

Detección e identificación por PCR de microorganismos causantes de meningocefalitis bacteriana

Yanet Climent¹, Isabel Martínez¹, Niurys Nuñez¹, Mónica Ginebra¹, Leydis Zamora¹, Mercedes Gutiérrez¹, Francklin Sotolongo¹, Armando Acosta¹, Luis W Climent².

¹ Instituto Finlay. Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba. ycliment@finlay.edu.cu

² Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez". Ciudad de La Habana, Cuba.

Reportamos el empleo de cebadores para la detección e identificación de microorganismos causantes de meningocefalitis bacteriana (MEB) en 24 muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y a partir de ADN genómico de cepas de referencia previamente purificado. Se emplearon cebadores generales y específicos derivados del gen 16S ARNr (ARN ribosómico). Los cebadores generales amplificaron en todas las especies bacterianas analizadas: *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* tipo b, *Streptococcus sp* y *Staphylococcus aureus*, en una misma banda de 825 pb. Los cebadores específicos solamente amplificaron en el microorganismo del que se derivan, obteniendo bandas de 667, 478 y 253 pb para *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *Streptococcus sp*, respectivamente. También se diferenció *Streptococcus agalactiae* mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se obtuvo una banda de 478 pb. Al evaluar estos cebadores en muestras clínicas de LCR se constató que hubo una sensibilidad del 100% de las MEB por PCR; la especificidad fue del 100%. Los productos de PCR se analizaron por digestión Hae III, encontrando correspondencia en los patrones de restricción de las muestras clínicas y las cepas de referencia.

Palabras claves: ARN ribosómico, Bacterias, gen, LCR, MEB, PCR.

Introducción

La meningocefalitis bacteriana (MEB) constituye una amenaza para la vida, ya que afecta el sistema nervioso central (SNC) y se ubica entre las causas principales de muertes en los niños menores de cinco años, es por esto que resulta de vital importancia realizar un diagnóstico rápido y exacto, junto a un tratamiento efectivo (1, 2). La identificación del agente causal constituye una valiosa herramienta en la conducta terapéutica a emplear y para el sistema de vigilancia epidemiológica. El diagnóstico bacteriológico permite identificar a los microorganismos capaces de provocar esta patología. Actualmente, este diagnóstico adquiere mayor importancia, debido a la incorporación de las vacunas contra *N. meningitidis* y *H. influenzae* tipo b en el Programa Nacional de Inmunización.

Los métodos tradicionales de diagnóstico incluyen el examen microscópico directo y el cultivo del microorganismo a partir de las muestras clínicas (LCR). El primero no tiene buena sensibilidad, y el cultivo presenta el inconveniente de que su resultado puede demorar 24-72 h y en aquellos pacientes con tratamiento antimicrobiano previo, puede resultar negativo (3).

La sensibilidad y especificidad del PCR convierten a esta técnica en un método complementario a los métodos convencionales utilizados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas (4, 5). Para la detección de las principales especies patógenas involucradas en la MEB de forma individual, se emplean distintos ensayos con diferentes genes como blanco. No obstante, encontrar un gen que permita la detección simultánea de varias especies, en este caso cuatro, se hace complicado y hasta ahora se ha utilizado fundamentalmente al ARNr, especialmente el 16S ARNr (6, 7, 8).

Este trabajo describe nuevos cebadores, derivados del gen 16S ARNr (ARN ribosomal), para la detección e identificación de los microorganismos que con mayor frecuencia producen MEB: *N. meningitidis*, *H. influenzae* tipo b, *S. pneumoniae* y *S. agalactiae*.

Teniendo en consideración la necesidad e importancia que reviste la detección rápida de las MEB, nos propusimos la evaluación de nuevos cebadores para la detección simultánea de estas especies a partir de ADN genómico y muestras clínicas.

Materiales y Métodos

Para la realización del PCR se purificó el ADN genómico (9) de cepas de referencia, tres pertenecientes al serogrupo B de *Neisseria meningitidis* (B 385/83, cepa vacunal; B16B6 y M986), obtenidas del cepario del Instituto Finlay. Del género *Streptococcus* se estudiaron tres especies (*S. agalactiae*, *S. β hemolítico* grupo A, donadas por la Empresa de Productos Biológicos "Carlos J. Finlay" y *S. Pneumoniae*, donada por el Instituto Nacional de Streptococo: Edmonton, Canadá) y una cepa de *H. influenzae* tipo b, cepa Eagan, colección Laboratorio de Investigaciones Meníngeas Bacterianas, Instituto Finlay.

