

Principales subtipos de proteína de membrana externa en cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b circulantes en Cuba

ISIS TAMARGO MARTÍNEZ,* MAYRA MUNE JIMÉNEZ,* OXANDRA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ,*
GILDA TORAÑO PERAZA,* KIOMY FUENTES GORT*

RESUMEN

Antecedentes: la meningitis por *Haemophilus influenzae* es una enfermedad infecciosa frecuente en niños. En regiones donde no se han llevado a cabo campañas de vacunación efectivas el serotipo b continúa siendo el más aislado de muestras de líquido cefalorraquídeo en niños menores de cinco años. **Objetivo:** caracterizar mediante el análisis de las proteínas de membrana externa (PME) las cepas aisladas en las diferentes regiones de Cuba. **Material y métodos:** se realizó un subtipaje de 500 cepas de *Haemophilus influenzae* mediante el análisis de las PME por SDS-PAGE. **Resultados:** los subtipos más frecuentemente encontrados fueron: 18L (41%) y 2L (32%). Otros subtipos hallados fueron: 12U (7%), 13L (3%) y 1L (3%). **Conclusiones:** a pesar de que las cepas procedían de infecciones por bacterias invasoras, los subtipos de PME más frecuentemente aislados difieren de los reportados en estudios similares en otras regiones geográficas. La distribución de los patrones de PME no muestra diferencias significativas entre occidente, centro y oriente de Cuba.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*, subtipaje, proteínas de membrana externa.

ABSTRACT

Background: Meningitis by *Haemophilus influenzae* is a very common infectious disease in children. In areas where vaccination campaigns have not been effective, serotype b continues to be the most isolated from cerebrospinal samples in children five years old or less. **Objective:** To characterize strains isolated from several regions of Cuba by outer membrane protein (OMP) analysis. **Material and methods:** It was made a subtype of 500 isolated strains of *Haemophilus influenzae* by outer membrane protein (OMP) by SDS-PAGE. **Results:** The majority were 18L (41%) and 2L (32%). 12U (7%), 13L (3%) and 1L (3%) were another subtypes found. **Conclusions:** In spite of the strains were originated by invasive infections, most of OMP isolated subtypes are different to those in other geographic areas. The distribution of OMP patterns was not different among the western, center and eastern areas of Cuba.

Key words: *Haemophilus influenzae*, subtyping, outer membrane protein patterns.

INTRODUCCIÓN

La meningitis por *Haemophilus influenzae* (Hi) es una enfermedad infecciosa frecuente en niños y causa todos los años altas tasas de morbilidad y mortalidad en muchos países. En regiones donde no se han llevado a

cabo campañas de vacunación efectivas, el serotipo b continúa siendo el más aislado de muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) en niños menores de cinco años, siendo éstas, por lo tanto, las cepas que dentro del género más se han estudiado y de las que con mayor precisión se han determinado sus principales características fenotípicas y genómicas.

Los sistemas de caracterización que hasta la fecha se han descrito incluyen el serotipaje,¹ biotipaje,² subtipaje por PME,³ serotipaje LPS,⁴ y métodos moleculares, tales como electroforesis en campo pulsante, entre otros.⁵

El subtipaje basado en el análisis de la migración de

* Laboratorio Nacional de Referencia de *Haemophilus*, La Habana, Cuba.

Correspondencia: Dra. Isis Tamargo Martínez. Instituto de Medicina Tropical Pedro Koury (IPK), Laboratorio Nacional de Referencia de *Haemophilus*, Autopista Novia del Mediodía, Apdo. 601, Marianao 13, La Habana, Cuba.

