

Multilocus sequence typing: el marcador molecular de la era de Internet

Julio A. Vázquez^a y Sonsoles Berrón^b

^aLaboratorio de Referencia de Neisserias. ^bLaboratorio de Referencia de Neumococos. Servicio de Bacteriología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

La epidemiología global o a largo plazo tiene como objetivo el trazado preciso de los procesos de dispersión de líneas clonales, asociadas a altos niveles de virulencia, a determinada resistencia o a multiresistencia frente a uno o varios agentes antimicrobianos, etc. Por lo tanto, un sistema de tipificación aplicado a este nivel, debe producir resultados que sean fácilmente intercambiables entre laboratorios alejados geográficamente entre sí, así como detectar las diferentes líneas clonales incluso en presencia de bajos niveles de variabilidad acumulada en el genoma. Un marcador basado en secuencia de ADN puede producir unos resultados objetivos (secuencias de letras) que son fácilmente almacenados en bases de datos accesibles mediante Internet. La aplicación de una estrategia similar a la ya utilizada en el análisis de isoenzimas, con la secuenciación de fragmentos variables de genes *housekeeping* seleccionados va a permitir obtener una visión global de la distribución de los principales complejos clonales en la población analizada, además de trazar su proceso de dispersión.

Palabras clave: MLST. Epidemiología molecular. Líneas clonales.

Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era

Global or longer term epidemiology track the spread of clonal lineages, associated with hypervirulence or resistance or multi-resistance to antimicrobial agents. Therefore, the application of a molecular typing system for this purpose should produce data easily shared by different and geographically distant laboratories, as well as distinguish those clonal lineages even with low levels of variability accumulated in the genome. A marker based on the DNA sequence will produce objective results easily organized in data bases accessible by Internet. The application of a similar strategy that was

used in the analysis of isoenzymes, by sequencing variable fragments of selected housekeeping genes, will allow obtaining a general view of the distribution of the clonal lineages and tracking their spread.

Key words: MLST. Molecular epidemiology. Clonal lineages.

Introducción

En las dos últimas décadas, y coincidiendo con el auge de conceptos como enfermedades emergentes y reemergentes, se ha producido un interés creciente en relación con algunos aspectos estrechamente relacionados con bacterias patógenas, como incrementos aparentes de virulencia, mayor transmisibilidad o aumento de la resistencia a antibióticos¹. En este contexto, los planteamientos sociopolíticos como el de la globalización contribuyen a la incorporación de ideas como la de la exposición global a agentes infecciosos antes confinados a pequeñas áreas remotas y endémicas, y la facilidad para la rápida dispersión de microorganismos con nuevas características de virulencia y/o de resistencia^{2,3}.

Desde el punto de vista de la aportación de la microbiología a los estudios epidemiológicos, es básico diferenciar entre lo que se define como epidemiología local o a corto plazo (fig. 1) de lo que es la global o a largo plazo. En la primera se intenta responder a cuestiones como las siguientes:

1. En los casos en los que se observa una infección recurrente en un paciente, ¿se trata de una recidiva por fracaso terapéutico o estamos ante una reinfección por una cepa diferente?
2. En el caso de agrupamientos de casos en la comunidad o en el hospital, ¿nos encontramos ante un brote o, alternativamente, ante una serie de infecciones independientes por diferentes cepas?

En la segunda, el fin último es establecer las relaciones de las diferentes líneas clonales (que producen brotes en diferentes países/continentes y/o décadas, que adquieren determinantes de resistencia a antimicrobianos o que manifiestan un aumento del nivel de virulencia) y ser capaces de trazar su dispersión global (fig. 2). Este nivel de la epidemiología debe ser capaz de trazar la dispersión de líneas clonales geográfica y temporalmente, distinguiendo las diferentes variedades que van surgiendo en el proceso de dispersión.

Correspondencia: Dr. J.A. Vázquez.
Laboratorio de Referencia de Neisserias. Servicio de Bacteriología.
Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.
Ctra. Majadahonda, s/n. 28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: jvazquez@isciii.es

Manuscrito recibido el 15-10-2003; aceptado el 28-11-2003.

