

Problemas actuales en la identificación clínica de *Streptococcus pneumoniae*



Ernesto García López

Profesor de Investigación de OPIs y trabaja en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). Hace más de 30 años se incorporó al equipo de investigación recién creado por los Drs. Concepción Ronda y Rubens López para investigar la biología de neumococo y sus fagos. En 1985, en colaboración con los Drs. Pedro García y José Luis García, el grupo logró la clonación del gen *lytA* y su expresión en *E. coli*. Este hecho representa el primer ejemplo en lo que se refiere a una autolisina bacteriana, y la secuencia correspondiente fue publicada un año más tarde. En los años siguientes se puso en evidencia la existencia de notables homologías entre el gen *lytA* del huésped y los genes responsables de la lisis bacteriana codificados por los fagos, líticos y atemperados, de neumococo. Además de estos aspectos básicos, el grupo ha puesto de manifiesto el importante potencial terapéutico de las enzimas líticas de pared de neumococo y sus fagos.

NÚMERO 54

36

LOS ESTREPTOCOCOS

Generalidades

Dentro del grupo integrado por, al menos, 17 géneros de cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos y con bajo contenido en G+C (<50 mol%), los miembros del género *Streptococcus* se caracterizan por ser de forma ovoide o esférica, formar cadenas más o menos largas y no producir catalasa¹. Desde el punto de vista sistemático, los estreptococos han sufrido cambios notables como consecuencia de la separación de nuevos géneros a partir de 1984². Actualmente, se conocen más de 75 especies de estreptococos (www.bacterio.cict.fr/s/streptococcus.html)

que se dividen en 6 grupos sobre la base de la secuencia del rRNA 16S³: *anginosus*, *bovis*, *mitis*, *mutans*, *piogenicus* y *salivarius*. Cuando se multiplican en medios sólidos conteniendo sangre, los estreptococos muestran tres tipos de reacciones: β -hemólisis (con un halo definido de desaparición del color de la sangre alrededor de la colonia), α -hemólisis (observándose una zona de color verdoso alrededor de la misma), o no hemólisis (a veces llamada γ -hemólisis). Mientras que la β -hemólisis supone la destrucción de los eritrocitos y es producida por hemolisinas solubles (como la estreptolisina L de *Streptococcus pyogenes*), la α -hemólisis es el resultado de la formación de metahemoglobina [forma oxidada (Fe^{3+}) del hierro del grupo hemo] por acción del H_2O_2 producido por estas bacterias⁴. Los estreptococos α -hemolíticos han sido también

denominados *viridans* por el color verdoso que muestran las placas alrededor de las colonias^{5,6} (Fig. 1A) y Facklam² ha propuesto clasificarlos en 5 grupos: mutans, salivarius, anginosus, sanguinis y mitis (en ocasiones se añade el grupo bovis). No obstante, hay que destacar el hecho de que la inclusión de algunos estreptococos en estos grupos o en los propuestos por Kawamura *et al.*³ no siempre resulta coherente. En general, se puede afirmar que buena parte de las especies pertenecientes al grupo piogénico (pero no todas) son β -hemolíticas (*S. pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus porcinus*, etc.) (Fig. 1B), mientras que las del grupo anginosus —integrado por *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* y *Streptococcus intermedius*— pueden ser α - o β -hemolíticas. Hay que destacar el hecho de que, posiblemente, con la única excepción de *Streptococcus thermophilus*, todos los estreptococos poseen un destacado potencial patogénico para el hombre, los animales o ambos.

Debido a la existencia comprobada de fenómenos de recombinación genética entre la mayoría de estreptococos^{7,8}, las barreras filogenéticas entre especies se ven difuminadas frecuentemente, con los problemas de identificación que ello acarrea. Este hecho es particularmente notorio entre los estreptococos α -hemolíticos y, en concreto, en el caso de los estreptococos del grupo mitis (EGM) de los que forma parte *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) (Fig. 1A).

EGM, UN CONJUNTO DE ESPECIES DIFÍCILES DE CLASIFICAR

Aunque considerados tradicionalmente como comensales y, en todo caso, como patógenos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos⁵, existen abundantes indicios en la actualidad que indican que los EGM, en colaboración

con otras bacterias presentes en la cavidad oral, pueden desempeñar un papel importante, previamente ignorado, en la patogenia de un buen número de enfermedades⁹. A este respecto, es importante resaltar el hecho que las bacterias del género *Streptococcus* son las más abundantes en la cavidad bucal, al menos en lo que a número de especies diferentes se refiere^{10, 11}.

