

ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Evaluación pre-analítica de dos métodos de extracción de ADN para la amplificación del gen de la pneumolisina (PLY) de *Streptococcus pneumoniae*, en muestras de hemocultivo

Carolina Hernández G^a, Claudia Durán T^b,
María Teresa Ulloa F^c, Valeria Prado J.

Assessment of two DNA extraction methods to amplify the pneumolysin gene (PLY) from blood culture samples of Streptococcus pneumoniae

Background: *Streptococcus pneumoniae* is a common etiologic agent of invasive respiratory infections among children under 5 years of age and older adults. Isolation rates of *S. pneumoniae* by traditional culture techniques are low. **Aim:** To study the sensitivity and specificity of two different DNA extraction methods to amplify the *ply* gene, applied to three different types of blood culture broths, experimentally inoculated with *S. pneumoniae*. **Material and methods:** DNA was extracted from the cultures using an organic method or a technique that consists in dilution, washing with NaOH and concentration of the sample. This was followed by PCR amplification of a 355 pb fragment of the pneumolysin gene (*ply*). **Results:** The organic DNA extraction method inhibited the PCR reaction at all concentrations studied (0.6 to 10⁶ colony forming units/mL). Using the NaOH extraction, *ply* gene amplification was positive in all three blood culture broths, but only at concentrations of 10³ colony forming units/mL or higher. Using the same DNA extraction method, PCR was negative when the broths were inoculated with seven other related bacterial species, which results in a 100% specificity. **Conclusions:** Detection of *S. pneumoniae* by amplification of *ply* gene from blood cultures using the protocol of NaOH for DNA extraction is specific and provides results in a short lapse. However, the diagnostic sensitivity is not optimal, which limits its clinical use (Rev Méd Chile 2004; 132: 533-8).

(Key Words: Cytotoxins; Polimerase chain reaction; Streptolysins; *Streptococcus pneumoniae*)

Recibido el 21 de agosto, 2003. Aceptado en versión corregida el 1 de abril, 2004.

Financiamiento: Programa de Microbiología y Micología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Programa de Microbiología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

^aAlumna tesista, Carrera de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

^bTecnólogo Médico, Programa de Microbiología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

^cTecnólogo Médico, Magíster en Ciencias Mención Microbiología, Programa de Microbiología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Correspondencia a: Dra. Valeria Prado J. Av. Independencia 1027, Santiago. Fax: 56-2-7355855. Teléfono: 56-2-6786641. E mail: vprado@machi.med.uchile.cl

Streptococcus pneumoniae es uno de los principales agentes causales de infecciones respiratorias adquiridas en la comunidad y también de diversos cuadros invasivos^{1,2}. El diagnóstico etiológico en estas infecciones, especialmente en niños, se ve dificultado debido a la obtención de muestras poco representativas del foco infeccioso³. La muestra más accesible es la expectoración, pero obtener una expectoración de buena calidad es difícil y su sensibilidad es bastante reducida, en tanto el hemocultivo posee un bajo rendimiento diagnóstico con técnicas tradicionales.

En neumonías con bacteremia, el aislamiento de *S. pneumoniae* no supera el 25%⁴ y por ello se han ensayado técnicas de biología molecular, como la amplificación de genes específicos de *S. pneumoniae*, para aumentar la sensibilidad del hemocultivo, siendo necesario analizar diferentes protocolos de trabajo⁵.

Nuestro interés se orientó a evaluar dos métodos de extracción de ADN de *S. pneumoniae* a partir de hemocultivos, donde la eficacia de ambos se midió mediante la amplificación de un fragmento de 355 pb del gen de la pneumolisina (*ply*) por reacción de polimerasa en cadena (PCR). El gen de la pneumolisina (*ply*), codifica para una proteína característica de *Streptococcus pneumoniae* y no está presente en ninguna otra especie bacteriana⁶. Además, su secuencia es altamente conservada tanto en cepas típicas como atípicas, estas últimas responsables de diagnósticos erróneos mediante técnicas de rutina⁷, por lo que su amplificación mediante PCR, en muestras de hemocultivo, sería de gran ayuda en el diagnóstico precoz de infecciones por *S. pneumoniae*.