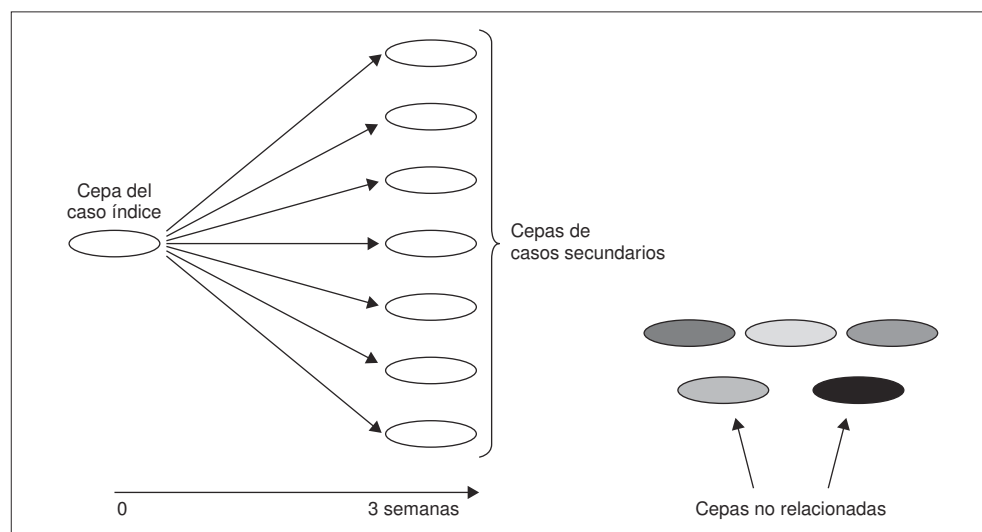


Figura 1. Esquema de identificación de cepas en la epidemiología local o a corto plazo.

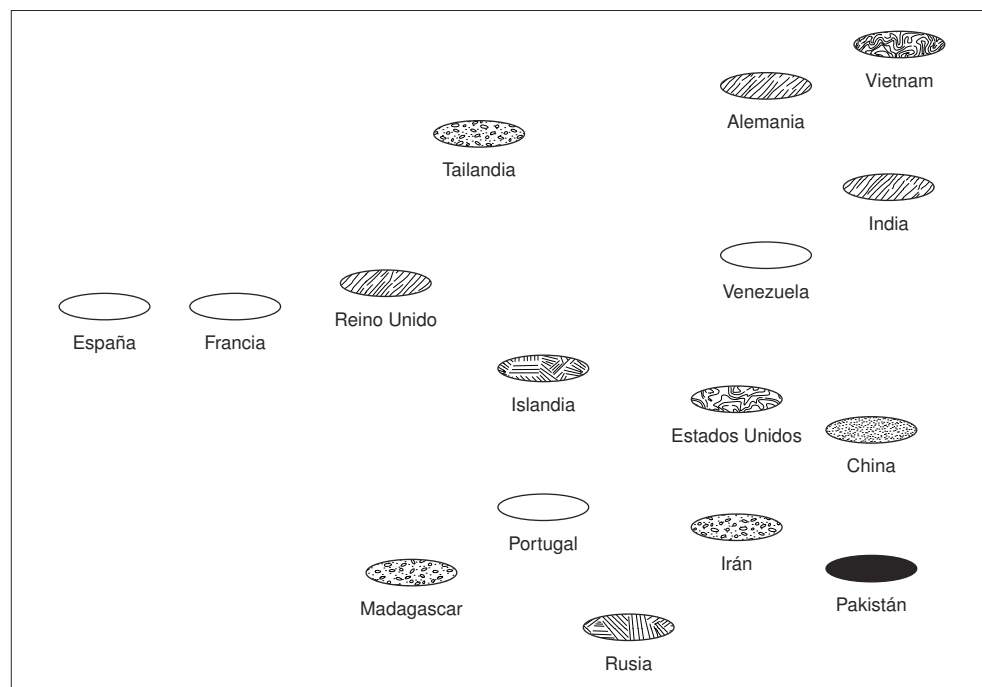


Figura 2. Esquema de identificación de líneas clonales en su proceso de dispersión geográfica y temporal.

Búsqueda de nuevos marcadores microbiológicos: una necesidad no siempre evidente

Para dar respuesta a las necesidades de la epidemiología local, se han desarrollado los sistemas de tipificación microbiológicos que podríamos definir como clásicos, incluyendo ambos, los fenotípicos y los moleculares o genéticos. En los últimos años se han desarrollado algunos sistemas que podríamos definir como "universales" por la posibilidad de ser aplicados en la práctica totalidad de las especies bacterianas. Entre éstos, destacan el análisis de ADN mediante electroforesis en campo pulsado o Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE),

PCR arbitraria o Arbitrary Primers-PCR (AP-PCR), etc.⁴⁻⁶. Estos métodos son altamente discriminatorios y detectan pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano. Así, es muy poco probable, por ejemplo, que 2 pacientes sean infectados al azar por dos cepas que muestran el mismo tipo molecular, por lo que estos métodos marcarán, con escaso margen de error, la existencia de una conexión epidemiológica entre ambos casos⁷.

Sin embargo, esa misma capacidad de detectar fácilmente una rápida acumulación de pequeñas variaciones puede ser una gran desventaja para trazar la dispersión de líneas clonales, ya que se puede perder la capacidad de analizar el origen común de esas variantes.