Muestras biológicas

Se estudiaron 24 muestras de LCR correspondientes a casos clínicos del Hospital Pediátrico "Juan Manuel Márquez" (Ciudad de La Habana) y de la provincia de Ciego de Avila. De estos, 10 tenían diagnóstico confirmado de MEB y 8 fueron positivos a cultivo. Las muestras restantes fueron 3 LCR negativos y 11 LCR correspondientes a meningitis virales. De los 10 casos con MEB, 4 fueron por *N. meningitidis*, 2 por *S. pneumoniae*, 2 por *S. agalactiae*, 1 por *H. influenzae* y 1 por *S. aureus*.

Diseño y síntesis de los cebadores

El diseño y síntesis de los cebadores se realizó mediante una búsqueda de secuencias de ADN del gen 16S ARNr de los microorganismos de interés. Fueron diseñados empleando regiones conservadas para los cebadores E1 y E2 y regiones específicas para cada patógeno en los cebadores Hib (*H. influenzae* tipo b) y Sdif (*S. agalactiae*). Los cebadores Nm (*N. meningitidis*) y Strep (*Streptococcus sp.*) fueron previamente descritos por Backman y colaboradores (10).

PCR general a partir de ADN genómico (PCR E1-E2)

La amplificación se realizó empleando 100 ng de ADN genómico previamente purificado; empleando los cebadores E1: 5' GAATTCCA(C/T)GTGTAGC(A/G) 3' y E2: 5' TACGAC TTCACCCA(G/A)TCAT 3'. En el ciclo térmico utilizado la mezcla fue sometida a una desnaturalización inicial a 95 °C durante 4 min y 32 ciclos con 1 min de desnaturalización a 95 °C; 1 min de hibridación a 55 °C y extensión a 72 °C durante 1 min. Se realizó una extensión final a 72 °C durante 5 min. Las muestras se dejaron refrigerar a 4 °C durante 5 min.

PCR específico

Este ensayo se realizó empleando 1 µL del producto amplificado en el PCR general; los cebadores E2 y los específicos: Nm (5' TGTTGGCAACCTGATTG 3'), Hib (5' CTTGTG CCTTCGGGAAC 3'), Strep (5' GTACAACGAGTCGCAAGC 3').

PCR especie-específico para *Streptococcus agalactiae* (PCRd)

En esta reacción se utilizó 1 µL del producto amplificado en el PCR general, los cebadores E2 y Sdif específico para *S. agalactiae* 5' ACGACTTCACCCCAATCA 3'.

PCR múltiple (PCRm)

En este caso la reacción se realizó adicionando 1 µL del producto amplificado en el PCR general, y los cebadores específicos para cada género Nm, Hib, Strep y E2 manteniendo el resto de la reacción en las mismas condiciones de los PCR anteriores.

PCR a muestras de LCR

Se tomaron 10 µL de las muestras de LCR y se hirvieron durante 15 min, el resto de las reacciones y el programa fueron las mismas que a partir de ADN genómico.

Digestiones enzimáticas

En las digestiones realizadas se empleó la enzima Hae III (Boehringer Mannheim Biochemica), a una concentración de 1 U/µg de ADN, el tampón empleado fue el recomendado por el fabricante para la máxima actividad enzimática y 500 ng de ADN producto de los PCR en un volumen final de 20 µL. Las mezclas de reacción se incubaron en un baño térmico (Pharmacia LKB, Suecia) durante 2 h a 37 °C.

Para determinar las tallas de las bandas se empleó el patrón de peso molecular (ppm) de PCR (Sigma) que contiene fragmentos de 2000, 1500, 1000, 750, 500, 300, 150 y 50 pb.

Sensibilidad y especificidad

La sensibilidad y la especificidad se determinaron teniendo en cuenta el diagnóstico previo realizado por los centros de salud. Se incluyeron intervalos del 95% de confianza (IC 95%). El método empleado para dichos intervalos fue el Epi.Info versión 6.04.

La sensibilidad del ensayo se calculó:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Número Muestras Positivas al Ensayo}}{\text{Total Muestras Positivas}} \times 100\%$$

La especificidad se calculó:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Número Muestras Negativas al Ensayo}}{\text{Total Muestras Negativas}} \times 100\%$$

Resultados y Discusión

En este trabajo se presentan los resultados de la aplicación de cebadores derivados a partir del gen 16S ARNr para la detección de MEB causadas por *N. meningitidis*, *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *S. agalactiae* en muestras clínicas, específicamente LCR, empleando el PCR.