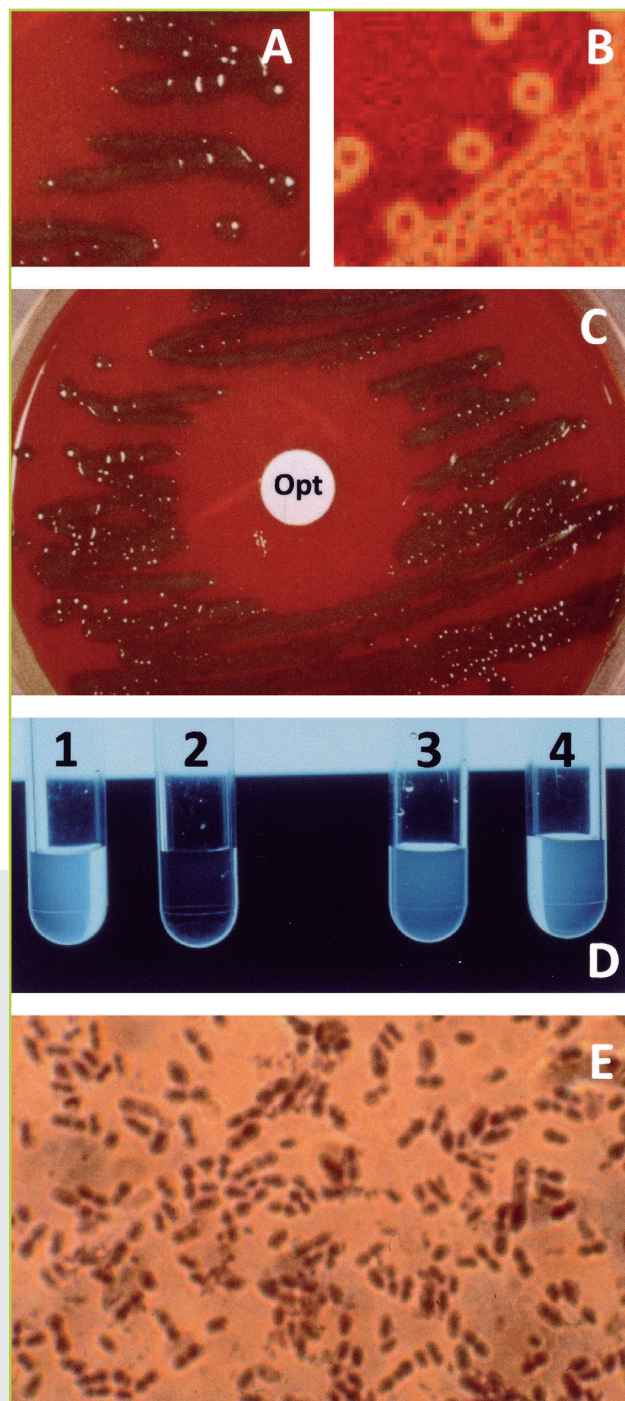


Fig. 1. Algunas características fisiológicas típicas de *S. pneumoniae*. Neumococo es un estreptococo α -hemolítico (A) en contraposición a *S. pyogenes* que produce β -hemolisis en la superficie de las placas de agar-sangre (B). (C) Inhibición del crecimiento de neumococo alrededor de un disco impregnado en optoquina (Opt). (D) Efecto lítico del desoxicolato sódico (Doc). Cultivos de neumococo (tubos 1 y 2) o de un EGM (*S. mitis*; tubos 3 y 4) fueron incubados con Doc (concentración final, 1%) durante 5 min a 37 °C (tubos 2 y 4). Los tubos 1 y 3 no recibieron detergente. (E) Reacción capsular (Quellung) de una cepa de neumococo en presencia de un antisuero capsular específico. El halo claro que rodea a las bacterias corresponde a la cápsula polisacáridica. Las fotos C–E son cortesía de la Dra. A. Fenoll (Instituto de Salud Carlos III).

NOMBRE	AÑO DE DESCRIPCIÓN	SECUENCIAS GENÓMICAS ^a	REFERENCIA ^b
<i>S. pneumoniae</i>	1901	152 (73) ^c	Chester. 1901. <i>A manual of determinative bacteriology</i> . The MacMillan Co. NY, pp. 63–64. Skerman <i>et al.</i> 1980. <i>IJSB</i> 30 , 225–420
<i>S. mitis</i>	1906	15	Andrewes & Horder. 1906. <i>Lancet</i> 168 , 708–713 Kilian <i>et al.</i> 1989. <i>IJSB</i> 39 , 471–484
<i>S. sanguinis</i>	1946	24	White & Niven. 1946. <i>JB</i> 51 , 717–722 Kilian <i>et al.</i> 1989. <i>IJSB</i> 39 , 471–484
<i>S. oralis</i>	1982	10	Bridge & Sneath. 1982. <i>IJSB</i> 32 , 410–415 Kilian <i>et al.</i> 1989. <i>IJSB</i> 39 , 471–484
<i>S. gordonii</i>	1989	2	Kilian <i>et al.</i> 1989. <i>IJSB</i> 39 , 471–484
<i>S. parasanguinis</i>	1990	7	Whiley <i>et al.</i> 1990. <i>FMB</i> 68 , 115–122
<i>S. cristatus</i>	1991	3	Handley <i>et al.</i> 1991. <i>IJSB</i> 41 , 543–547
<i>S. infantis</i>	1998	6	Kawamura <i>et al.</i> 1998. <i>IJSB</i> 48 , 921–927
<i>S. peroris</i>	1998	1	Kawamura <i>et al.</i> 1998. <i>IJSB</i> 48 , 921–927
<i>S. australis</i>	2001	2	Willcox <i>et al.</i> 2001. <i>IJSEM</i> 51 , 1277–1281
<i>S. sinensis</i>	2002	0	Woo <i>et al.</i> <i>JCM</i> 40 , 805–810
<i>S. oligofermentans</i>	2003	0	Tong <i>et al.</i> 2003. <i>IJSEM</i> 53 , 1101–1104
<i>S. pseudopneumoniae</i>	2004	3	Arbique <i>et al.</i> 2004. <i>IJCM</i> 42 , 4686–4696
<i>S. lactarius</i>	2011	0	Martín <i>et al.</i> 2011. <i>IJSEM</i> 61 , 1048–1052
<i>S. tigurinus</i>	2012	0	Zbinden <i>et al.</i> 2012. <i>IJSEM</i> 62 , 2941–2945
<i>S. troglodytidis</i>	2012	0	Zhang <i>et al.</i> 2012. <i>IJSEM</i> doi:10.1099/ij.s.0.038133-0

^a GOLD: Genomes OnLine Database (www.genomesonline.org). Incluye borradores y secuencias parciales.
^b *FML*, FEMS Microbiol. Lett.; *IJSB*, Int. J. Syst. Bacteriol.; *IJSEM*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol.; *JB*, J. Bacteriol.; *JCM*, J. Clin. Microbiol.
^c HOMD: Human Oral Microbiome Database (www.homd.org).
 Datos actualizados el 4 de septiembre de 2012.

Tabla 1. *Estreptococos incluidos en el grupo mitis (EGM).*

En la actualidad, hasta 16 especies forman parte del grupo de EGM (Tabla 1) y es destacable que todas ellas comparten una similitud, en el rRNA 16S, superior al 96%, y que supera el 99% en el caso de *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* y *S. oralis*. Es evidente, por tanto, que la mera determinación de la secuencia del rRNA 16S presenta problemas aparentemente irresolubles a la hora de identificar con precisión un aislado clínico perteneciente al grupo de los EGM^{12,13}. En este contexto, no parece necesario subrayar que los métodos bioquímicos tampoco son de gran utilidad práctica en la identificación precisa de este grupo de microorganismos y, frecuentemente, los diversos kits comerciales pueden proporcionar resultados contradictorios o, cuando menos, poco claros.