Adicionalmente, la que hemos llamado “microbiología/epidemiología global” hace imprescindible el intercambio rápido y preciso de información entre diferentes laboratorios. A menudo los laboratorios no utilizan los mismos métodos, y aún en el caso de que lo hagan, los resultados son casi siempre difíciles de comparar. Los métodos que hemos mencionado están basados en la generación de patrones de bandas en geles de agarosa y su comparación en formato de imagen. Así pues, con el empleo de estos métodos, compartir información es un proceso complejo que requiere la formación de redes amplias que permitan la estandarización del método y la implantación de idéntica metodología para el análisis e intercambio de imágenes^{8,9}, lo cual complica mucho todo el procedimiento.

La necesidad de desarrollar un marcador válido para epidemiología global se hace, pues, evidente.

Antecedentes del MLST

Un método fenotípico, el análisis de isoenzimas o MLEE (*multi locus enzyme electrophoresis*), ampliamente utilizado en procariotas así como en eucariotas, poseía la deseable combinación de “poder discriminatorio” y detección/ determinación de clones con independencia de su estabilidad¹⁰. El MLEE podría definirse como un método genético indirecto, que analiza la movilidad electroforética de un número concreto (generalmente entre 15 y 20) de enzimas metabólicas en geles de almidón o poliacrilamida. Las variaciones observadas en estas movilidades corresponden con variaciones en el *locus* o gen codificante de cada enzima. Por lo tanto, cada variante se define como “variante alélica” y los diferentes alelos de cada uno de los genes conforman el perfil alélico que a su vez define el tipo electroforético. Aun en el caso de encontrar tan sólo cuatro alelos por *locus*, o lo que es lo mismo, cuatro variantes en cada gen analizado, y estudiando 20 *loci*, se podrían conseguir hasta 4²⁰ genotipos diferentes.

El hecho de utilizar enzimas metabólicas, no sometidas a presión selectiva, permite detectar variaciones neutras que definen líneas clonales relativamente estables. En este caso el marcador tiene alguna de las cualidades deseables en la epidemiología a largo plazo, pero está nuevamente basado en la generación de patrones de bandas en geles, con los inconvenientes ya reseñados anteriormente. Así pues, las actuales facilidades de acceso a la secuenciación del ADN en muchos de los laboratorios de microbiología permitieron el desarrollo del MLST manteniendo la filosofía del MLEE¹¹.

Definición de *multilocus sequence typing*

En el MLST, las variaciones en los diferentes *locus* se detectan de forma directa por secuenciación del ADN en fragmentos de genes seleccionados, permitiendo la identificación de grupos de microorganismos con idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) genotipos. Esto permite identificar todas las variaciones, no sólo aquellas que produzcan un cambio en la movilidad electroforética del enzima codificante, como sucedía en MLEE. Adicionalmente, la secuencia de ADN es un dato

objetivo fácilmente intercambiable entre diferentes laboratorios.

El principio del desarrollo de MLST se encuentra en algunos trabajos de genética de poblaciones que intentaron correlacionar la información generada a partir del análisis de isoenzimas con la obtenida mediante secuenciación de los genes analizados^{12,13}. En ese proceso, se observó que algunas regiones específicas de los genes analizados eran responsables de la mayor parte de la variabilidad observada, mientras que el resto del *locus* presentaba un alto grado de conservación. Así pues, se decidió analizar en cada gen sólo un fragmento interno de entre 450-500 pb cuyo nivel de variabilidad combinado, entre los genes analizados, proporcionaba un alto grado de discriminación.

Ese alto grado de discriminación permitió reducir mucho el número de *loci* o genes analizados. El número de variantes detectados es mucho mayor utilizando la estrategia directa de secuenciación en vez de la indirecta de movilidad electroforética. Se ha calculado que son necesarios hasta 26 cambios en la secuencia del gen para producir un cambio en la movilidad electroforética de la enzima codificada¹⁴. Por lo tanto, la secuencia permite detectar variantes que supongan tan sólo un cambio en una base en el gen analizado. Así, se calcula que si se encuentran en torno a 30 alelos diferentes por *locus*, y estudiando tan sólo siete genes, podríamos distinguir hasta 30⁷ genotipos diferentes. Finalmente, siete es el número de genes en los que se basa el esquema de MLST para las diferentes especies bacterianas en las que se ha desarrollado.

Proceso de desarrollo de MLST para una especie bacteriana concreta

Desgraciadamente el proceso de selección de los genes, así como de los fragmentos internos de éstos, no es universal, es decir, este proceso debe ser realizado para cada especie bacteriana de forma individual. Así, el método es de aplicación universal, pero su desarrollo, no.

