar el gen capsular específico de tipo b, no expresan el polisacárido correspondiente (1, 4, 6, 9). Estas son mutantes que han sufrido una disrupción en el gen *bexA* necesario para la exportación del polisacárido capsular y se las denomi-

na *H. influenzae* b (10, 11, 12). Se ha especulado que la utilización de la vacuna conjugada para *H. influenzae* b podría producir un aumento en la incidencia de enfermedades invasivas asociadas a estas cepas, y la ausencia del antígeno aglutinante podría llevar a una subestimación de la incidencia de *H. influenzae* b y así sobreestimarse la eficacia de la vacuna. Estos aislamientos son clasificados por las técnicas de aglutinación en lámina como *H. influenzae* NT y sólo pueden ser detectados por técnicas de biología molecular.

Dada la importancia epidemiológica de conocer las características genotípicas de los aislamientos *H. influenzae* NT locales, se realizó la tipificación capsular mediante PCR de 38 aislamientos de *H. influenzae* NT, derivados al servicio de Bacteriología Clínica del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" desde la Red de Laboratorios en los años 2002, 2003 y 2004.

La distribución de los 38 aislamientos según el origen de las muestras fue: sangre, 30; punción de oído, 2; líquido pleural, 2; líquido cefalorraquídeo, 2; lavado bronquial, 1; lavado broncoalveolar, 1. El 78,9% de los aislamientos provenían de hemocultivos. Si bien no se pudieron obtener los datos completos de todos los pacientes, la mayoría de las bacteriemias (18/30) estaban asociadas a foco respiratorio. El 65,8% de los pacientes eran menores de 2 años.

Todos los aislamientos fueron estudiados inicialmente por aglutinación en lámina con los 6 sueros monovalentes específicos (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) y se clasificaron como NT cuando autoaglutinaron, poliaglutinaron o no aglutinaron con ninguno de los sueros monovalentes. El genotipo capsular se determinó por la técnica de PCR,

en base a los protocolos descritos por Gonin *et al.* (8) y Falla *et al.* (5). Se suspendieron seis o siete colonias provenientes de un cultivo fresco en agar chocolate en 80 µl de agua de grado molecular. La suspensión bacteriana se calentó a 100 °C por 10 minutos, luego se centrifugó a 10.000 xg durante 3 minutos, se separó el sobrenadante, y se conservó a -20 °C hasta su utilización (ADN molde). Se realizó una PCR múltiple en un volumen final de 25 µl utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos de los genes capsulares a, b, d, f y del gen *bexA* (200 µM de cada uno), buffer *Taq* polimerasa 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen Life Technologies, Brasil) y 1,5 µl de ADN molde. Luego, otras 2 reacciones de PCR con igual composición, una con oligonucleótidos iniciadores de tipo capsular c junto con los del gen *ompP2* (específico de *H. influenzae*) y otra con oligonucleótidos iniciadores de tipo e. Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 1 min, 56 °C por 1 min (para PCR múltiple y PCR con oligonucleótidos iniciadores de tipo c y *ompP2*) o 50 °C por 1 min (para PCR con oligonucleótidos iniciadores de tipo e) y 72 °C por 1 min. La extensión final se realizó a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se resolvieron con una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X (Tris-Acetato 0,04 M, EDTA 0,001 M). Se realizó la corrida electroforética a 8V/cm durante 35 min. Los fragmentos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio y luego se fotografiaron. En la Tabla 1 se detallan las secuencias de los oligonucleótidos iniciadores utilizados (5) y el tamaño correspondiente a cada uno de los productos de amplificación.

