

Biomédica 2003;23:208-12

COMUNICACIÓN BREVE

Correlación entre la tipificación capsular de aislamientos colombianos de *Haemophilus influenzae* por el método de aglutinación en lámina y la técnica de PCR

Marylin Hidalgo, Claudia Parra, María Victoria Ovalle, Clara Inés Agudelo, Elizabeth Castañeda
Grupo de Microbiología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

En 1998 se inició en Colombia la inmunización de niños menores de un año de edad con la vacuna conjugada contra *Haemophilus influenzae*, serotipo b. En el 2000, el programa de vigilancia del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud informó una disminución de 40% de los casos de meningitis por este microorganismo, la cual se atribuyó a la vacunación. En este programa de vigilancia se utiliza de rutina la técnica estandarizada de aglutinación en lámina para la tipificación capsular de *H. influenzae*. El objetivo de este trabajo fue establecer la concordancia entre la prueba de aglutinación en lámina y la técnica de PCR. Se estudiaron con ambas técnicas 146 aislamientos clínicos invasores de *H. influenzae*, obtenidos de niños menores de 5 años, recolectados a partir de 1999 hasta 2002, identificados y serotipificados por el laboratorio de referencia como parte de la vigilancia de la meningitis bacteriana aguda y la infección respiratoria aguda. Nuestros resultados mostraron una correlación de 93% en la tipificación capsular de *H. influenzae*, serotipo b, y de 92% con respecto al resto de serotipos. La técnica de aglutinación en lámina realizada con un estricto control de calidad continúa siendo una herramienta sensible y específica para la serotipificación de *H. influenzae*.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, serotipos, PCR, aglutinación en lámina.

Accuracy of the slide agglutination method evaluated with PCR in typing *Haemophilus influenzae* isolates

In 1998, the Colombian government initiated an immunization program for children under one year of age with a *Haemophilus influenzae* capsular type b conjugate vaccine. After two years, the surveillance program of the Colombian Instituto Nacional de Salud Microbiology Group reported a 40% decrease in meningitis cases caused by *H. influenzae*. This effect was attributed to the vaccination. The surveillance program uses the standardized slide agglutination technique to serotype *H. influenzae*. The current study validated the accuracy of the slide agglutination method by means of the PCR technique. From children under five years of age, 146 isolates were obtained. These were collected between 1999 and 2002, and were characterized by biochemical tests and serotyped by the INS as part of the surveillance program. PCR confirmed 93% of the *H. influenzae* serotype b and 92% of the other serotypes. When the slide agglutination technique is conducted under a strict quality control program, it remains a sensitive and specific tool for serotyping *H. influenzae*.

Key words: *Haemophilus influenzae*, serotypes, PCR, slide agglutination.

Correspondencia:

Elizabeth Castañeda, Avenida Calle 26 N° 51-60, Bogotá,
D.C., Colombia.
Teléfono: 220 7700, extensión 445
ecastaneda@ins.gov.co

Recibido: 10/03/03; aceptado: 27/05/03

Haemophilus influenzae es un cocobacilo inmóvil, Gram negativo, que puede o no presentar cápsula. Según la composición bioquímica de la cápsula, se han clasificado 6 tipos serológicos denominados de la a a la f. Casi el 95% de todas las infecciones graves atribuidas a *H. influenzae* son ocasionadas por el serotipo capsular b y

ocurren en niños menores de 6 años, especialmente en menores de 1 año (1-3). Las manifestaciones de la enfermedad invasora por *H. influenzae*, serotipo b, varían y las más serias son la meningitis y la neumonía (3).

La inmunización a partir de 1990 de niños menores de 1 año con la vacuna conjugada, ha reducido en 98% la incidencia de enfermedad invasora por *H. influenzae*, serotipo b, en los países que han alcanzado una buena cobertura de vacunación. Adicionalmente, la tasa de transmisión nasofaríngea de *H. influenzae*, serotipo b, también se ha visto reducida (4-6). En Colombia, según los datos obtenidos por el programa de vigilancia de meningitis bacteriana aguda del Grupo de Microbiología del Instituto Nacional de Salud, en el primer año del período posvacunal se observó una disminución aproximada de 40% de los casos de meningitis por *H. influenzae*, serotipo b, en menores de 1 año (7).