Se realizó el PCR general empleando ADN genómico, previamente purificado de cada cepa de referencia y los cebadores E1-E2 (PCR E1-E2), con el que se obtuvo una banda de 825 pb sin inespecificidad, bien definida y sin degradación.

Para diferenciar en las muestras los microorganismos causantes de MEB, se emplearon cebadores específicos para: *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *Streptococcus sp*; obtenidos de regiones variables entre los diferentes microorganismos.

En el caso de la identificación de *Neisseria* se utilizaron los cebadores Nm-E2, obteniéndose una banda de 667 pb, única y bien definida, ubicada entre la cuarta y la quinta banda del patrón de peso molecular, lo cual se

correspondía con la talla esperada por el análisis previo de los cebadores.

Para *H. influenzae* se emplearon los cebadores Hib-E2 y el comportamiento fue muy similar al de *Neisseria*. En este caso, sólo se estudió la cepa *H. influenzae* tipo b, para la cual se obtuvo una banda única, que se corresponde con la talla esperada de 478 pb.

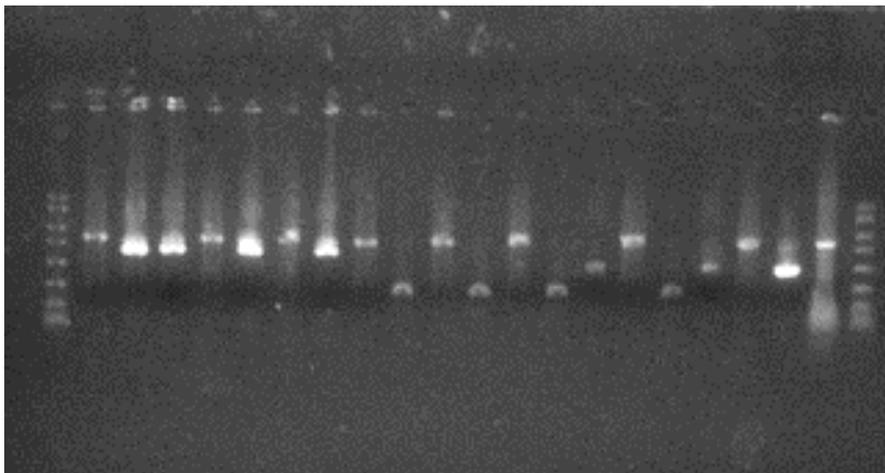
Para el género *Streptococcus* el PCR se realizó con los cebadores St-E2 y se obtuvo una banda única de 253 pb de talla lo que se correspondía con la talla esperada. Al igual que en el resto de los PCR se obtuvo para cada cepa de *Streptococcus* una banda sin inespecificidad.

Debido a que dentro del género *Streptococcus* más de una especie puede causar MEB era muy importante la diferenciación de estas especies y para esto se empleó el cebador Sdif, el cual es específico para *S. agalactiae*. Utilizando los cebadores Sdif-E2 sólo se obtuvo amplificación para el caso de *S. Agalactiae*, resultando una banda única, con talla de 478 pb.

Al realizar el PCR en muestras de LCR se encontró que con los cebadores E1-E2 se logró amplificar la banda correspondiente al PCR general de 825 pb no sólo en las especies bacterianas descritas en este ensayo, sino también en otras especies como *Staphylococcus aureus*. Esto reafirma la capacidad de ambos cebadores de detectar numerosas especies bacterianas (Figura 1).

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los PCR positivos a partir de LCR

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22



1000 pb
750 pb
500 pb

1. ppm de PCR Sigma.
2. PCR E1-E2 LCR 1.
3. PCRm LCR 1.
4. PCRm LCR 2.
5. PCR E1-E2 LCR 3.
6. PCRm LCR 3.
7. PCR E1-E2 LCR 4.
8. PCRm LCR 4.
9. PCR E1-E2 LCR 5.
10. PCRm LCR 5.
11. PCR E1-E2 LCR 6.
12. PCRm LCR 6.
13. PCR E1-E2 LCR 7.
14. PCRm LCR 7.
15. PCRd LCR 7.
16. PCR E1-E2 LCR 9.
17. PCRm LCR 9.
18. PCRd LCR 9.
19. PCR E1-E2 LCR 10.
20. PCRm LCR 10.
21. PCR E1-E2 LCR 8.
22. ppm de PCR Sigma.