Uno de los problemas frecuentes de la técnica de PCR, cuando se aplica a muestras de sangre inoculadas en botellas de hemocultivo, son resultados falsos negativos debido a la presencia de compuestos inhibidores en este medio, tales como las porfirinas y diversos anticoagulantes: heparina, EDTA, polianetol sulfonato de sodio (SPS) etc^{8,9}. Además, la mayoría de las botellas comerciales de hemocultivo, contienen resinas captadoras de antibióticos cuyo efecto sobre la técnica de PCR no ha sido definido.

Por lo tanto, evaluamos la sensibilidad y especificidad de dos métodos de extracción de ADN a partir de muestras experimentales de hemocultivos inoculadas con *S. pneumoniae*, me-

diante la amplificación del gen *ply* por PCR, con el fin de proyectarla a situaciones clínicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas

Evaluación de la sensibilidad del ensayo. Se utilizó una cepa de *Streptococcus pneumoniae* aislada de un paciente con neumonía (identificada por susceptibilidad a optoquina y solubilidad en bilis).

Evaluación de la especificidad del ensayo. Se incluyeron las siguientes especies bacterianas: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, *Staphylococcus aureus*, *Moraxella catharralis* y *Haemophilus influenzae*. Las especies se seleccionaron considerando uno de los siguientes criterios: poseer alguna proteína similar a la pneumolisina, pertenecer al género *Streptococcus*, ser agente etiológico de infecciones respiratorias o formar parte de la microbiota orofaríngea.

2. Evaluación de la sensibilidad de la PCR en la de amplificación del gen *ply* desde hemocultivo

Inoculación del hemocultivo. El método de preparación del hemocultivo y la inoculación de éstos con concentraciones bacterianas seriadas de 0,6 UFC/ml hasta 1x10⁶ UFC/ml se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Fredericks et al⁹. Se utilizaron las siguientes botellas de hemocultivo pediátricas: Bactec Pēdi Plus/F (Becton-Dickinson), Pedi-BacT (Organon-Tecnica, Biomerieux) y Caldo Soya tripticasa - SPS 0,025% (TSB).

3. Métodos de extracción de ADN bacteriano a partir de hemocultivos inoculados con Streptococcus pneumoniae. A partir de diluciones seriadas se realizaron en forma paralela dos métodos de extracción de ADN en cada una de las tres botellas de hemocultivo. El primer método utilizado fue el descrito por Fredericks et al⁹, el cual se basa en una extracción orgánica del ADN, utilizando benzil alcohol e hidrocloreuro de guanidina. El segundo método utilizado fue el descrito por Waleed Abu Al Soud et al¹⁰, y se basa en dilución, lavado con NaOH y concentración de la muestra.

La extracción de ADN de las muestras de hemocultivo y de sus diluciones se realizó en el momento de ser inoculadas con *S. pneumoniae*

(tiempo 0), posteriormente se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂, para efectuar una segunda extracción de ADN (24 h) y una tercera a las 48 h. Paralelamente se realizó recuento bacteriano, para confirmar desarrollo bacteriano en las botellas, lo que asegura una concentración bacteriana final posible de detectar por PCR, descartando así la posibilidad de una PCR negativa por baja concentración de microorganismos.

Amplificación del gen *ply*. La selección de los partidores y el protocolo de amplificación fue el descrito por Dagan R et al¹¹. Los partidores utilizados fueron (Ply 1) 5' GTG ATA TTT CTG TAA CAG CTA CC 3' y (Ply 2) 5' GAG AAT TCC CTG TCT TTT CAA AG 3', los que generan un producto amplificado de 355 pb. Como controles de la reacción se utilizó: ADN de *S. pneumoniae* (control positivo), una muestra de hemocultivo inoculado con ADN de *S. pneumoniae* y sometida a ambos métodos de extracción (controles de amplificación) y agua como control negativo.

Determinación del polianetol sulfato de sodio (SPS) en el ADN extraído. Antecedentes bibliográficos reportan una inhibición de la PCR por acción del SPS contenido en las botellas de hemocultivo como anticoagulante, por lo que se realizó la medición del SPS a partir del ADN extraído mediante espectrofotometría, según la técnica descrita por Fredericks et al⁹.