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE, UN PATÓGENO HUMANO DE PRIMERA DIVISIÓN

Entre los EGM, neumococo ocupa un papel preeminente ya que es un patógeno humano de enorme importancia y causa frecuente de, entre otras enfermedades, otitis media, neumonía adquirida en la comunidad, bacteriemia y meningitis, sobre todo en niños menores de 5 años y adultos mayores de 65. Se calcula que la tercera parte de las muertes anuales que se producen en el mundo son debidas a enfermedades infecciosas y, entre todas ellas, las enferme-

dades respiratorias son las responsables del fallecimiento de 4 millones de personas cada año¹⁴. De acuerdo con la estimaciones de la OMS, la sepsis, la neumonía neonatal y la neumonía comunitaria en niños mayores dan cuenta de casi el 30% de los 10.6 millones de muertes anuales en niños menores de 5 años, siendo *S. pneumoniae* el causante más frecuente de neumonía severa infantil, tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo¹⁵. Datos epidemiológicos recientes indican que neumococo es responsable de la muerte, en todo el mundo, de entre 700 000 y un millón de niños cada año. Además, también cada año, se producen casi 15 millones de casos graves de enfermedad neumocócica en la población infantil¹⁶. Por otra parte, algunos cálculos indican que los costes, directos e indirectos, producidos como consecuencia de las infecciones neumocócicas en personas de edad avanzada en EE.UU. pueden superar los 5000 millones de dólares anuales¹⁷. Desgraciadamente, a pesar de la introducción de las vacunas conjugadas antineumocócicas 7-valente y, más recientemente, 13-valente y debido, probablemente, al incremento en los casos de enfermedad invasiva causados por serotipos no incluidos en dichas vacunas, no está claro en la actualidad que la vacunación de la población infantil sea coste-efectiva¹⁸.

En los laboratorios de microbiología clínica de todo el mundo, cualquier estreptococo (preferentemente, diplococo) que forme colonias típicas en superficie con características α -hemolíticas (nótese que, en condiciones de baja concentración de O₂, neumococo produce β -hemólisis por la acción de la neumolisina Ply), es sometido a la prueba de la susceptibilidad a la optoquina (Opt) (Fig. 1C). La Opt (un derivado de la quinina) inhibe la ATPasa protón-motriz de la membrana de neumococo¹⁹. Además, en la mayoría de los países industrializados, los posibles neumococos (seleccionados como susceptibles a Opt) se tratan con desoxicolato sódico (Doc) ya que, en principio, sólo *S. pneumoniae* es lisado por este detergente (característica conocida clásicamente como «solubilidad en bilis») (Fig. 1D). Hasta la fecha, sólo se ha descrito un aislado clínico de neumococo que no se lisa con este detergente (debido a una mutación en el gen *lytA*)²⁰. El Doc destruye la membrana bacteriana disparando la actividad incontrolada de la autolisina LytA (lo que provoca una lisis total del cultivo en menos de 5 minutos)²¹. Finalmente, sólo algunos laboratorios especializados llevan a cabo la prueba de tipificación capsular (conocida clásicamente como reacción capsular o *Quellung*)²² (Fig. 1E). Dada la necesidad de un investigador bien entrenado para reconocer al microscopio algunas reacciones capsulares, en los últimos años se han desarrollado otras técnicas moleculares²³ e inmunológicas^{24,25} que, no obstante, en ocasiones, todavía pueden requerir una validación posterior por el procedimiento tradicional²⁶. Por otra parte, dado que los aislados clínicos de neumococo son típicamente capsulados (hasta el momento se han descrito al menos 94 tipos capsulares química e inmunológicamente diferentes)²⁷, la serotipificación tiene un enorme valor epidemiológico.

En principio, cualquier neumococo debe cumplir estas tres condiciones:

1. Ser sensible a Opt.
2. Lisarse en presencia de Doc.
3. Poseer cápsula polisacáridica.

No obstante, la dilatada experiencia acumulada desde el descubrimiento de neumococo en 1881, ha demostrado que existen verdaderos neumococos que no poseen esas tres propiedades (en ocasiones, ninguna de ellas) así como otros EGM que, sin pertenecer a la especie *S. pneumoniae*, muestran alguna (o algunas) de ellas^{28,29}. En estos casos, la identificación clínica precisa de tales aislados se ha demostrado muy complicada y ello, sin embargo, resulta imprescindible para poder aplicar al paciente un régimen terapéutico adecuado en el plazo más breve posible. Además, aunque tradicionalmente se ha asumido que los aislados no capsulados de neumococo eran avirulentos, no es infrecuente la demostración de diversas infecciones causadas por este tipo de neumococos, particularmente en casos de conjuntivitis y otitis³⁰.

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA INFECCIÓN NEUMOCÓCICA

Con el fin de determinar la existencia de características que permitan la discriminación entre neumococos y otras especies de EGM, la mayoría de los estudios recurre a la técnica de PCR para determinar la secuencia nucleotídica, parcial o total, de diferentes genes y su comparación entre aislados de especies modelo (Tabla 2). En la actualidad, esta aproximación experimental ha tomado un notable auge al incorporar nuevas técnicas como la PCR en tiempo real y la pirosecuenciación. La mayor parte de los genes utilizados con este fin están conservados en la mayoría, si no en todas, las bacterias, aunque el grado de conservación varía considerablemente y ello hace que unos genes proporcionen más información que otros. El límite podría estar en el caso de los genes codificantes del rRNA 16S en donde un reciente estudio ha propuesto que la existencia de un polimorfismo en una sola base en la posición 203 del gen que codifica el rRNA 16S sea considerado suficiente para distinguir *S. pneumoniae* (que posee una citosina) de otros EGM (que poseen una adenina) (Tabla 2). Algo similar sucede con el fragmento de DNA denominado Spn9802 (Tabla 2) que se ha propuesto que está solamente presente en cepas de *S. pneumoniae*. No obstante, un análisis de las secuencias depositadas en los bancos de datos demuestra que *S. pseudopneumoniae* posee una secuencia casi idéntica (2–3 mutaciones en 156 pb) (datos no publicados). Lo que parece deducirse de todo lo anterior es que, a pesar de todos los intentos realizados, la elección de un «patrón oro» en la identificación de neumococo está todavía por decidirse.