**Tabla 1.** Descripción de los oligonucleótidos iniciadores utilizados y tamaño de los productos.

Tipo capsular/gen	Iniciador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
<i>cap a</i>	a <sub>1</sub>	CTACTCATTGCAGCATTTGC	250
	a <sub>2</sub>	GAATATGACCTGATCTTCTG	
<i>cap b</i>	b <sub>1</sub>	GCGAAAGTGAACCTTATCTCTC	480
	b <sub>2</sub>	GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA	
<i>cap c</i>	c <sub>1</sub>	TCTGTGTAGATGATGGTTCA	250
	c <sub>2</sub>	CAGAGGCAAGCTATTAGTTA	
<i>cap d</i>	d <sub>1</sub>	TGATGACCGATACAACCTGT	150
	d <sub>2</sub>	TCCACTCTTCAAACCATTCT	
<i>cap e</i>	e <sub>1</sub>	GGTAACGAATGTAGTGGTAG	1350
	e <sub>2</sub>	GCTTTACTGTATAAGTCTAG	
<i>cap f</i>	f <sub>1</sub>	GCTACTATCAAGTCAAATC	450
	f <sub>2</sub>	CGCAATTATGGAAGAAAGCT	
<i>bexA</i>	H1	CGTTTGTATGATGTTGATCCAGAC	345
	H2	TGTCCATGTCTTCAAAATGATG	
<i>ompP2</i>	01	ATAACAACGAAGGGACTAACG	1000
	03	ACCTACACCCACTGATTTTTTC	

Se utilizaron como controles positivos de serotipo cepas de *H. influenzae* ATCC 9006 (tipo a), ATCC 10211 (tipo b), ATCC 9007 (tipo c), ATCC 9008 (tipo d), ATCC 8142 (tipo e) y ATCC 9833 (tipo f).

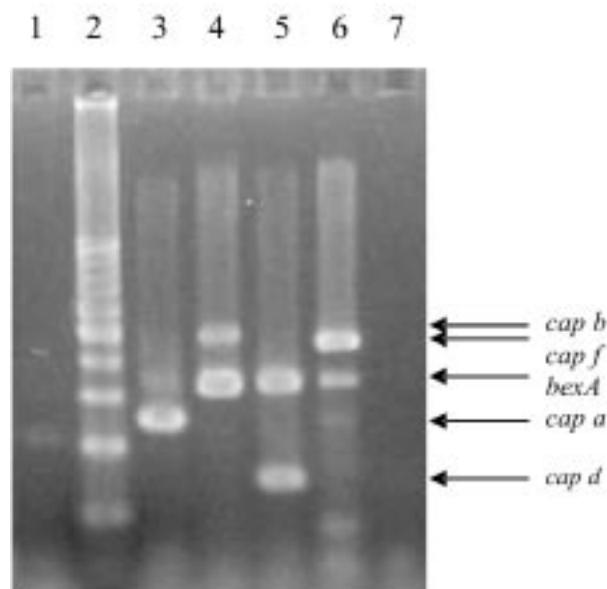
La aplicación de la técnica de PCR permite la asignación inequívoca del tipo capsular. Los resultados de los genes *cap* y *bexA* no fueron detectados en ninguno de ellos y la amplificación dirigida al gen *ompP2* resultó positiva en todos ellos (control positivo de amplificación para la especie *H. influenzae*). En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los resultados de las tres PCR de algunos de los 38 aislamientos estudiados en este trabajo.

La aplicación de la técnica de PCR es considerada el *gold standard* para la genotipificación capsular de *H. influenzae*. Se han publicado varios estudios comparativos evaluando de manera exhaustiva discrepancias con los resultados obtenidos por aglutinación en lámina y las causas más frecuentes de error. En resumen, es importante destacar la importancia de realizar controles para detectar cepas autoaglutinantes y tener en cuenta que existen aislamientos poliaglutinantes. Ambos tipos de aislamientos pueden ser catalogados erróneamente como *H. influenzae* b cuando sólo se utiliza el suero anti b (1, 13).

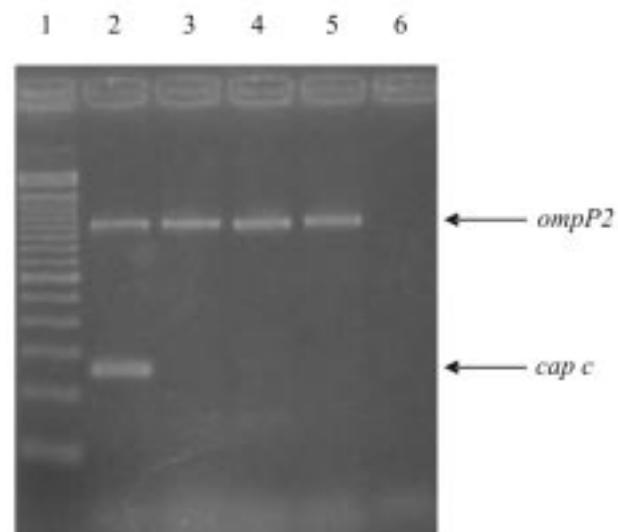
Diferentes estudios de vigilancia epidemiológica de *H. influenzae* realizados luego de la introducción de la

vacuna conjugada han detectado una importante asociación entre los aislamientos *H. influenzae* NC y bacteriemias con foco respiratorio (2, 9, 16).