De 10 casos con diagnóstico confirmado de MEB, 9 fueron detectados como positivos con los cebadores E1-E2. La muestra de LCR que resultó negativa al PCR fue un caso de MEB por *Neisseria meningitidis* que resultó positivo al cultivo. Sin embargo, el PCR general detectó dos casos de MEB negativos a cultivo, uno correspondiente a *N. meningitidis* y otro a *H. influenzae*, este último sometido a tratamiento antibiótico previo a la toma de la muestra. Lo anterior confirma la utilidad de emplear el PCR como medio diagnóstico de MEB y se corresponde con lo encontrado por otros autores empleando cebadores diferentes (11, 12). Por último, no se obtuvo ningún falso positivo en las 14 muestras negativas, las que incluían casos de meningitis viral.

Con el empleo de los cebadores específicos se obtuvieron bandas de la misma talla que las encontradas a partir de los ADN genómicos de las cepas de referencia empleadas: 667 pb para *N. meningitidis*, 253 pb para el género *Streptococcus* y 478 pb para *H. influenzae* y en cada caso se correspondió con el diagnóstico reportado. Lo mismo ocurrió cuando se realizó PCR mezcla en el que no se obtuvo amplificación cruzada de los cebadores, solo amplificaron a partir del ADN que les dio origen. Este resultado demuestra la especificidad de los cebadores empleados donde todas los casos con MEB fueron positivos excepto la muestra de *Staphylococcus aureus* con la que no se obtuvo amplificación, resultado esperado, ya que no se incluía ningún cebador para su detección específica. Las 14 muestras negativas fueron sometidas a este ensayo y al igual que en el PCR general no encontramos falsos positivos.

A las 4 muestras identificadas como pertenecientes al género *Streptococcus* se les realizó el PCR de detección de *S. agalactiae* encontrando amplificación en las dos únicas muestras previamente identificadas como casos causados por este microorganismo. En las dos muestras restantes no se encontró amplificación, pero estas correspondían a *S. pneumoniae*, quedando demostrada la especificidad del cebador Sdif para la detección de *S. agalactiae*.

Se realizaron digestiones con la enzima Hae III de los PCR generales y específicos a partir de ADN genómico y de muestras clínicas. En todos los casos se obtuvieron los mismos patrones de restricción para las cepas de referencia y las muestras clínicas.

En el caso del PCR general, de las cepas de *N. meningitidis* se obtuvieron dos bandas, una de 532 pb y otra de 293 pb, las dos bandas obtenidas se deben

a que esta enzima presenta un único sitio de restricción.

La digestión del PCR general de las cepas de *S. agalactiae* debía mostrar cinco bandas ya que la enzima presenta cuatro sitios de restricción, sin embargo en la electroforesis solo se observan tres, la primera de 377 pb, la segunda de 164 pb; una tercera banda de 112 pb, las otras dos bandas no se observan en la electroforesis debido a su pequeña talla reportada de 93 pb y 80 pb.

La otra especie de *Streptococcus* analizada fue *S. pneumoniae*, en este caso la enzima presenta dos sitios de restricción obteniéndose tres bandas, la primera de 457 pb, la segunda a la altura de 257 pb y la última de 112 pb.

La reacción de *H. influenzae* sólo se realizó con los PCR obtenidos a partir de ADN genómico por no contar con la muestra de LCR en el momento de la reacción observándose cuatro de las cinco bandas esperadas. La mayor de las bandas ubicada a la altura de 278 pb, las bandas de 220 pb, 180 pb y una última de una talla de 112 pb. La banda de 34 pb no se logra observar en la electroforesis pues presenta una talla muy pequeña.

En caso del PCR específico para *N. meningitidis*, 667 pb, se obtuvieron dos bandas pues la enzima presenta dos sitios de restricción, la mayor a la altura de 374 pb y la menor de 293 pb.

El comportamiento de las digestiones de los PCR de las cepas de *Streptococcus* (253 pb) fue el esperado en el análisis teórico realizado, teniendo un único sitio de restricción, obteniendo dos bandas con tallas de 141 pb y 112 pb.

En la digestión enzimática del producto del PCR específico para *H. influenzae* (478 pb) se deben observar tres bandas ya que la enzima presenta dos sitios de restricción, una banda de 186 pb, una segunda de 180 pb y una tercera de 112 pb, las dos primeras se observan como una única banda de mayor intensidad.