En los últimos años se han comercializado dos kits para la identificación de neumococo. El primero de ellos (AccuProbe™; Gen-Probe, Inc.) se basa en el reconocimien-

GEN/TÉCNICA	FUNCIÓN	REFERENCIA ^a
rRNA 16S	rRNA 16S	Scholz <i>et al.</i> 2012. <i>JCM</i> 50 , 1968–1973
rpoB	RNA polimerasa (subunidad b)	Drancourt <i>et al.</i> 2004. <i>JCM</i> 42 , 497–504 Glazunova <i>et al.</i> 2009. <i>IJSEM</i> 59 , 2317–2322
sodA	Superóxido dismutasa Mn-dependiente	Poyart <i>et al.</i> 1998. <i>JCM</i> 36 , 41–47 Glazunova <i>et al.</i> 2009. <i>IJSEM</i> 59 , 2317–2322
groEL	Proteína <i>heat-shock</i>	Teng <i>et al.</i> 2002. <i>JCM</i> 40 , 3172–3178 Glazunova <i>et al.</i> 2009. <i>IJSEM</i> 59 , 2317–2322
gyrB	DNA girasa (subunidad B)	Itoh <i>et al.</i> 2006. <i>SAM</i> 29 , 368–374 Glazunova <i>et al.</i> 2009. <i>IJSEM</i> 59 , 2317–2322
recN	Recombinación/replicación	Glazunova <i>et al.</i> 2010. <i>IJSEM</i> 60 , 2140–2148
tuf	Factor de elongación Tu	Picard <i>et al.</i> 2004. <i>JCM</i> 42 , 3686–3695
lytA	Principal autolisina	Véase texto
ply	Neumolisina	Véase texto
recA	Recombinación	Zbinden <i>et al.</i> 2011. <i>JCM</i> 49 , 523–527
Spn9802 ^b	Desconocida	Suzuki <i>et al.</i> 2005. <i>JCM</i> 43 , 4528–4534 Abdeladim <i>et al.</i> 2008. <i>DMID</i> 60 , 143–150
MLST ^c	<i>aroE, ddl, gdh, gki, recP, spi, xpt</i>	Enright & Spratt. 1998. <i>Mic</i> 144 , 3049–3060
MLSA ^c	<i>map, pfl, ppaC, pyk, rpoB, sodA, tuf</i>	Bishop <i>et al.</i> 2009. <i>BMC_B</i> 7 , 3
AccuProbe™	Sonda parcial de rRNA 16S	Denis & Carey. 1992. <i>JCM</i> 30 , 2725–2727
Binax NOW®	Detecta ácido teicoico (polisacárido C)	Dowell <i>et al.</i> 2001. <i>CID</i> 32 , 824–825
MALDI-TOF MS	Análisis de la pared celular	Drancourt. 2010. <i>CMI</i> 16 , 1620–1625 Werno <i>et al.</i> 2012. <i>JCM</i> 50 , 2863–2867
		Wieser <i>et al.</i> 2012. <i>AMB</i> 93 , 965–974

^a *AMB*, Appl. Microbiol. Biotechnol.; *BMC_B*, BMC Biol.; *BMC_ID*, BMC Infect. Dis.; *CMI*, Clin. Microbiol. Infect.; *DMID*, Diagn. Microbiol. Infect. Dis.; *IJSEM*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol.; *JCM*, J. Clin. Microbiol.; *Mic*, Microbiology; *SAM*, Syst. Appl. Microbiol.
^b El fragmento Spn9802 (156 pb) corresponde a la región intergénica *spr0556–spr0557* y situada entre las posiciones 558025 y 558180 del genoma de la cepa R6 de neumococo (AE007317).
^c MLSA, Multilocus sequence analysis; MLST, multilocus sequence typing. Se indican los genes secuenciados en cada caso.

Tabla 2. Genes y técnicas utilizados frecuentemente en la identificación de aislados clínicos de *S. pneumoniae*.

to de esta bacteria utilizando una sonda quimioluminiscente que contiene un fragmento del gen del rRNA 16S. Datos recientes, sin embargo, reconocen que esta sonda es incapaz, por ejemplo, de distinguir entre neumococo y *S. pseudopneumoniae*³¹. Algo parecido se puede decir de Binax NOW® (Binax, Inc.). A finales de la década de los noventa del pasado siglo se desarrolló este método, sencillo y rápido, basado en la inmunocromatografía de membrana, para el diagnóstico de la neumonía neumocócica. Este método detecta el polisacárido C (un ácido teicoico conteniendo colina), característico no sólo de todos los

neumococos sino también de otros EGM como, al menos, *S. pseudopneumoniae*, *S. mitis* y *S. oralis*, en la orina de los pacientes infectados. Aunque Binax NOW es positivo para los 23 serotipos de neumococo responsables del 90% de las infecciones neumocócicas graves y proporciona resultados en sólo 15 min tiene, además de la falta de especificidad ya señalada, un límite de detección elevado (equivalente a, aproximadamente, 10⁵ unidades formadoras de colonias ml⁻¹) así como poca fiabilidad en pacientes pediátricos ya que éstos, con frecuencia, son portadores asintomáticos del germen y pueden ofrecer resultados positivos falsos³².