El proceso de desarrollo es lento y laborioso, y esto limita la aplicación de MLST a aquellas especies en las que ya ha sido desarrollado. No obstante, desde 1998 en que se describió, el método ya ha sido desarrollado para 11 especies diferentes de bacterias (véase información en <http://www.mlst.net/databases/default.asp>), entre las que habría que destacar por su relevancia *Neisseria meningitidis*¹¹, *Streptococcus pneumoniae*¹⁵, *Staphylococcus aureus*¹⁶, *Campylobacter jejuni*¹⁷ y *Enterococcus faecium*¹⁸. En proceso de desarrollo están un buen número de otras especies de bacterias patógenas de interés en salud pública (http://www.mlst.net/misc/new_schemes.asp). En este apartado de especies en desarrollo merece especial atención la presencia de dos grupos españoles desarrollando el método para las especies *Listeria monocytogenes*¹⁹ y *Acinetobacter baumannii*.

El proceso de desarrollo implica un primer paso de elección de una colección de aislados en la que se aplicará el proceso de desarrollo de MLST. El número de aislados se estima en torno a 100, y deben ser cepas aisladas en diferentes años y zonas geográficas. Lo ideal es que las

cepas hayan sido previamente caracterizadas mediante algún otro marcador para poder validar de alguna forma los resultados que se obtengan con MLST. Las cepas deberían representar una muestra razonable de la estructura de población observada con la aplicación de ese otro marcador.

El paso siguiente consiste en la elección de un número de entre 9 y 10 genes codificantes de enzimas metabólicas que preferiblemente hayan sido ya descritas en la especie en cuestión. Lo ideal es que pueda tenerse información previa de análisis de isoenzimas en la especie elegida. Esto nos va a permitir elegir *a priori* los genes con un mayor número de alelos, los más variables, en función de la movilidad electroforética observada en MLEE.

Hay dos premisas que deberían cumplirse en el proceso de selección de los genes:

1. Los 7 loci deberían estar lo más repartidos posible a lo largo del cromosoma bacteriano, de forma que no se escojan sólo zonas concretas del cromosoma, más sometidas a procesos de recombinación y/o mutación.

2. Los genes seleccionados no deben estar flanqueados en ninguno de sus extremos por genes codificantes de proteínas sometidas a presión selectiva (antígenos importantes de membrana externa, proteínas involucradas en mecanismos de resistencia a antimicrobianos, etc.).

El siguiente paso es definir el fragmento interno de entre 450-500 pb, con un grado de variabilidad utilizable, en los genes elegidos. Para ello pueden seguirse dos procedimientos diferentes:

1. Si el gen seleccionado tiene una secuencia conocida tanto en la especie en la que se está desarrollando MLST como en alguna especie próxima del mismo género, se procede a alinear las dos secuencias y a seleccionar el fragmento más polimórfico, con independencia de que los cambios sean sinónimos o no. Este proceso se ha seguido en algunos genes en el desarrollo por ejemplo de

S. pneumoniae (se comparó con genes de *S. viridans*¹⁵ y en el de *L. monocytogenes* (se comparó con genes de *L. innocua*)¹⁹. Si la secuencia del gen no es conocida en toda su extensión en alguna o ninguna de las dos especies, podemos diseñar iniciadores y secuenciar el/los genes en cuestión y proceder al alineamiento, comparación y selección del fragmento interno.

2. Alternativamente pueden secuenciarse los genes seleccionados en un número de entre 10-15 cepas de la especie en la que estamos desarrollando MLST. Estas cepas formarán parte de la colección de 100 aislados elegidos para el desarrollo del método, y deben pertenecer a tipos genéticos y/o fenotípicos lo más diversos posible. Las secuencias en cada gen se alinearán y se elegirá el fragmento interno que genere un mayor polimorfismo.

De entre los 9-10 genes elegidos, se seleccionarán los siete que ofrezcan un mayor grado de polimorfismo. Si no hubiera siete con nivel aceptable de polimorfismo se procedería a analizar una nueva batería de genes.

El proceso de validación continuará entonces por la determinación del perfil alélico utilizando la batería de genes seleccionados en la colección de 100 aislados previamente elegida. La solidez y consistencia de los resultados obtenidos con MLST será evaluada mediante la comparación con los datos previos obtenidos con otro marcador en las cepas en cuestión.

Las combinaciones alélicas encontradas definen lo que se conoce como el tipo de secuencia o *sequence type* (ST), que es identificado con un número empezando con el 1, y siguiendo después correlativamente a medida que se van describiendo nuevos perfiles alélicos.

Proceso de análisis por MLST

Modo general de procedimiento

El proceso de análisis por MLST puede verse resumido en la figura 3.