La prueba estándar para la serotipificación de *H. influenzae* es la aglutinación en lámina, la cual utiliza anticuerpos polivalentes y monovalentes dirigidos contra la cápsula; esta técnica ha sido utilizada de rutina por los laboratorios de referencia en los programas de vigilancia. Adicionalmente, existe la prueba de coaglutinación, la cual incrementa la sensibilidad de la reacción (8).

Recientemente, como parte del programa de vigilancia de *H. influenzae* de los Estados Unidos, el CDC informó una discrepancia de 20% en la prueba de aglutinación con los aislamientos identificados como serotipo b por los laboratorios estatales de salud del país (9,10). Para resolver las inconsistencias presentadas, el CDC implementó la técnica de PCR, descrita previamente por Falla y colaboradores (11), con la cual encontraron una discrepancia de 40% con los resultados de aglutinación en lámina. El mayor error se presentó con los aislamientos identificados como *H. influenzae*, serotipo b, de los cuales sólo 30% fueron confirmados por la técnica de PCR, el 70% restante fueron no capsulares o no tipificables (9,10).

Con base en las observaciones del CDC, se decidió estandarizar en nuestro laboratorio la PCR y

confirmar con ella el serotipo de los aislamientos invasores de *H. influenzae* recuperados de niños menores de 5 años y serotipificados por la técnica de aglutinación en lámina. Estos aislamientos han sido remitidos al Grupo de Microbiología como parte de los programas de vigilancia por laboratorio de la meningitis bacteriana aguda (MBA) y de la infección respiratoria aguda (IRA).

Materiales y métodos

Aislamientos

Se estudiaron 146 aislamientos clínicos de *H. influenzae* invasor recolectados a partir de 1999 y serotipificados por la técnica de aglutinación en lámina. De ellos, 29 (19%) habían sido serotipificados por algunos de los laboratorios de salud pública que participan en la vigilancia.

Como controles se utilizaron las siguientes cepas de *H. influenzae*: serotipo a (ATCC 9006), serotipo b (ATCC 10211), serotipo c (ATCC 9001), serotipo d (ATCC 9008), serotipo e (ATCC 8142) y serotipo f (ATCC 9033); *H. parainfluenzae* (ATCC 7901), *H. influenzae* no capsular (NC) (PHLS Oxford 14) y *H. influenzae*, serotipo b negativo (PHLS Oxford 11). Todos los aislamientos se cultivaron en agar chocolate suplementado, en atmósfera de 5% de CO₂, a 37 °C, por 18-24h.

Serotipificación

Para la técnica de aglutinación en lámina se emplearon antiseros polivalentes y monovalentes (Difco) de la a a la f; para realizar la técnica se colocaron 5 µl de una suspensión bacteriana, en solución salina equivalente al tubo 3 de la escala de McFarland; simultáneamente, se siguió el mismo procedimiento con el antisuero polivalente. Si existe aglutinación con la solución salina, el aislamiento se considera autoaglutinante; si, por el contrario, no existe aglutinación visible con ninguno, se le considera no capsulado.

Si no se observa aglutinación con la solución salina pero sí con el polivalente, el aislamiento se considera serotipificable; en este caso, se continúa con el antisuero monovalente b, ya que este serotipo es el más prevalente; si existe aglutinación visible, es necesario realizar aglutinación con el antisuero monovalente a para comprobar que no existe aglutinación con otro

antisuero monovalente; si con este último no se observa ninguna aglutinación, el aislamiento se considera *H. influenzae*, serotipo b. Si no se observa aglutinación con el serotipo b, se continúa con el serotipo a; si con este último se evidencia aglutinación, el aislamiento se considera *H. influenzae*, serotipo a, y así sucesivamente se continúa con la serotipificación hasta que el aislamiento dé evidencia clara de aglutinación con uno de los serotipos monovalentes. (comunicación personal, Mary Slack, PHLS de Oxford).

Para la prueba de coaglutinación se utilizaron reactivos del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia de México y se siguió la misma metodología descrita anteriormente.

Técnica de PCR

Obtención del ADN. Con una asada de 10 µl, se preparó una suspensión de *H. influenzae* en 100 µl de agua destilada estéril. Posteriormente, se extrajo el ADN por desnaturación llevando la suspensión a ebullición en baño María durante 10 minutos. Finalmente, se centrifugó durante 5 minutos a 12.000 rpm; 60 µl del sobrenadante se almacenaron a -20 °C (10).