GEN <i>LYTA</i>	NEUMOCOCO	OTROS EGM	PROFAGOS DE NEUMOCOCO	OTROS PROFAGOS
Neumococo	0.1–3.3	19.5–23.5	← 12.9–25.2 →	
Otros EGM			← 20.7–28.4 →	
Profagos de neumococo			1.3–2.7	17.8–19.1
Otros profagos				14.9–16.1

El número estimado de sustituciones por 100 bases se calculó mediante el método descrito por Jin y Nei (1990; *Mol. Biol. Evol.* **7**: 82–102).

Tabla 3. Rango de divergencias evolutivas (%) entre genes *lytA* bacterianos y fágicos.

Por otra parte, en la mayoría de los estudios, una fracción significativa de pacientes con hemocultivo (o cultivo de esputo) positivo para neumococo dieron resultados negativos con Binax y, además, este test puede seguir arrojando resultados positivos durante varias semanas después de la curación de una infección neumocócica.

Mención aparte merece la aplicación reciente de la tecnología de MALDI-TOF MS a la identificación de microorganismos en la clínica. Aunque esta técnica está permitiendo llevar a cabo identificaciones de muchos microorganismos (incluso directamente a partir de muestras clínicas) en unas 2 h, lamentablemente, el 80% de las cepas de neumococo no parecen poder diferenciarse de otras especies próximas de EGM. Se han desarrollado técnicas diversas como la tipificación mediante secuenciación multilócica (MLST; www.mlst.net/) o el análisis multilócico (MLSA; www.eml-sa.net/) con objeto de facilitar dicha discriminación. En particular, la técnica de MLST ha permitido desarrollar una base de datos que proporciona información filogenética de gran interés y se ha desarrollado un programa específico para determinar, sobre la base de la secuencia parcial de seis genes *housekeeping* (*aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*), si un determinado aislado clínico es o no un verdadero neumococo (<http://spneumoniae.mlst.net/sql/concatenate/isitaddto.asp>). Desgraciadamente, aunque los costes de la secuenciación son cada día menores, no parece probable que estos métodos sean de aplicación práctica en el día a día de un laboratorio clínico.

En la búsqueda de genes específicos de neumococo, dos sobresalen por encima de los demás: el gen *ply*, que codifica la neumolisina —una citolisina dependiente de colesterol³³— y *lytA*, que codifica la principal autolisina²⁷. Aunque durante bastante tiempo se creyó que *Ply* era exclusiva de neumococo, resultados recientes han demostrado que enzimas muy similares se encuentran también en *S. pseudopneumoniae* (pseudoneumolisina; *Pply*) y *S. mitis* (mitilisina; *Mly*)³⁴. El caso del gen *lytA* es diferente. Como ya se ha mencionado anteriormente, la lisis específica de neumococo en presencia de Doc es causada por la acción incontrolada de la principal autolisina (*LytA*), una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (NAM-amidasa; EC 3.5.1.28). En consecuencia, la ausencia de

lisis por Doc, haría suponer que otros EGM carecerían de esta actividad enzimática. La situación, no obstante, es más complicada de lo que, a primera vista, pudiera parecer. De hecho, *S. pseudopneumoniae* y algunos otros aislados de EGM poseen un gen (*lytA*_{EGM}) muy similar (≥80% de nucleótidos idénticos) al gen *lytA* de neumococo (*lytA*_{Spn}) (Tabla 3). Asimismo, todos los fagos atemperados de neumococo conocidos hasta la fecha (y algunos profagos de *S. mitis*) también codifican NAM-amidasas (*LytA*_{PPH}) estrechamente emparentadas con *LytA*_{Spn}^{29,35,36} (Tabla 3). Es importante señalar que, mientras los genes *lytA* de todos los neumococos y sus profagos conocidos hasta la fecha poseen 957 pb (codificando una NAM-amidasa de 318 aminoácidos), los alelos *lytA* de todos los EGM (y de algunos de sus fagos) poseen una delección de 6 pb y, por tanto, codifican proteínas de tan sólo 316 aminoácidos^{29,35,37}. En marcado contraste con las NAM-amidasas de neumococo y sus fagos atemperados, las NAM-amidasas *LytA*_{EGM} se inhiben por Doc lo que explica la ausencia de lisis de los EGM en presencia de la sal biliar³⁵. Convendría destacar, sin embargo, que, al igual que los neumococos, los EGM que sintetizan NAM-amidasas de tipo *LytA*, se lisan rápidamente cuando se utiliza el detergente Triton X-100 en lugar de Doc³⁵.

Como cabía esperar, teniendo en cuenta la mayor tasa de multiplicación de los fagos, éstos poseen alelos *lytA* con un grado de polimorfismo notablemente superior al de los correspondientes de *S. pneumoniae* (Fig. 2). Sin embargo, el polimorfismo del gen *lytA*_{EGM} es mucho mayor que el de las cepas de neumococo, lo que sugiere que, o bien los alelos *lytA*_{Spn} han sido adquiridos recientemente (en términos evolutivos) o, más probablemente, que las cepas de neumococo están mucho más relacionadas filogenéticamente entre sí que los EGM³⁷. Cuando se compararon las secuencias de los alelos *lytA*_{Spn} y *lytA*_{EGM} se puso de manifiesto la existencia de polimorfismos característicos de cada uno de estos alelos²⁹. Así, más de 100 posiciones nucleotídicas se encuentran conservadas entre todos los alelos de neumococo que, a su vez, difieren de los correspondientes nucleótidos presentes en EGM. Estas «firmas» características han permitido diseñar un procedimiento rápido —basado en una PCR seguida de una digestión con la enzima de restricción *BsaAI*— que permite asegurar si un determinado estreptococo α -hemolítico es