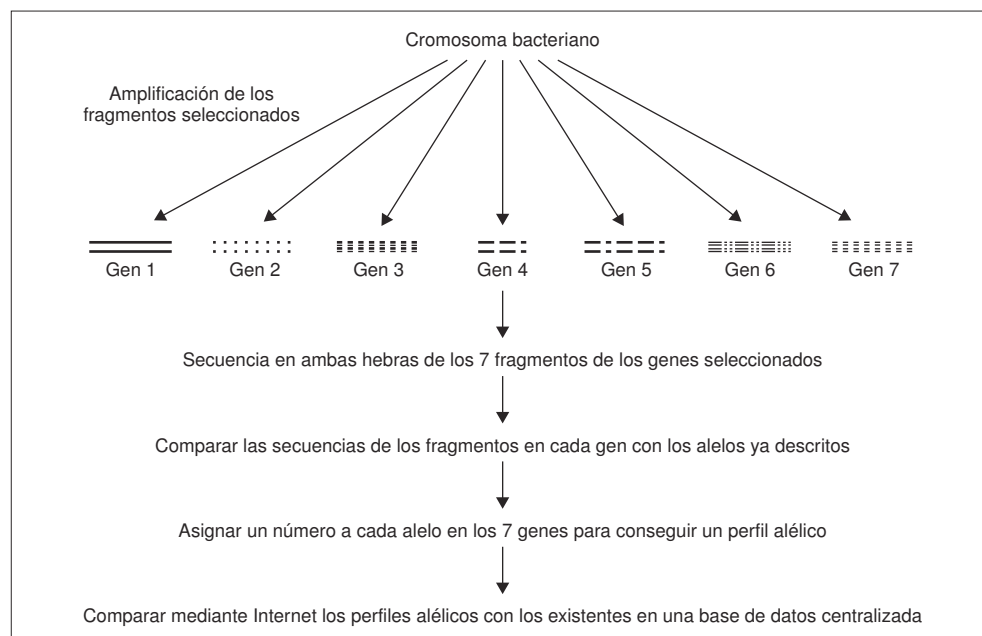


Figura 3. Procedimiento resumido del análisis de muestras por MLST.

1. El primer paso consiste en la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos variables de los siete genes previamente seleccionados. La secuencia de cada uno de los *loci* se alinea con las ya existentes en una base de datos centralizada. Si la secuencia coincide, el programa asigna uno de los alelos ya identificados; en caso contrario, asigna un nuevo número a ese nuevo alelo. La asignación de los alelos se realiza de forma inequívoca al secuenciar ambas hebras de ADN, por lo que las variaciones en la secuencia de ADN son de esta forma “autenticadas”.

2. Una vez asignado un número a cada alelo, y por supuesto siempre utilizando el mismo orden de los genes, podemos generar un perfil alélico que será la combinación de los siete alelos ya asignados (fig. 4).

3. Tras la definición de los perfiles alélicos, la comparación entre las cepas es sencilla; en el ejemplo de la figura 4 puede observarse cómo las cepas 1 y 6 son idénticas, y lo mismo sucede con las 2, 5 y 10, así como con la 7 y 9. Las cepas 3, 4 y 8 presentan perfiles únicos no compartidos por ninguna cepa de la serie representada. Con este claro sistema, es muy sencillo comprobar de un vistazo una primera valoración del grado de proximidad entre los aislados, simplemente comprobando el número de alelos compartidos entre perfiles diferentes. Por ejemplo, podemos ver cómo la cepa 1 no comparte ningún alelo con la cepa 2, y a su vez, la cepa 2 comparte cuatro alelos con la cepa 3.

Utilización de Internet en el proceso de análisis

El diseño del proceso seguido en MLST explota las posibilidades que ofrece Internet. La existencia de bases de datos para cada microorganismo en el que se ha desarrollado MLST, accesibles mediante página web (<http://mlst.net>) funciona como nexo común para todos los posibles participantes, pudiendo realizarse todo el proceso de consultas y análisis así como enviar las propias cepas para inclusión en las bases de datos, con conexión posible desde cualquier lugar del mundo.

Cuando se completa el proceso de desarrollo de MLST para una nueva especie bacteriana, es preciso organizar una base de datos. Se han desarrollado programas informáticos específicos para la aplicación en MLST²⁰. Estos nuevos programas de aplicación y gestión de bases de datos para MLST probablemente serán utilizados universalmente en un futuro cercano. Estas bases de datos recogen una serie mínima de datos de cada uno de los aislados que forman parte de la misma. Esa serie de datos, clínicos, epidemiológicos y microbiológicos, es definida por el grupo o grupos responsables del desarrollo del método en la especie en cuestión.

El sistema está diseñado de forma dinámica, para poder mandar los de nuevos aislados, solicitar la inclusión de nuevos alelos y/o perfiles, etc., todo ello gestionado por un administrador especialista en bioinformática, que supervisa los datos suministrados por el usuario. Así, si se envían datos de aislados que corresponden a perfiles ya descritos, sólo es preciso enviar un formato Excel con los datos correspondientes. Si se trata de un alelo nuevo, no incluido en la base de datos, entonces es preciso enviar el archivo en formato “Chromas” generado por el secuenciador automático, para poder proceder a su verificación.