Recibido: noviembre, 1998. **Aceptado:** enero, 1999.

las PME en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se ha utilizado ampliamente para la caracterización de cepas de *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), pues ha resultado ser uno de los métodos de mayor poder discriminatorio desde el punto de vista epidemiológico.⁶⁻⁸

Se han descrito dos sistemas de subtipaje de PME, uno desarrollado por Barenkamp y col.⁹ el cual ha sido principalmente en Estados Unidos donde ha permitido la clasificación de las cepas en 21 subtipos. El otro sistema, desarrollado por Van Alphen, se ha utilizado en Europa y en diferentes regiones del mundo para el estudio de las cepas circulantes.^{8,10,11}

En Cuba, desde 1993, Hib es el agente bacteriano que más se aísla en muestras de LCR en edades pediátricas; sin embargo, existe poca información publicada y los estudios relacionados con el tema se basan fundamentalmente en hallazgos clínico-epidemiológicos.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Tamargo I y col., enviando a Rev Cub Med Trop) se ha determinado que el serotipo b se aísla (98.5%) de los casos de MEB en niños menores de cinco años, siendo, además, el biotipo I el más frecuente (76%). Se han encontrado otros serotipos y biotipos, pero en bajas proporciones.

El presente trabajo constituye el primer reporte de caracterización por subtipaje de PME de las cepas aisladas en las diferentes regiones de Cuba.

Un estudio de este tipo resultaba imprescindible para el mejor conocimiento de las características de nuestras cepas y proporciona una valiosa herramienta para futuros trabajos de análisis epidemiológicos y moleculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Entre noviembre de 1989 y diciembre de 1995, se recibieron en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Haemophilus* del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri, 500 cepas de Hib aisladas de LCR de niños menores de cinco años con meningitis.

La distribución de las cepas estudiadas de acuerdo con la región geográfica fue como se describe a continuación: occidente: 251 cepas, centro 97 cepas, oriente: 152 cepas.

Cada paciente estuvo representado por un aislamiento. El aislamiento primario de las cepas de Hi se hizo en Agar chocolate. La identificación de Hi se efectuó según sus características morfológicas-culturales y a los requerimientos de los factores X y V de

acuerdo con el método descrito por Kilian.² La confirmación de Hib se realizó por aglutinación de partículas de Latex de acuerdo con el método descrito por Dirks-Go¹ y utilizando el equipo comercial Wellcome (Diagnostics, United Kingdom) inmediatamente después de la identificación inicial todas las cepas se almacenaron a -70°C en BHI suplementado con glicerol al 15%, hasta que se procedió a la determinación de los patrones de PME por SDS-PAGE, de acuerdo con el método de Van Alphen y col.¹⁰

Los extractos de PME se obtuvieron de acuerdo con el método de Carlone,¹² con modificaciones. Las células se obtuvieron por centrifugación a $6000 \times g$ durante 20 min, resuspendidas en 2 ml de solución tamponada 10 Mm (HEPES) (N-2-hidroxyethylpiperazine N-2-ethanesulfonic acid) pH 7.4 y luego fueron sonicadas en hielo durante tres ciclos de 60 segundos, a máxima potencia con 30 segundos de descanso (Soniprep 150).

Los detritus celulares se eliminaron centrifugando a $6000 \times g$ durante 10 min. Las envolturas celulares fueron sedimentadas a $13000 \times g$ durante 1 h a 4°C y tratadas con lauryl sarcosinato de sodio al 2% durante 30 min. El sedimento obtenido luego de centrifugar a $13000 \times g$ 1 h a 4°C se resuspendió en 100 μl de buffer muestra 0.0625 M Tris HCL (HP 6.8) m 10% glicerol, 2% SDS, 5% 2 β mercaptoetanol y 0.001% azul de bromofenol. Las mezclas se calentaron a 100°C durante 10 minutos antes de ser aplicadas al gel.

La corrida electroforética se llevó a cabo durante dos horas a voltaje constante (120V) utilizando patrones de masa molecular (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California) y muestras de subtipos conocidos de PME (suministrados por L. Van Alphen, Universidad de Amsterdam). Los geles fueron coloreados con azul brillante de Coomassie G-250.

El patrón de PME obtenido para cada cepa estudiada fue analizado por dos observadores.

Las cepas se agruparon tomando como criterio la región de nuestro país en que se aislaron. De esta forma quedaron conformados tres grupos: occidente, centro y oriente.

La distribución de los subtipos de PME encontrada se comparó estadísticamente a través de una prueba χ^2 con $\alpha=0.01$.