4. Especificidad de la técnica de amplificación *ply* desde hemocultivo mediante PCR

Para evaluar la especificidad, se utilizaron las cepas seleccionadas según los criterios descritos anteriormente, a las cuales se les realizó la amplificación del gen *ply*. El ensayo fue realizado una vez establecida la sensibilidad, con una concentración de inóculo bacteriano para la extracción del ADN entre 8x10³ y 1x10⁴UFC/mL, ya que esta concentración mostró ser la más apropiada para visualizar la reacción de amplificación.

RESULTADOS

Sensibilidad de la técnica de PCR para la amplificación del gen *ply*. Método A: La técnica de extracción orgánica del ADN con benzil alcohol e hidrocloreuro de guanidina, dio resultados negativos mediante PCR, (Figura 1), incluso a una concentración de 1x10⁶ UFC/mL, situación que se repitió en los tres tipos de botellas, lo cual fue sugerente de la presencia de un inhibidor en la suspensión de ADN. Para descartar la interferencia del SPS unido al ADN extraído, se determinó con espectrofotómetro, la presencia de este compuesto, obteniéndose valores de 0,025 y 0,05%, los cuales son inferiores a las concentraciones señaladas como inhibitorias por otros autores⁹ (Tabla 1).

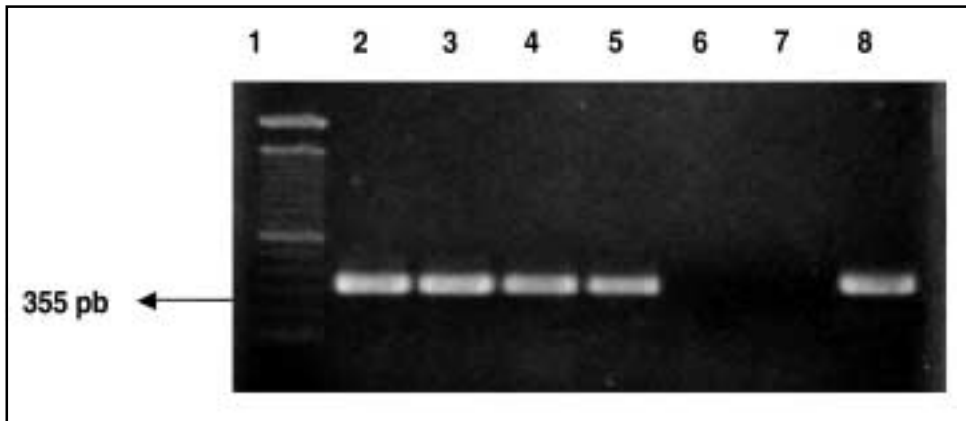


FIGURA 1. Comparación de ambos métodos de extracción de ADN, mediante la amplificación del gen *ply* por PCR. Carril 1: ladder 100 pb, carriles 2 al 5: productos de la amplificación del gen *ply* a partir de ADN extraído por el método B, carril 2: ADN de *Streptococcus pneumoniae* (concentración bacteriana 1x10⁶ UFC/ml); carril 3: dilución del ADN 1:10; carril 4: dilución del ADN 1:50; carril 5: dilución del ADN 1:100; carril 6: ADN extraído por el método A (concentración bacteriana 1x10⁶ UFC/ml); carril 7: control negativo; carril 8: control positivo.

Método B: Utilizando el método de extracción basado en lavados sucesivos con NaOH se obtuvo amplificación para el gen *ply* a partir de los tres tipos de botella de hemocultivo (tiempo 0) (Figura 1), observándose distintos niveles de sensibilidad analítica para cada tipo de botella: Bactec Pēdi Plus/F (Becton-Dickinson): 600 UFC/mL, Pedi-Bact (Organon Tecnica, Biomerieux): 1.800 UFC/mL y 2.600 UFC/mL para la TSB (Tabla 2). Sin embargo, no existe relación estadísticamente significativa entre el tipo de botella de hemocultivo

utilizada y la mínima concentración bacteriana detectada mediante PCR ($p=0,45$).

Además, mediante este método, luego de 24 y 48 h de incubación a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, todas las muestras resultaron positivas por PCR, siendo las concentraciones alcanzadas en los tres tipos de botella mayores a 10.000 UFC/ml.

Respecto a la especificidad analítica, ésta fue de 100%, en tanto la sensibilidad analítica fue de 37%, ya que los hemocultivos contaminados con menos de 1.000 UFC/mL de *S. pneumoniae*, dieron resultados negativos mediante PCR.