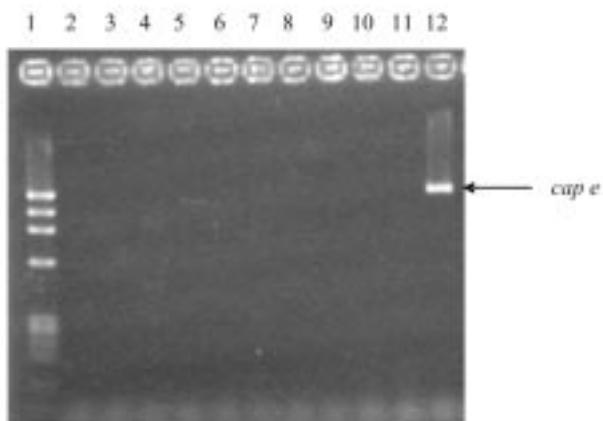
El hallazgo de aislamientos *H. influenzae* b<sup>-</sup> ha sido descrito por algunos grupos de trabajo, principalmente asociado a enfermedad invasiva y con una presentación semejante a la producida por *H. influenzae* b. Falla y colaboradores, en un estudio de vigilancia realizado en la región de Oxford entre 1985 y 1991, encontraron 3 aislamientos b<sup>-</sup> asociados a meningitis entre 24 aislamientos NT sobre un total de 408 aislamientos de *H. influenzae*



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR múltiple. Línea 1, *H. influenzae* NC (uno de los 38 aislamientos incluidos en este estudio); línea 2, marcador de peso molecular 100 bp ladder; línea 3, *H. influenzae* ATCC 9006 (tipo a); línea 4, ATCC 10211 (tipo b); línea 5, ATCC 9008 (tipo d); línea 6, ATCC 9833 (tipo f); línea 7, control negativo. En cada uno de los controles ATCC se observa la banda específica de serogrupo y la banda correspondiente al producto de amplificación del gen *bexA*



**Figura 2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con oligonucleótidos iniciadores específicos de tipo c y *ompP2*. Línea 1, marcador de peso molecular 100 BP ladder; línea 2, *H. influenzae* ATCC 9007 (tipo c); líneas 3 a 5, 3/38 aislamientos *H. influenzae* NT; línea 6, control negativo.



**Figura 3.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR amplificados con oligonucleótidos iniciadores específicos de tipo e. Línea 1, marcador de peso molecular  $\Phi$ X174/ *Hae*III; línea 2 a 10, 10/38 aislamientos *H. influenzae* NT; línea 11, control negativo; línea 12, *H. influenzae* ATCC 8142 (tipo e).

invasivos (6). En Italia, Cerquetti *et al.* estudiaron 41 aislamientos de *H. influenzae* no b recuperados de pacientes con enfermedad invasiva y detectaron 4 aislamientos b<sup>-</sup>, 3 de los cuales habían sido aislados de niños menores de 6 años (4). Otros autores también informan la detección de aislamientos b<sup>-</sup> (1), pero ninguno de estos trabajos menciona el estado de vacunación correspondiente a esos pacientes. En cambio, en un estudio de vigilancia activa de enfermedad invasiva por *H. influenzae* en pacientes pediátricos realizado en Gran Bretaña e Irlanda, se recuperaron 2 aislamientos de *H. influenzae* b<sup>-</sup>, de los cuales uno correspondió a un paciente con vacunación completa (9). En nuestro estudio no se detectó ningún aislamiento con genotipo b<sup>-</sup>. Este genotipo tampoco fue hallado en estudios de vigilancia de *H. influenzae* realizados por otros autores en los que predominaban los aislamientos recuperados de pacientes con bacteriemia (2, 16).