Perfil alélico							
	1	5	3	7	2	8	4
Cepa 1	1	5	3	7	2	8	4
Cepa 2	11	15	30	12	22	11	20
Cepa 3	6	15	9	1	22	11	20
Cepa 4	9	10	1	19	12	18	14
Cepa 5	11	15	30	12	22	11	20
Cepa 6	1	5	3	7	2	8	4
Cepa 7	20	11	29	9	21	13	11
Cepa 8	9	15	13	27	22	18	14
Cepa 9	20	11	29	9	21	13	11
Cepa 10	11	15	30	12	22	11	20
	gen1	gen2	gen3	gen4	gen5	gen6	gen7

Figura 4. Asignación de tipos de secuencia o ST a partir de los perfiles alélicos.

El programa de gestión de la base de datos permite al usuario realizar consultas de alelos, de perfiles alélicos, de aislados específicos con objeto de conocer su relación con otros aislados incluidos en la base, etc. Adicionalmente, la página web ofrece enlaces con un buen número de programas que permiten el análisis de datos generados por MLST mediante la utilización de diversos algoritmos.

Desarrollo de MLST para caracterización de casos en ausencia de cultivo

Al tratarse de un método basado en amplificación y secuenciación específica de fragmentos internos de ADN en siete genes, el método ha sido adaptado en algunos microorganismos para poder ser aplicado en muestras biológicas (LCR, sangre, suero, exudados, etc.) en ausencia de cultivo^{21,22}. En este caso, la estrategia pasa por la realización de una *nested*-PCR con iniciadores diseñados en las regiones flanqueantes de los fragmentos amplificados en el esquema normal de MLST cuando se aplica a bacterias crecidas en un cultivo. Los resultados obtenidos indican que esta estrategia funciona bien en muestras clínicas para neumococos y meningococos, y lógicamente debería funcionar bien para el resto de especies en las que se ha desarrollado MLST.

Ejemplos de aplicación práctica de MLST en microbiología: su utilidad en el proceso de toma de decisiones

Neisseria meningitidis

El MLST fue desarrollado originalmente en cepas de meningococo. El hecho de contar con una buena colección de aislados previamente caracterizados por MLEE^{23,24} fue determinante para que esta especie fuera la primera en la que se desarrolló el método. Adicionalmente, la estructural poblacional de meningococos se corresponde a la de una población no clonal con una gran presencia de procesos de recombinación en ésta²⁵. Estos frecuentes procesos de recombinación provocan una rápida diversificación de los clones lo que supone un aumento en la dificultad para reconocer las líneas clonales tras un proceso de evolución geográfica y/o temporal. En una

especie como *N. meningitidis* en la que se ha reconocido la circulación de líneas hipervirulentas, una perfecta identificación de las mismas, incluso sometidas a los mencionados procesos de recombinación, es de gran ayuda para entender los procesos de dispersión de ondas y brotes^{26,27}. En este sentido, el MLST ha resultado un éxito en la tarea de reconocer las líneas clonales hipervirulentas, pudiendo trazar perfectamente su desplazamiento geográfico y temporal, de forma que el método identifica todas las variantes genéticas de las líneas hipervirulentas que evolutivamente van surgiendo, asignando esas variantes a la misma línea clonal hipervirulenta²⁸. Esto ha permitido saber que muy probablemente las líneas clonales hipervirulentas evolucionan muy rápidamente, lo que les permite un mejor nivel de adaptación a modificaciones ambientales. La misma o mayor tasa de diversificación se estaría dando en los complejos clonales aislados en portadores asintomáticos²⁹, si bien se trata de líneas bien diferenciadas de las definidas como hipervirulentas, características de casos de enfermedad meningocócica. En este aspecto, la identificación de la llegada de nuevas líneas clonales hipervirulentas, que sustituyen a las que circulan en una zona geográfica concreta, puede predecir la aparición de ondas epidémicas³⁰, lo que es de gran utilidad en la toma ágil de decisiones en salud pública.

Así mismo, la aplicación de MLST ha facilitado la definición precisa de las relaciones epidemiológicas entre los pacientes y sus contactos próximos familiares y/o convivientes³¹.

Streptococcus pneumoniae

El desarrollo de MLST en neumococos fue casi paralelo al que tuvo lugar en *N. meningitidis*. Los trabajos previos sobre análisis de poblaciones bacterianas¹² indicaban que esta especie estaba sometida a frecuentes procesos de recombinación, si bien produciendo un menor polimorfismo que el que estos eventos causan en *N. meningitidis*³². Una vez más vuelve a hacerse patente la dificultad para identificar líneas clonales circulantes. Aunque en el caso de *S. pneumoniae* no se habla de líneas hipervirulentas, sí se han descrito clones asociados con enfermedad invasiva grave¹⁵, con sólo 16 de los más de 90 serotipos descritos que causan más del 90% de los casos de enfermedad invasiva³³. No obstante, no se conoce si dentro de determinados serotipos hay clones específicos que tienen un mayor poder de virulencia o, por el contrario, si la mayoría de los aislados que presentan esos determinados serotipos "virulentos" están implicados en la producción de enfermedad invasiva. En un estudio con 274 aislados¹⁵, se definieron 143 diferentes ST, aunque sólo se definieron 12 como clones virulentos.