Iniciadores. Se utilizaron 3 juegos de iniciadores: los VK I y II, que amplifican el gen Van Ketel, el cual indica la capacidad del aislamiento de *H. influenzae* de exportar la cápsula; los iniciadores OMP II y III, que amplifican el gen que codifica para una proteína de membrana exclusiva de *H. influenzae* y, finalmente, los iniciadores específicos para cada tipo capsular (10).

Metodología. La PCR se realizó según la metodología descrita por Falla y colaboradores (10). Las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes: cloruro de magnesio, 0,7 mM, dNTP 0,8 mM, *Taq*-polimerasa (Corpogen), 1,25 U, los iniciadores 0,25 µM y 2 µl ADN, en un volumen final de 20 µl. El programa utilizado fue de 30 ciclos con los siguientes intervalos: 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C y, después del último ciclo, 8 minutos a 72 °C. Se empleó un termociclador Thermal Blok II, Lab-Line.

La PCR para OMP/VK fue múltiple, es decir, se adicionaron, los cuatro iniciadores VK I y II, OMP I y III en la misma mezcla maestra, mientras que

la PCR para el tipo capsular se llevó a cabo individualmente y solamente se adicionó un par de iniciadores para el tipo capsular a determinar (10).

Detección de los productos de PCR. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (GibcoBRL) en solución tampón TBE 1X, la cual contenía 7 µl de una solución de bromuro de etidio a 500 µg/ml. La electroforesis se corrió a 90 voltios, durante 1 hora y 20 minutos; las fotos se tomaron en una cámara polaroid Kodak. Los tamaños de los productos amplificados se compararon con un control positivo y con el marcador de peso molecular de 1kb (Promega).

Resultados

La PCR se estandarizó utilizando los controles negativos y positivos para cada serotipo y los resultados fueron concordantes con lo esperado.

Los 146 aislamientos estudiados expresaron el gen OMP, es decir, todos fueron identificados correctamente como *H. influenzae*; de éstos, 38 (26%) no expresaron el gen Van Katel, por lo que fueron considerados como no capsulados (NC); de los 108 (74%) aislamientos restantes, 101 (94%) fueron serotipo b y 7 (6%) serotipo a.

La discrepancia de la técnica de aglutinación en lámina con la técnica de PCR fue del 7,5%, para el serotipo b fue de 6,5% (100/107), en el serotipo a no se presentaron discrepancias y los 3 aislamientos clasificados por aglutinación como serotipo c fueron no capsulares (cuadro 1). La principal causa de error en la serotipificación (10/11, 91%) fue la de asignar un serotipo capsular a un aislamiento no capsulado. Sólo un aislamiento que había sido identificado como no capsular correspondió a serotipo b (1/11).

Al analizar los serotipos de los 29 aislamientos tipificados en los laboratorios de salud pública, se encontró una discrepancia de 17% (5/29) con la prueba de aglutinación en lámina realizada en el Grupo y de 24% (7/29) con la prueba de PCR. Con esta última prueba, el principal error (5/7) fue que aislamientos identificados como capsulados (2 serotipo b y 3 serotipo c) eran no capsulados y el segundo error, que 2 aislamientos identificados como no capsulares eran serotipo b.

Cuadro 1. Correlación de la tipificación de la cápsula de *H. influenzae* por la técnica de aglutinación y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en aislamientos invasores clínicos recolectados entre 1999-2002.

Serotipificación	PCR						
	INS		Discrepancia				
Serotipo	n	Concordancia		No capsular		Capsular	
		n	%	n	%	n	%
a	7	7	100	0	0	0	0
b	107	100	93	7	6,5	0	0
c	3	0	0	3	100	0	0
NC	29	28	97	0	0	1*	3
Total	146	135	92,5	10		1	

* Aislamiento serotipo b.

Todos los aislamientos en los que se estableció discrepancia con la PCR se serotipificaron nuevamente por la técnica de aglutinación en lámina y por coaglutinación y en todos se resolvió la discrepancia.

Discusión

Después de la introducción de la vacuna en el esquema del Programa Ampliado de Inmunizaciones en 1998, el número de aislamientos que llegan para serotipificación como parte de los programas de vigilancia de MBA e IRA se ha visto reducido y, por esta razón, esta técnica de rutina se realiza con menor frecuencia en los laboratorios tanto clínicos, como de salud pública y en el INS, lo que posiblemente ocasiona mayor número de errores en los resultados (7,10). Debido a la importancia de vigilar la circulación del serotipo b en el período posvacunal, es necesario confirmar con otras técnicas el serotipo de los aislados de *H. influenzae* remitido a los laboratorios de referencia.