		Diagnóstico Hospital		
		+	-	Total
Diagnóstico	+	10	0	10
Por PCR	-	0	14	14
Total		10	14	24

Este trabajo reportó una sensibilidad del 100% (65,5 – 100), lo que se encuentra en correspondencia con las sensibilidades obtenidas en otros ensayos publicados

que emplean cebadores derivados del gen 16S ARNr. La especificidad del ensayo fue del 100% (73,2 – 100) pues no se encontraron falsos positivos y los microorganismos detectados correspondieron con el diagnóstico clínico reportado, sin encontrar en los PCR amplificación de otras bandas que pusieran en duda su clasificación (3, 11, 12).

Con este estudio logramos no solo detectar sino también identificar los microorganismos que causan con mayor frecuencia MEB de una forma rápida y eficaz, aunque no por esto debemos descartar los métodos tradicionales de diagnóstico sino que deben realizarse de conjunto. Es recomendable en investigaciones similares aumentar el número de muestras clínicas a estudiar así como realizar el ensayo en otras muestras como suero.

Referencias

1. Olcen P. Rapid diagnosis of bacterial meningitis by a seminested PCR strategy. *Scan J Infect Dis.* 1995;27(5):537-539.
2. Gudiol F., Rufí G., Fernández P. Infecciones víricas del sistema nervioso central. En: Ferreras Valentin P, Rozman C. *Edit. Medicina Interna.* 13th ed. Vol 2. España Mosby-Doyma Libros. 1995:1413-1417.
3. García de Lomas J, Navarro D. New directions in diagnostics. *Pediatr Infect Dis J.* 1997; 16(Suppl. 3):543-548.
4. Radstrom P, Fermer C, Kristiansen BE, Jenkins A, Skold O, Swedberg G. Transformational exchanges in the dehydropteroate synthase gene of *Neisseria meningitidis*: a novel mechanism of acquisition of acquisition of sulfonamide resistance. *J Bacteriol.* 1992; 174: 6386-6393.
5. Sauders NB, Zollinger WD, Rao VB. A rapid PCR strategy employed for amplification and sequencing of porA from a single colony forming unit of *Neisseria meningitidis*. *Gene.* 1993;137:153-162.
6. Gray MW. On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:5837-5852.
7. Lane DJ. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 1995;82:6955-6959.
8. Wilson KH. New vistas for bacteriologists. Analysis based on comparisons of 16S rRNA sequences provides a rapid and reliable approach to identify humans pathogens. *ASM News.* 1992;58:318-321.
9. Goodwin CS, Majewski SIH. Restriction endonuclease analysis of the genome of *Campylobacter pylori* with a rapid extraction method: Evidence for considerably genomic variation. *J. Infect. Dis.* 1998;157(3):465-470.
10. Backman A, Lantz PG, Radstrom P, Olcen P. Evaluation of an extended diagnostic PCR assay for detection and verification of the common causes of bacterial meningitis in CSF and other biological samples. *Molecular and Cellular Probes.* 1999; 13:49-60.
11. Rantakokko-Jalava K, Nikkari S, Jalava J, Eerola E, Skurnik M, Meurman O, Ruuskaren O, Alanen A, Kollilainen E, Toivanen P, Kotilainen P. Direct Amplification of rRNA Genes in Diagnosis of Bacterial Infections. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1):32-39.
12. Margall N, Majó M, Sánchez F, Roig C, Latorre C, Fontanals D, Domínguez A, Lobera E, Sanfeliu I, Prats G. Valoración de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la meningitis causada por *Neisseria meningitidis* y *Haemophilus influenzae*. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 1999; 17(1):3-6.

Detection and identification by PCR of microorganisms causing bacterial meningitis

Abstract

Our work reports the use of genomic DNA primers previously purified from reference strains to detect and identify the microorganisms that cause bacterial meningitis (BME) in 24 samples of cerebrospinal fluid (CSF). General and specific primers derived from the 16S rRNA (ribosomal RNA) gene were used. The general primers were amplified in all the bacterial species analyzed: *Neisseria meningitidis*, type b *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus sp.* in the same 825 pb band, but the specific ones only amplified in the microorganism from which they were derived. Bands of 667, 478 and 253 pb were respectively obtained for *N. meningitidis*, *H. influenzae* and *Streptococcus sp.* *Streptococcus agalactiae* was also detected by PCR in which a 478 pb band was obtained. Upon evaluating the primers in clinical CSF samples, 100% detection of the BME causing microorganisms was observed. The specificity was 100%. The PCR products were analyzed by Hae III digestion, and correspondence found for the restriction patterns of the clinical samples and the reference strains.

Key words: PCR, Bacterium, ribosomal RNA, gene, CSF, BME