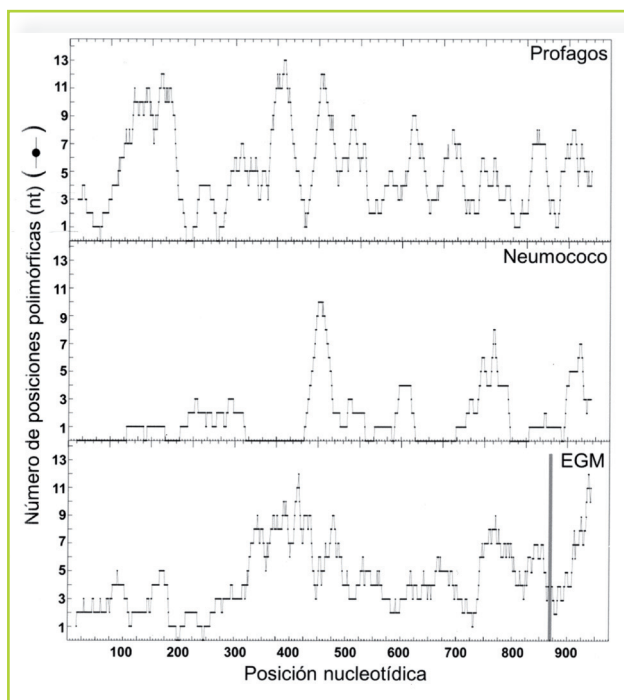


Fig. 2. Polimorfismo de los genes *lytA* en aislados de neumococo, EGM y profagos. Sobre la base de un emparejamiento múltiple, se utilizó una ventana de 31 nucleótidos que era desplazada por la secuencia, en dirección 5'→3', en pasos de un nucleótido. La suma de posiciones polimórficas se representa en la posición media de la ventana. La barra vertical en el panel EGM indica la posición de la delección de 6 nucleótidos que caracteriza a los alelos *lytA*_{EGM}. Modificado de ref.³⁷.

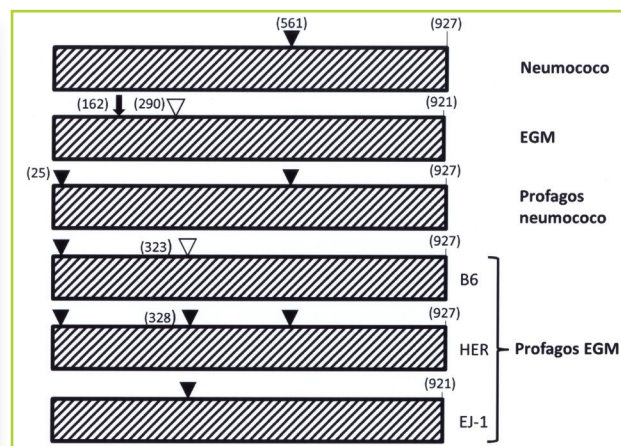


Fig. 3. Esquema de los genes *lytA* indicando la posición de los sitios de corte (entre paréntesis) por las enzimas de restricción *SnaBI* (triángulos negros), *BsaAI* (flecha negra) y *XmnI* (triángulos blancos). También se indican las dimensiones (en pb) de los respectivos genes. Nótese que todas las secuencias hidrolizadas por *SnaBI* (TAC↓GTA) son también digeridas por *BsaAI* (YAC↓GTR), pero no a la inversa. Modificado de ref.²⁹.

neumococo u otro EGM²⁹. Como se muestra en la **Figura 3**, se han identificado sitios de restricción característicos que permiten, además, comprobar si un determinado alelo *lytA* es bacteriano o fágico. En este último caso, incluso, dado que las secuencias nucleotídicas en posiciones 5' y 3' del gen *lytA* son muy diferentes entre los alelos de origen fágico y los bacterianos, se han podido diseñar parejas de oligonucleótidos sintéticos para amplificar selectivamente unos u otros genes.

La utilización del gen *lytA* para la correcta identificación de neumococo en muestras clínicas empleando diversos tipos de ensayo que implican, normalmente, una amplificación del mismo utilizando PCR, se está «popularizando» de manera creciente debido a todo el conocimiento básico acumulado en los últimos años sobre este gen y sus características moleculares. Así, sólo en los nueve primeros meses de 2012, al menos una decena de trabajos

independientes han utilizado variantes de esta tecnología para la identificación de *S. pneumoniae* con excelentes resultados³⁸⁻⁴⁷. No obstante, en la actualidad persisten algunos problemas en la posible aplicación de esta tecnología a la práctica clínica, en concreto, la «calidad» de las muestras clínicas a utilizar (con la necesidad o no de un paso previo de purificación del DNA), una reducción en el tiempo de análisis y un incremento notable en la sensibilidad del ensayo para poder detectar el microorganismo en muestras poco contaminadas (la especificidad parece garantizada sobre la base de los comentarios mencionados anteriormente). Con objeto de dar respuesta a estas necesidades, se ha puesto a punto recientemente un nuevo procedimiento en el que, tomando como base la detección del gen *lytA*, se realiza una PCR asimétrica seguida de una detección electroquímica sumamente sensible de los amplicones obtenidos (**Fig. 4**)⁴⁸. Esta tecnología permite no sólo detectar la presencia de neumococo en muestras clínicas sino, además, identificar otros EGM que también poseen una enzima tipo NAM-amidasa *LytA*. En la actualidad, el procedimiento ha sido patentado en varios países y se está procediendo a la validación clínica de la misma con financiación pública y en colaboración entre nuestro grupo y los de los Dres. J. Mingorance (Grupo de Microbiología Molecular, IdiPaz, Madrid) y J. M. Pingarrón del Dpto. de Química Analítica (UCM, Madrid), con resultados muy prometedores.