Por esta razón, se estandarizó la técnica de PCR descrita por Falla por su alta especificidad y sensibilidad, la cual permitió identificar correctamente todos los serotipos de las cepas control (11).

En este estudio, encontramos que la discrepancia de la serotipificación en lámina entre los laboratorios de salud pública y el INS (17%) fue similar a la encontrada por el CDC con sus laboratorios estatales (20%). La discrepancia

entre las técnicas de aglutinación en lámina y PCR realizadas por el INS fue de 7,5%, en contraste con 40% informado por el CDC con los laboratorios estatales de salud (9,10). Cuando se analizó la discrepancia en el serotipo b encontramos que para el INS fue de 6,5% comparada con 70% informada por el CDC. Es importante resaltar que en este estudio, la serotipificación en lámina fue realizada por el laboratorio nacional de referencia y en el estudio del CDC ésta fue realizada por los laboratorios de salud pública estatales de Estados Unidos, lo que podría explicar la diferencia entre los resultados.

Similar a lo encontrado por el CDC, el principal error fue el de identificar como cepas capsulares cepas no capsulares, en la mayoría de los casos identificadas como serotipo b. Esto podría deberse a que cualquier aglutinación se consideró como positiva o a las reacciones cruzadas que se presentan con los aislamientos no capsulares, lo que lleva a una mala interpretación de la aglutinación (10). Cabe resaltar que cuando se repitió la técnica de aglutinación todas las discrepancias se corrigieron, lo que indica que esta técnica continua siendo la técnica estándar para la serotipificación de *H. influenzae*, pero es importante contar con un protocolo estandarizado, con los controles de calidad y con todos los antisueros respectivos (polivalente y monovalentes de la a a la f).

En este estudio se presentó un error que no fue informado por el CDC, cepas identificadas como NC por la técnica de aglutinación en lámina, resultaron serotipo b por PCR, lo cual enfatiza nuevamente la necesidad del control de calidad de la técnica de aglutinación.

Los programas de vigilancia de la MBA e IRA son muy importantes para determinar la presencia de casos de enfermedad invasora causada por *H. influenzae*, serotipo b, para determinar la disminución de este tipo de infección y, además, para determinar el incremento de la enfermedad invasora causada por otros serotipos. Por esto es necesario mantener esta vigilancia y garantizar la calidad de los resultados, utilizando en los laboratorios de referencia no sólo las técnicas de rutina, sino las técnicas moleculares que son más sensibles y específicas.

Referencias

1. **Peltola H, Virtanen M.** Systemic *Haemophilus influenzae* infection in Finland. *Lin Pediatr* 1984;5:275-80.
2. **Bijlmer HA.** Worldwide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis; industrialized versus non-industrialized countries. *Vaccine* 1991;9:S5-9.
3. **Shapiro ED, Ward JI.** The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Epidemiol Rev* 1991;13:113-38.
4. **Peltola H, Aavitsland P, Hansen KG, Jónsdóttir KE, Nokleby H, Romanus V.** Perspective: a five-country analysis of the impact of four different *Haemophilus influenzae* type b conjugates and vaccination strategies in Scandinavia. *J Infect Dis* 1999;179:223-9.
5. **Murphy TV, White KE, Pastor P, Gabriel L, Mece F, Granoff DM, et al.** Decline incidence of *Haemophilus influenzae* type b disease since introduction of vaccination. *JAMA* 1993;269:246-8.
6. **Peltola H.** Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st 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* 2000;13:302-13.
7. **Agudelo C, Muñoz N, De la Hoz F.** Evaluación rápida del impacto de la vacuna contra *Haemophilus influenzae* serotipo b en Colombia. *Rev Panam Salud Pública* 2000;8:181-4.
8. **Campos MJ.** *Haemophilus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of clinical microbiology*. Seventh edition. Washington, D.C.: ASM Press; 1999. p.604-24.
9. **LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, Noble CA, Rosenstein NE, Popovic T, et al.** Serotyping discrepancies in *Haemophilus influenzae* type b disease- United States, 1998-1999. *MMWR* 2002; 8:706-7.
10. **LaClaire LL, Tondella ML, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, et al.** Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *J Clin Microbiol* 2003;41:393-6.
11. **Falla TJ, Crook DWM, Brophy LN, Maskel D, Kroll JS, Moxon ER.** PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994;32:2382-6.