En el caso de *S. pneumoniae* reviste una especial importancia la identificación de clones asociados con resistencia a penicilina y otros antimicrobianos. En el caso de *N. meningitidis*, sólo recientemente se han asociado determinadas líneas clonales con resistencia intermedia a penicilina³⁴. Sin embargo, en el caso de neumococo, la asociación de determinados clones con la resistencia tanto elevada como intermedia frente a penicilina ha sido bien documentada^{35,36}, por lo tanto, la correcta identificación de estos clones en diferentes laboratorios alejados geográficamente permite conocer con gran precisión el

grado de dispersión de estos clones, así como la posible adquisición de nuevos determinantes de resistencia por los mismos³⁷.

Vigilancia de procesos de intercambio capsular por procesos de recombinación genética en *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae*

La aplicación de nuevas vacunas conjugadas en meningococo y neumococo^{38,39} ha abierto un nuevo capítulo en la historia de la prevención frente a estos dos microorganismos. Sin embargo, el hecho de que las vacunas desarrolladas hasta ahora protejan sólo frente a un limitado número de serogrupos o serotipos, y de que en ambas especies exista un elevado nivel de recombinación hace imprescindible mantener una adecuada vigilancia de las situaciones generadas tras la vacunación⁴⁰.

Los procesos de recombinación genética provocan la aparición de fenómenos conocidos como *switching* en los genes que codifican para el polisacárido capsular, produciendo variaciones de fase en dicho antígeno. Por lo tanto, el análisis de la posible selección de estas variantes, favorecida por la presión inmunológica generada por la aplicación de las vacunas, debe ser realizado como parte de la vigilancia tras la vacunación. El MLST se ha mostrado como una herramienta de gran eficacia en la realización de estos procesos de vigilancia^{41,42}.

***Staphylococcus aureus* resistente a metilicina**

S. aureus es un serio problema de salud pública, sobre todo en los hospitales, donde los clones resistentes a metilicina y a otros antibióticos producen un buen número de casos de infección nosocomial⁴³. Inmediatamente después de la aparición de la metilicina en 1959, aparecieron cepas de estafilococo resistentes a este antibiótico, que se diseminaron rápidamente por Europa en la década de los años 1960 y en Estados Unidos y otras partes del mundo en la década siguiente⁴⁴. La aparición reciente de cepas con niveles intermedios de resistencia a glucopéptidos, así como la de cepas con alto nivel de resistencia mediada por *vanA*⁴⁵ ha venido a complicar definitivamente el panorama en los tratamientos de infecciones por *S. aureus* resistentes.

Algunos de los clones de estafilococos resistentes a metilicina parecen tener una especial facilidad para diseminarse y provocar importantes brotes. Estos clones epidémicos se han caracterizado mediante la aplicación de análisis de ADN mediante digestión y electroforesis en campo pulsado^{46,47}. Sin embargo, una vez más, por las desventajas ya comentadas anteriormente, en este tipo de métodos basados en la generación de patrones de bandas, es muy complejo compartir información entre diferentes laboratorios, por lo que existía un alto grado de confusión respecto a los llamados clones epidémicos de *S. aureus* resistente a metilicina. El desarrollo de MLST en esta especie vino a ofrecer un alto nivel de información sobre éste y otros aspectos⁴⁴, definiendo con precisión cómo las cepas sensibles pertenecen generalmente a los mismos clones que las cepas resistentes.

Como hemos visto en las dos especies mencionadas, meningococo y neumococo, el MLST refleja importantes diferencias en las poblaciones de cepas aisladas de portadores y aquellas aisladas de casos clínicos. Sin

embargo, esto no está tan claro en el caso de *S. aureus*⁴⁸, especie en la que no aparecen diferencias entre ambas poblaciones. En este caso, la adquisición y/o pérdida de determinantes de virulencia localizados en segmentos móviles de ADN podría definir en cada momento la eficacia de un tipo determinado de aislado para producir enfermedad, antes que la pertenencia de dicho aislado a una línea clonal especialmente virulenta⁴⁸. La movilidad de estos determinantes es tan alta que tienen una débil influencia en la estructura poblacional de la especie.

Así mismo, los datos generados por MLST indican que las cepas responsables de brotes nosocomiales no representan en modo alguno una subpoblación definida. Antes bien, ambas, las infecciones nosocomiales y las comunitarias están producidas por los mismos clones de estafilococo.