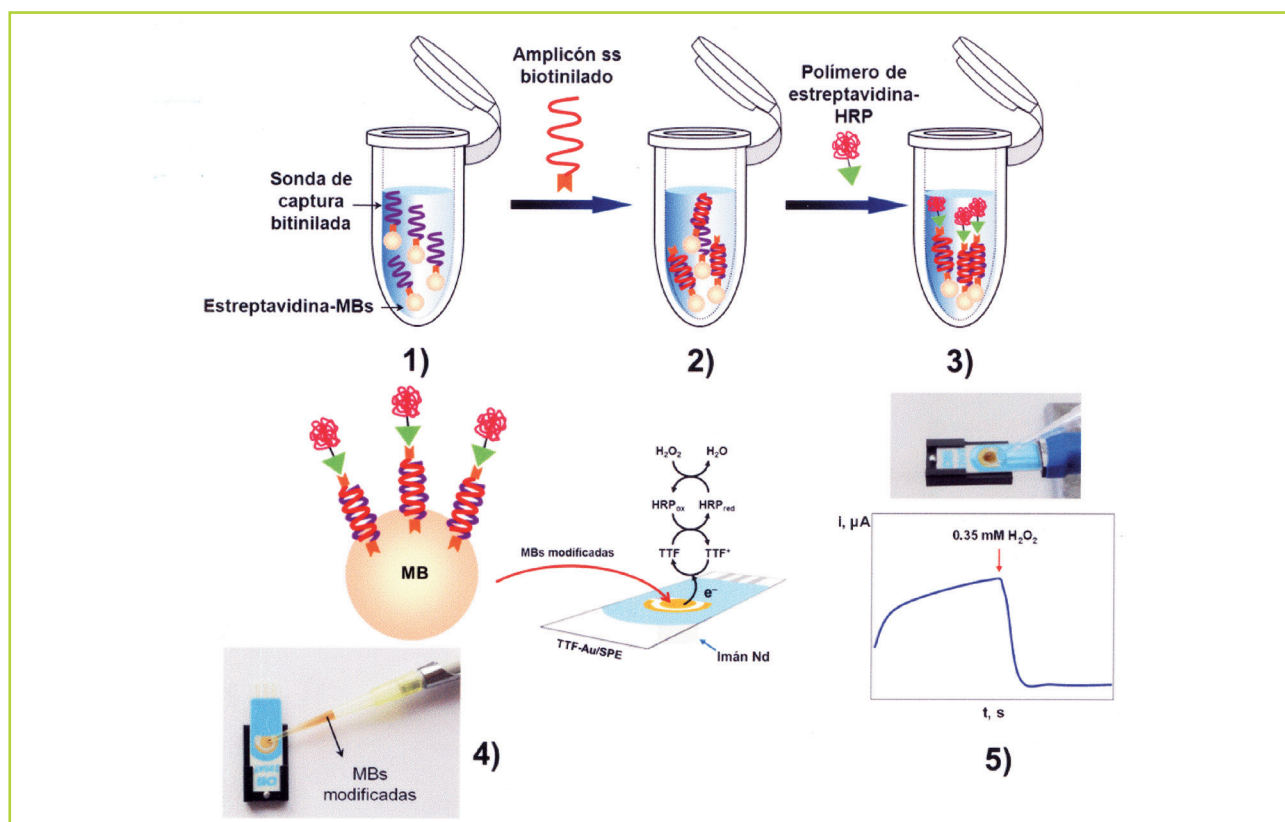


Fig. 4. Representación esquemática de la utilización de un magnetosensor amperométrico para la identificación de *S. pneumoniae* en muestras clínicas. La sonda de captura biotinilada, específica del gen *lytA*, inmovilizada sobre microesferas superparamagnéticas (MBs) modificadas con estreptavidina (\varnothing : 2.8 μm) (1), se hibrida con el amplicón monocatenario (ss) biotinilado obtenido mediante PCR asimétrica (2). Después de los lavados correspondientes con ayuda de un imán, el híbrido inmovilizado sobre las MBs se marca enzimáticamente con ayuda de un polímero ultrasensible de estreptavidina y peroxidasa de rábano (HRP) (3). Las MBs resultantes tras el proceso de hibridación y marcaje se capturan magnéticamente —con ayuda de un imán de Nd—, sobre la superficie del electrodo de trabajo de un electrodo impreso de oro que ha sido modificado previamente por tratamiento con tetratíafulvaleno (TTF), un mediador redox (4). A continuación, se adiciona H_2O_2 y se registra la intensidad de la corriente catódica generada (i , μA) a lo largo del tiempo (t , s) con un detector amperométrico (5). e^- , electrones. Modificado de ref.⁴⁸. Cortesía de la Dra. S. Campuzano (Facultad de Ciencias Químicas, UCM).

BIBLIOGRAFÍA

1. Whiley RA, Hardie JM. Genus I. Streptococcus Rosenbach 1884, 22AL. In: Vos P, Garrity G, Jones D, et al., eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edition. Vol. 3: The Firmicutes, 2009:655-711.
2. Facklam RR. (2002). What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin Microbiol Rev 15: 613-630.
3. Kawamura Y, Hou X-G, Sultana F, Miura H, Ezaki T. (1995). Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. Int J Syst Bacteriol 45: 406-408.
4. Barnard JP, Stinson MW. (1996). The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. Infect Immun 64: 3853-3857.
5. Doern CD, Burnham C-AD. (2010). It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. J Clin Microbiol 48: 3829-3835.
6. Maeda Y, Goldsmith CE, Coulter WA, et al. (2010). The viridans group streptococci. Rev Med Microbiol 21: 69-79.
7. Berg KH, Björnstad TJ, Johnsborg O, Håvarstein LS. (2012). Properties and biological role of streptococcal fratricins. Appl Environ Microbiol 78: 3515-3522.
8. Choi SC, Rasmussen MD, Hubisz MJ, Gronau I, Stanhope MJ, Siepel A. (2012). Replacing and additive horizontal gene transfer in *Streptococcus*. Mol Biol Evol: 29: 3309-3320.