RESULTADOS

Un total de 500 cepas se caracterizaron mediante el subtipaje de PME. Los subtipos 18L y 2L fueron los que

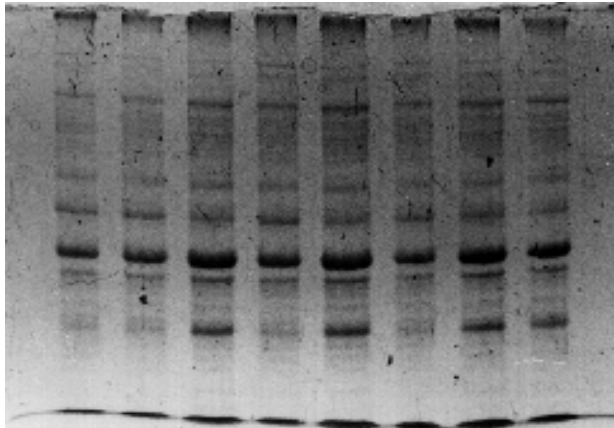


Figura 1. Perfiles proteicos de cepas subtipo 18L.
Línea 1 = cepa patrón 18L.
Líneas 2-8 = cepas aisladas de LCR en niños con meningitis.

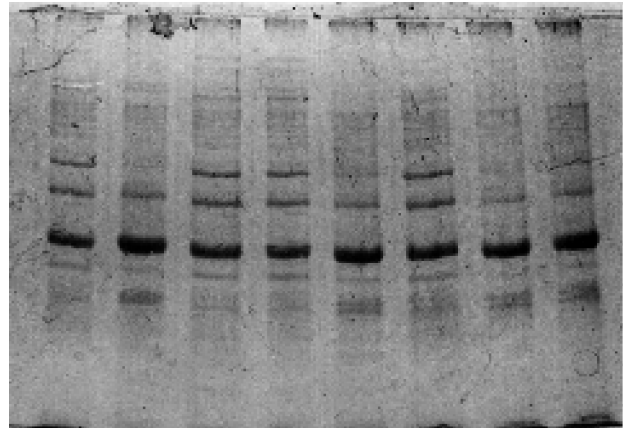


Figura 2. Perfiles proteicos de cepas subtipo 2L.
Línea 1 = cepa patrón subtipo 2L.
Líneas 2-8: cepas aisladas de LCR en niños con meningitis.

con mayor frecuencia se encontraron 41 y 32% respectivamente) (figuras 1 y 2). La distribución del resto de los subtipos encontrados en relación con la región del país estudiada se muestra en el cuadro 1.

Aunque las cepas estudiadas se aislaron en diferentes periodos, la frecuencia de los subtipos encontrados no varió entre las diferentes regiones del país, detectándose que la mayor parte de las cepas (73%) pertenecían a dos subtipos de PME: 18L y 2L.

En el resto de los aislamientos se encontraron otros subtipos, pero en menor proporción: 12U (7%), 13L (3%) y 1L (3%), por lo que los estudios de subtipaje deben continuar para definir la relativa frecuencia de estos patrones menos comunes.

En 14% de las cepas estudiadas los subtipos no pudieron ser determinados pues sus patrones de PME no fueron idénticos a ninguna de las cepas patrones utilizadas por nosotros.

La distribución de los subtipos de PME no difiere significativamente entre las tres regiones estudiadas. Los subtipos encontrados por nosotros se distribuyen en cada región con una frecuencia equivalente a la observada para todo el país.

DISCUSIÓN

El subtipaje por PME en SDS-PAGE se ha recomendado y utilizado desde la década de 1980 para la diferenciación desde el punto de vista epidemiológico de cepas invasivas de *Haemophilus influenzae* pertenecientes al serotipo b. Este método proporciona marcadores de alta reproducibilidad y gran poder discriminatorio.