Tabla 1. Determinación del polianetol sulfonato de sodio (SPS) remanente en la suspensión de ADN extraído mediante el protocolo de Benzil alcohol e hidrocloreuro de guanidina mediante espectrofotometría

Longitud de onda (nm)	Absorbancia muestra	Absorbancia SPS 0,01%
284	0,095	0,545
330	0,024	0,019
380	0,022	0,014
480	0,019	0,007

DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica de PCR a muestras de hemocultivo presenta muchas dificultades, ya que la mayoría de los componentes de esta muestra son reconocidos inhibidores de esta técnica. El método con benzil alcohol e hidrocloreuro de guanidina, si bien logró separar el SPS debido a que esta molécula es atrapada por el benzil alcohol, mientras el ADN queda soluble en la fase acuosa, dio resultados negativos, aunque la extracción de ADN se realizó con éxito (datos no mostrados). La permanencia de un inhibidor potente y desconocido de la técnica de PCR no nos permitió evaluar la efectividad de este protocolo. La determinación del SPS desde el ADN extraído mediante espectrofotometría, nos indica que la técnica de extracción propuesta por Fredericks et al es efectiva en la eliminación del SPS, por lo que esta sustancia no es la causante de la inhibición de la técnica de PCR.

De acuerdo con lo observado, queda claro que la inhibición de la reacción de PCR es interna, es decir, uno de los reactivos utilizados durante la extracción es un potente inhibidor de la técnica de amplificación. Se realizaron experimentos con bacterias Gram negativas obteniéndose también resultados negativos (datos no mostrados). Según nuestras observaciones, el protocolo de extracción de ADN desde hemocultivo propuesto por Fredericks et al⁹ no es reproducible.

El segundo método utilizado, dilución, lavado con NaOH y concentración de la muestra, permite la eliminación de los inhibidores del hemocultivo, tanto por la dilución como por los lavados realizados a la muestra, ya que facilita la lisis de

Tabla 2. Sensibilidad de la amplificación del gen *ply* de *Streptococcus pneumoniae* mediante el método de dilución, lavado con NaOH y concentración de la muestra

UFC/ml	Método de extracción		
	Método B (WA Al Soud et al) Bactec Pēdi Plus/F	Pēdi BacT	TSB
1x10 ⁶	(+)	(+)	(+)
1x10 ⁵	(+)	(+)	(+)
1x10 ⁴	(+)	(+)	(+)
1.000	(+)	(+)	(+)
100	(+)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)
1	(-)	(-)	(-)
0,1	(-)	(-)	(-)
Control (+)	(+)	(+)	(+)
Control (-)	(-)	(-)	(-)

los glóbulos rojos, liberándose hemoglobina a la cual el SPS es capaz de unirse y formar un complejo, el que es eliminado con el lavado previo a la extracción de ADN. Este método de extracción de ADN permitió detectar la presencia de *S. pneumoniae* en muestras de hemocultivos con concentraciones de 600 UFC/mL, 1.800 UFC/mL y 2.600 UFC/mL, según la marca comercial.

La alta concentración bacteriana necesaria para obtener amplificación positiva del gen *ply* en botellas de hemocultivo podría explicarse por la probable pérdida de células bacterianas por los múltiples lavados, lo que hace necesario que la concentración basal de ADN de la muestra sea alta. Otra posibilidad es la presencia de inhibidores en el hemocultivo, los cuales no son eliminados, sólo diluidos, por lo cual si la concentración inicial de ADN es alta, la cantidad de los inhibidores remanentes en la muestra no influirá en la amplificación mediante PCR.

Este método de extracción de ADN presenta varias ventajas, entre ellas, su fácil implementación, es inocua, pues no utiliza reactivos corrosivos ni deletéreos para la salud, es de bajo costo y rápida (30 min). Entre las desventajas, a causa de la dilución y múltiples lavados realizados a las muestras, hay pérdida de células y genomas bacterianos, lo que se traduce en la disminución de la sensibilidad diagnóstica de la técnica de PCR.