9. Whitmore SE, Lamont RJ. (2011). The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Mol Microbiol* 81: 305-314.
10. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, et al. (2010). The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192: 5002-5017.
11. Jenkinson HF. (2011). Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol* 13: 3077-3087.
12. Clarridge JE, III. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840-862.
13. Haanperä M, Jalava J, Huovinen P, Meurman O, Rantakokko-Jalava K. (2007). Identification of alpha-hemolytic streptococci by pyrosequencing the 16S rRNA gene and by use of VITEK 2. *J Clin Microbiol* 45: 762-770.
14. Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* 430: 242-249.
15. UNICEF, WHO (2006). Pneumonia: the forgotten killer of children. http://www.unicef.org/spanish/publications/files/Pneumonia_The_Forgotten_Killer_of_Children.pdf.
16. O'Brien KL, Wolfson LJ, Watt JP, et al. (2009). Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* 374: 893-902.
17. Weycker D, Strutton D, Edelsberg J, Sato R, Jackson LA. (2010). Clinical and economic burden of pneumococcal disease in older US adults. *Vaccine* 28: 4955-4960.
18. Rozenbaum MH, Sanders EAM, van Hoek AJ, et al. (2010). Cost effectiveness of pneumococcal vaccination among Dutch infants: economic analysis of the seven valent pneumococcal conjugated vaccine and forecast for the 10 valent and 13 valent vaccines. *BMJ* 340: c2509.
19. Fenoll A, Muñoz R, García E, de la Campa AG. (1994). Molecular basis of the optochin-sensitive phenotype of pneumococcus: characterization of the genes encoding the F₀ complex of the *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus oralis* H⁺-ATPases. *Mol Microbiol* 12: 587-598.
20. Moscoso M, Domenech M, García E. (2010). Vancomycin tolerance in clinical and laboratory *Streptococcus pneumoniae* isolates depends on reduced enzyme activity of the major LytA autolysin or cooperation between CiaH histidine kinase and capsular polysaccharide. *Mol Microbiol* 77: 1052-1064.
21. López R. (2006). Pneumococcus: the sugar-coated bacteria. *Int Microbiol* 9: 179-190.
22. Lund E, Henrichsen J. (1978). Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. *Methods Microbiol* 12: 241-262.
23. McEllistrem MC. (2009). Genetic diversity of the pneumococcal capsule: implications for molecular-based serotyping. *Future Microbiol* 4: 857-865.
24. Marimon JM, Monasterio A, Ercibengoa M, et al. (2010). Antibody microarray typing, a novel technique for *Streptococcus pneumoniae* serotyping. *J Microbiol Methods* 80: 274-280.
25. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, Casal J. (1997). Dot blot assay for the serotyping of pneumococci. *J Clin Microbiol* 35: 764-766.
26. Siira L, Kaijalainen T, Lambertsen L, Nahm MH, Toropainen M, Virolainen A. (2012). From Quellung to multiplex PCR, and back when needed, in pneumococcal serotyping. *J Clin Microbiol* 50: 2727-2731.
27. López R, García E. (2004). Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol Rev* 28: 553-580.
28. Balsalobre L, Hernández-Madrid A, Llull D, et al. (2006). Molecular characterization of disease-associated streptococci of the mitis group that are optochin susceptible. *J Clin Microbiol* 44: 4163-4171.
29. Llull D, López R, García E. (2006). Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* 44: 1250-1256.
30. Xu Q, Kaur R, Casey JR, Sabharwal V, Pelton S, Pichichero ME. (2011). Nontypeable *Streptococcus pneumoniae* as an otopathogen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69: 200-204.
31. El Aila NA, Emler S, Kaijalainen T, et al. (2010). The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. *BMC Infect Dis* 10: 104.
32. Werno A, Murdoch D. (2008). Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* 46: 926-932.
33. Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH. (2008). Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med* 8: 497-509.
34. Johnston C, Hinds J, Smith A, van der Linden M, Van Eldere J, Mitchell TJ. (2010). Detection of large numbers of pneumococcal virulence genes in streptococci of the mitis group. *J Clin Microbiol* 48: 2762-2769.
35. Obregón V, García P, García E, Fenoll A, López R, García JL. (2002). Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble. *J Clin Microbiol* 40: 2545-2554.
36. Romero P, López R, García E. (2004). Characterization of LytA-like N-acetylmuramoyl-L-alanine amidases from two new *Streptococcus mitis* bacteriophages provides insights into the properties of the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* 186: 8229-8239.
37. Morales M, García P, de la Campa AG, Liñares J, Ardanuy C, García E. (2010). Evidence of localized prophage-host recombination in the *lytA* gene encoding the major pneumococcal autolysin. *J Bacteriol* 192: 2624-2632.
38. Wessels E, Schelfaut JGG, Bernardts AT, Claas ECJ. (2012). Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and their detection in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 50: 1171-1177.
39. Greve T, Møller JK. (2012). Accuracy of using the *lytA* gene to distinguish *Streptococcus pneumoniae* from related species. *J Med Microbiol* 61: 478-482.
40. Kim DW, Kilgore PE, Kim EJ, et al. (2012). The enhanced pneumococcal LAMP assay: a clinical tool for the diagnosis of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS One* 7: e42954.
41. Bhatia R, Harris K, Hartley J, Jeelani O, Harkness W. (2012). Serial PCR genetic load determination in the surgical management of pneumococcal intracranial sepsis. *Childs Nerv Syst* 28: 515-520.
42. Wang X, Theodore MJ, Mair R, et al. (2012). Clinical validation of multiplex real-time PCR assays for detection of bacterial meningitis pathogens. *J Clin Microbiol* 50: 702-708.
43. Chiba N, Morozumi M, Ubukata K. (2012). Application of the real-time PCR method for genotypic identification of β -lactam resistance in isolates from invasive pneumococcal diseases. *Microb Drug Resist* 18: 149-156.
44. Strachan RE, Cornelius A, Gilbert GL, et al. (2012). Pleural fluid nucleic acid testing enhances pneumococcal surveillance in children. *Respirology* 17: 114-119.
45. Albrich WC, Madhi SA, Adrian PV, et al. (2012). Use of a rapid test of pneumococcal colonization density to diagnose pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 54: 601-609.
46. Werno AM, Anderson TP, Murdoch DR. (2012). Association between pneumococcal load and disease severity in adults with pneumonia. *J Med Microbiol* 61: 1129-1135.
47. Park IH, Kim K-H, Andrade AL, Briles DE, McDaniel LS, Nahm MH. (2012). Nontypeable pneumococci can be divided into multiple cps types, including one type expressing the novel gene *pspK*. *MBio* 3: e00035-12.
48. Campuzano S, Pedrero M, García JL, García E, García P, Pingarrón JM. (2011). Development of amperometric magnetogenosensors coupled to asymmetric PCR for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Anal Bioanal Chem* 399: 2413-2420.