En sentido general, los estudios realizados hasta la fecha, demuestran diferencias en la distribución de los subtipos entre grandes regiones geográficas, pero no dentro de un mismo país. La carencia de reportes de

Cuadro 1. Distribución geográfica de los subtipos de PME de Hib aisladas de LCR de niños menores de cinco años con meningitis

Subtipo de PME	Occidente		Núm. de aislamientos por región geográfica				Total	(%)
	(%)		Centro	(%)	Oriente	(%)		
18L	111	(44)	32	(33)	61	(40)	204	(41)
2L	79	(31)	38	(39)	44	(29)	161	(32)
12U	19	(8)	9	(9)	8	(5)	36	(7)
13L	9	(4)	2	(2)	6	(4)	17	(3)
1L	9	(4)	1	(1)	5	(3)	15	(3)
No determinado	24	(9)	15	(16)	28	(19)	67	(14)
Total	251	(100)	97	(100)	152	(100)	500	(100)

este tipo en regiones isleñas similares a las de Cuba nos motivó a realizar el presente trabajo.

De acuerdo con el estudio desarrollado podemos afirmar que en nuestro país predominan pocos subtipos de Hib y la distribución de los mismos es homogénea en todas las regiones de Cuba.

De acuerdo con varios estudios realizados⁸⁻¹¹ todos los subtipos encontrados en nuestro trabajo se han reportado con anterioridad en otras regiones del mundo, pero con diferencias notables en cuanto a su frecuencia de aparición.

El subtipo 18L (figura 1) que constituyó el más frecuentemente aislado en nuestras cepas, se encontró en sólo 11% de las cepas invasivas de Francia e Inglaterra.¹³

El segundo subtipo más detectado por nosotros fue el 2L (figura 2), el cual estuvo presente en 18% de las cepas estudiadas en Estados Unidos,⁶ pero raramente encontrado en Europa.¹³ En Dinamarca, por ejemplo, se aisló en 10% de las cepas estudiadas y en Holanda sólo 2% de las cepas se corresponden con este patrón de PME.¹⁰

Una excepción en Europa la constituye Islandia, donde el subtipo 2L sí es aislado con alta frecuencia (91%), pero con la peculiaridad de que 83% de estas cepas se clasifican como serotipo 9 de LPS (las cepas cubanas se clasifican en su gran mayoría como serotipos 1 y 2 LPS, datos enviados a la revista por Oswaldo Cruz para su publicación). En cambio, en Dinamarca y Holanda el subtipo 2L, además de ser poco frecuente, está relacionado con el subtipo 1 y 2 de LPS, respectivamente.¹⁰

Otro elemento interesante en nuestros resultados lo constituye el hallazgo del subtipo 12U. Nos llama la atención que este subtipo no aparece reportado en la literatura consultada. Por otro lado, el subtipo 13L se ha encontrado en portadores sanos, por lo que los autores sugieren una virulencia disminuida.¹⁰ Nosotros aislamos este subtipo con muy baja frecuencia entre nuestras cepas, resultado que se ajusta a los obtenidos por otros autores, quienes lo aislaron esporádicamente de procesos invasivos cepas del subtipo 13L en Finlandia y Suiza.^{14,15}

El subtipo 1L es reportado reiteradamente por Van Alphen y col. en cepas de Hib recuperadas de pacientes con MEB; sin embargo, nosotros lo recuperamos en sólo 3% de nuestras cepas, también provenientes de procesos invasivos. Este subtipo fue notificado por vez primera en Europa, por Takala y col. y estuvo representado en 21% de las cepas de Hib tipo b

estudiadas en Finlandia. Sin embargo, durante ese mismo periodo, van Alphen y col. no lo reportaron en un estudio efectuado con cepas de diferentes países de Europa Occidental.