El rol de *H. influenzae* b<sup>-</sup> en la enfermedad invasiva aún no está claro. La invasión podría ocurrir antes de que estos aislamientos perdiesen la cápsula, o podría tratarse de cepas sin polisacárido capsular al momento de la invasión. En este último caso, la vacuna conjugada contra *H. influenzae* b no brindaría protección. En la primera situación podría considerarse la hipótesis de que las cepas b<sup>-</sup> evolucionaron en el hospedador como mecanismo de evasión frente a la presión de los anticuerpos generados por la vacuna. Considerando que estas situaciones contribuirían de manera diferente para evaluar la eficacia de la vacuna, sería especialmente importante realizar la vigilancia activa de este patógeno en enfermedades invasivas, de manera que los laboratorios que integran la Red para Diagnóstico de Meningitis e Infecciones Respiratorias Agudas Bacterianas, envíen sistemáticamente al Laboratorio de Referencia todos los aislamientos recuperados de pacientes con enfermedades invasivas para poder detectar la posible emergencia de estas cepas y conocer la real distribución de los serotipos de *H. influenzae* y de *H. influenzae* NC que están provocando enfermedad invasiva en la era postvacunal en nuestro país.

## Bibliografía

1. Bokermann S, Zanella RC, Lemos APS, De Andrade ALSS, Brandileone MC (2003) Evaluation of methodology for serotyping invasive and nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* in the ongoing surveillance in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 41: 5546-5550.
2. Campos J, Hernando M, Román F, Pérez Vázquez M, Aracil B *et al.* (2004) Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* Type b. *J. Clin. Microbiol.* 42: 524-529.
3. Center for Disease Control and Prevention (1994) Progress toward eliminating *Haemophilus influenzae* type b disease among infants and children. United States, 1987-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Rep.* 43: 144-148
4. Cerquetti M, Ciofi Degli Atti ML, Renna G, Tozzi AE, Garlaschi ML, Mastrantonio P, and The Hi Study Group (2000) Characterization of non-type B *Haemophilus influenzae* strains isolated from patients with invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* 38: 4649-4652.
5. Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER (1994) PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2382-2386.
6. Falla TJ, Dobson SRM, Crook DWM, Kraak WAG, Nichols WW, Anderson EC *et al.* (1993) Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. *Lancet* 341: 851-854.
7. Gatti BM, Ramírez Gronda GA, Etchevarría M, Vescina CM, Varea AM, González Ayala SE (2004) Aislamiento de distintos serotipos de *Haemophilus influenzae* en muestras profundas de pacientes pediátricos. *Rev. Argent. Microbiol.* 36: 20-23.
8. Gonin P, Lorange M, Delage G (2000) Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37:1-4.
9. Heath PT, Booy R, Azzopardi HJ, Slack MPE, Fogarty J, Maloney AC *et al.* (2001) Non-type b *Haemophilus influenzae* disease: clinical and epidemiologic characteristics in the *Haemophilus influenzae* type b vaccine era. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 20: 300-305.
10. Hoiseth SK, Connelly CJ, Moxon ER (1985) Genetics of spontaneous, high-frequency loss of b capsule expression in *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* 49: 389-395.
11. Kroll JS, Hopkins I, Moxon ER (1988) Capsule loss in *H. influenzae* type b occurs by recombination-mediated disruption of a gene essential for polysaccharide export. *Cell* 53: 347-356.
12. Kroll JS, Zamze S, Loynds B, Moxon ER (1989) Common organization of chromosomal loci for production of different capsular polysaccharides in *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 171: 3343-3347.
13. LaClaire LL, Tondella MLC, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, Popovic T, and the Active Bacterial Core Surveillance Team Members (2003) Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J. Clin. Microbiol.* 41: 393-396.
14. Martin M, Casellas JM, Madhi SA, Urquhart TJ, Delpont SD, Ferrero F *et al.* (2004) Impact of *Haemophilus influenzae* Type b conjugate vaccine in South Africa and Argentina. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23: 842-847.
15. Peltola H (2000) Worldwide *Haemophilus influenzae* Type b disease at the beginning of the 21<sup>st</sup> Century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 302-317.
16. Slack M, Azzopardi H, Hargreaves R, and Ramsay M (1998) Enhanced surveillance of invasive *Haemophilus influenzae* disease in England, 1990 to 1996: impact of conjugate vaccines. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17: 204-207.