Para mejorar la sensibilidad de la PCR en hemocultivos y alcanzar elevadas concentraciones bacterianas, es necesario la incubación previa de la muestra. En un ambiente propi-

cio, es posible alcanzar concentraciones adecuadas en el hemocultivo (>1.000 UFC/mL) en 2-4 h y de este modo la técnica de PCR anticipa en casi 24 h el resultado. Según nuestro estudio, la detección de bacteremias de más de 1.000 UFC/mL se obtuvo antes de 18 h de incubación, tanto por PCR como por cultivo en placa, teniendo así 100% de sensibilidad antes de 24 h.

En conclusión, el protocolo propuesto por Fredericks et al⁹, aunque es efectivo en la extracción de ADN y en la extracción de SPS desde el hemocultivo, no permite la amplificación de ADN mediante PCR, ya que uno de los reactivos incluidos en la extracción permanece como inhibidor de la reacción.

El protocolo propuesto por WA Al Soud et al¹⁰ es efectivo para la extracción de ADN desde hemocultivo, pero su baja sensibilidad diagnóstica, equivalente a la utilización de subcultivos en placa, no ofrece ventajas respecto a las técnicas bacteriológicas tradicionales aplicadas a los hemocultivos.

Si bien la detección mediante PCR es más rápida y específica que el cultivo, el elevado costo de la técnica de PCR hace que por el momento su uso clínico no resulte costo/efectivo.

La utilización del gen de la pneumolisina como blanco de amplificación para la identificación de *Streptococcus pneumoniae* mediante PCR es altamente específico, lo que permitiría el diagnóstico de este agente en otros líquidos estériles como LCR.

REFERENCIAS

- LAGOS R, SAN MARTÍN O, ERAZO A, AVENDAÑO A, LEVINE M Y GRUPO DE TRABAJO COLABORATIVO PARA EL DIAGNÓSTICO DE INFECCIONES PNEUMOCÓCCICAS DEL NIÑO. Epidemiología de las enfermedades invasoras causadas por *Streptococcus pneumoniae* en niños chilenos: Proyecciones clínicas y de salud pública. *Rev Chil Infect* 2001; 18 (Supl 1): 15-21.
- CABELLO H, RUIZ M, LUI A, RIVERA F. Neumonía comunitaria severa. Diagnóstico, pronóstico y pautas terapéuticas. *Rev Hosp Clín U de Chile* 1999; 10: 113-24.
- KERTESZ D, DI FABIO JL, DE CUNTO BRANDILEONE MC, CASTANEDA E, ECHANIZ-ÁVILÉS G, HEITMANN I ET AL. Invasive *Streptococcus pneumoniae* infection in Latin American children: results of the Pan American Health Organization surveillance study. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1355-61.
- MUFSON MA, STANEK RJ. Bacteremic pneumococcal pneumonia in one American City: a 20 years longitudinal study. 1978-1997. *Am J Med* 1999; 107 (1A): 34S-43S.
- Hassan-King M, Baldeh I, Secka O, Falade A, Greenwood B. Deteccion of *Streptococcus pneumoniae* in blood culture by PCR. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1721-4.

6. WHATMORE A, EFSTRATIOU A, PICKERILL A, BROUGHTON K, WOODARD G, STURGEON D ET AL. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis* and *Streptococcus mitis*: characterization of «atypical» pneumococci and organisms allied to *S mitis* harboring *S pneumoniae*. virulence factor - encoding genes. *Infect Immun* 2000; 68: 1374-82.
7. KEARN A, WHEELER J, FREEMAN R, SEIDERS P. Pneumolysin detection identifies atypical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1309-10.
8. TOIKKA P, NIKKARI S, RUUSKANEN O, LEIONEN M, MERTSOLA J. Pneumolysin PCR-based diagnosis of invasive pneumococcal infection in children. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 633-7.
9. FREDERICKS D, RELMAN D. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor Sodium Polyanetholeulfonate. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2810-6.
10. AL-SOUL W, LANTZ P-G, BÄCKMAN A, OLCÉN P, RADSTRÖM P. A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by the polymerase chain reaction. *J Microbiol Meth* 1998; 32: 217-24.
11. DAGAN R, SHRIKER O, HAZAN I, LEBOVITZ E, GREENBERG D, SCHLAEFFER F, LEVY R. Prospective study to determine clinical relevance of detection of pneumococcal DNA in sera of children by PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 669-73.