Más recientemente Leaves y Jordan reportan el subtipo 1L en Inglaterra, y Mulleran y col. demostraron su circulación en 10% de las cepas aisladas de procesos invasivos en niños suizos.¹⁶

Nuestros hallazgos evidencian importantes diferencias en la frecuencia de aislamiento de los distintos subtipos de PME de Hib en Cuba con respecto a otros países y reafirman una vez más la hipótesis sobre su distribución geográfica restringida, de acuerdo con lo cual ciertos subtipos de PME, probablemente clones, no se propagan a través de barreras naturales.^{4,13}

Este estudio constituye el primer reporte sobre los subtipos de PME de Hib circulantes en Cuba y permite que por vez primera contemos en nuestro país con un sistema de caracterización internacionalmente aceptado para la vigilancia epidemiológica de este agente. No obstante, el hecho de que en 14% de las cepas estudiadas no pudieran identificarse los subtipos, hace que sea necesario continuar estudios similares para determinar si los mismos corresponden a nuevos subtipos no reportados en el ámbito internacional o a alguno encontrado de manera esporádica por primera vez en estudios realizados más recientemente relacionados con el tema.

CONCLUSIONES

Se describen por primera vez los subtipos de PME de *Haemophilus influenzae* tipo b aislados de niños menores de cinco años que padecían meningitis. Se demuestra que la distribución geográfica de los diferentes subtipos en el país es homogénea. Se deben continuar estudios similares para conocer si en el 14% de las cepas en que no se detectó el subtipo se encuentran algunos no descritos en el ámbito internacional.

REFERENCIAS

1. Dirks-go SIS, Zanen Hc. Latex agglutination, counter immunoelectrophoresis and protein A-coagglutination in diagnosis of bacterial meningitis. J Clin Pathol 1978;31:1167-71.
2. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J Gen Microbiol 1976;93:59-62.
3. Loeb MR, Smith DH. Outer membrane protein composition in disease isolates of *Haemophilus influenzae*: pathogenic and epidemiological implications. Infect Immun 1980;30:709-19.
4. Van Alphen L, Bijlmer H. Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b. Pediatrics 1990;85(Suppl.):636-42.

5. Curran R. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of insertion mutations in the transferrin-binding system of *Haemophilus influenzae* type b. J Med Microbiol 1994;41(2): 120-6.
6. Barenkamp S, Munson R Jr, Granoff D. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. J Infect Dis 1990;143:668-7.
7. Agarwae V, Jain D, Pathak AA, Saoji AM. Characterization of invasive *Haemophilus influenzae* isolated in Nagpur, Central Indian. Indian J Med Res 1996;103:296-8.
8. Clements DA, Maciannes SJ, Gilbert GL. Outer membrane protein subtypes of *Haemophilus influenzae* type b isolates causing invasive disease in Victoria, Australia, from 1988 to 1990. J Clin Microbiol 1992;30:1879-81.
9. Barenkamp S, Munson R Jr, Granoff D. Subtyping isolates of *Haemophilus influenzae* type b by outer membrane protein profiles. J Infect Dis 1990;143:668-7.
10. Van Alphen L, Riemens T, Poolman J, Hopman C, Zanen H. Homogeneity of cell envelope protein subtypes, lipopolysaccharide serotypes, and biotypes among *Haemophilus influenzae* type b from patients with meningitis in the Netherlands. J Infect Dis 1983;148:75-81.
11. Bijlmer HA, van Alphen L, Geelen van der Broek L, Greenwood MD, Valkenburg HA, Dankert J. Molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b in the Gambia. J Clin Microbiol 1992;30:386-90.
12. Carlone GM. Diagnostic of *Haemophilus influenzae* type b. J Clin Microbiol 1985;22:708-13.
13. Van Alphen L, Van Den Broek LG, Lonsdotleir K. Distinct geographical distribution of subtypes of *Haemophilus influenzae* type b in Western Europe. J Infect Dis 1987;156:216-8.
14. Takala AK, Van Alphen, Eskola J, Palmgren, Bol J, Makela PH. *Haemophilus influenzae* type b strains of outer membrane subtypes 1 and 1c cause different types of invasive disease. Lancet 1987;II:647-50.
15. Muhlemann K, Balz M, Aebi S, Schopfer K. Molecular characteristics of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease during the period of vaccination in Switzerland: Analysis of strains isolated between 1986 and 1993. J Clin Microbiol 1996;3:560-3.
16. Leaves N, Jordan J. Developed of a ribotyping scheme for *Haemophilus influenzae* type b. Eur J Clin Microbiol 1994;13:1038-45.