En esta especie, también a diferencia de las dos anteriores, las estructura poblacional indica un bajo nivel de recombinación, y la diversificación clonal se produce por mutaciones puntuales en mucha mayor medida que por procesos de intercambio de material genético.

Aplicación en microorganismos diploides

Aunque el MLST es una técnica que fue desarrollada y diseñada para identificar clones y líneas clonales¹⁵, fundamentalmente en poblaciones bacterianas, recientemente se han desarrollado dos versiones para su aplicación en *Candida albicans*^{49,50}, lo que abre de forma extraordinaria las posibilidades de aplicación de esta metodología.

Bibliografía

- Pollard AJ, Dobson SR. Emerging infectious diseases in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:265-75.
- Tenover FC, Hughes JM. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. *JAMA* 1996;275:300-4.
- Smith JM, Feil EJ, Smith NH. Population structure and evolutionary dynamics of pathogenic bacteria. *Bioessays* 2000;22:1115-22.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33:2233-9.
- Caetano-Anollés G. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *PCR Methods Appl* 1993;3:85-94.
- Savelkoul PH, Aarts HJ, De Haas J, Dijkshoorn L, Duim B, Otsen M, et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol* 1999;37:3083-91.
- Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol* 1999;7:482-7.
- Swaminathan B, Barrett TJ, Hunter SB, Tauxe RV, CDC PulseNet Task Force. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerg Infect Dis* 2001;7:382-9.
- Canhos VP, Manfio GP, Blaine LD. Software tools and databases for bacterial systematics and their dissemination via global networks. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1993-94;64:205-29.
- Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* 1986;51:873-84.
- Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3140-5.
- Smith NH, Holmes EC, Donovan GM, Carpenter GA, Spratt BG. Networks and groups within the genus *Neisseria*: analysis of *argF*, *recA*, *rho*, and 16S rRNA sequences from human *Neisseria* species. *Mol Biol Evol* 1999;16:773-83.
- Feil E, Zhou J, Maynard Smith J, Spratt BG. A comparison of the nucleotide sequences of the *adk* and *recA* genes of pathogenic and commensal *Neisseria* species: evidence for extensive interspecies recombination within *adk*. *J Mol Evol* 1996;43:631-40.
- Boyd EF, Nelson K, Wang FS, Whittam TS, Selander RK. Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1280-4.
- Enright M, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998;144:3049-60.
- Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38:1008-15.
- Dingle KE, Colles FM, Wareing DRA, Ure R, Fox AJ, Bolton FJ, et al. Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni*. *J Clin Microbiol* 2001;39:14-23.
- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2002;40:1963-71.
- Salcedo C, Arreaza L, Alcalá B, De la Fuente L, Vázquez JA. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Listeria monocytogenes* clones. *J Clin Microbiol* 2003;41:757-62.
- Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics* 2001;17:1077-83.
- Enright MC, Knox K, Griffiths D, Crook DW, Spratt BG. Molecular typing of bacteria directly from cerebrospinal fluid. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:627-30.
- Diggie MA, Bell CM, Clarke SC. Nucleotide sequence-based typing of meningococci directly from clinical samples. *J Med Microbiol* 2003;52:505-8.
- Caugant DA, Bovre K, Gaustad P, Bryn K, Holten E, Hoiby EA, et al. Multilocus genotypes determined by enzyme electrophoresis of *Neisseria meningitidis* isolated from patients with systemic disease and from healthy carriers. *J Gen Microbiol* 1986;132:641-52.
- Caugant DA, Mocca LF, Frasch CE, Froholm LO, Zollinger WD, Selander RK. Genetic structure of *Neisseria meningitidis* populations in relation to serogroup, serotype, and outer membrane protein pattern. *J Bacteriol* 1987;169:2781-92.
- Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4384-8.
- Van Looveren M, Caugant DA, Chapelle S, Carion F, Goossens H. Interpreting the rising incidence of meningococcal disease in Belgium: the contribution of molecular typing. *J Med Microbiol* 2001;50:986-90.
- Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdani N, Sachchi CT, Taha MK, Ajello GW, et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis* 2002;185:1596-605.
- Bygraves JA, Urwin R, Fox AJ, Gray SJ, Russell JE, Feavers IM, et al. Population genetic and evolutionary approaches to analysis of *Neisseria meningitidis* isolates belonging to the ET-5 complex. *J Bacteriol* 1999;181:5551-6.
- Jolley KA, Kalmusova J, Feil EJ, Gupta S, Musilek M, Kriz P, et al. Carried meningococci in the Czech Republic: a diverse recombining population. *J Clin Microbiol* 2000;38:4492-8.
- Alcalá B, Salcedo C, Arreaza L, Berrón S, De la Fuente L, Vázquez JA. The epidemic wave of meningococcal disease in Spain in 1996-1997: probably a consequence of strain displacement. *J Med Microbiol* 2002;51:1102-6.
- Tzanakaki G, Urwin R, Musilek M, Kriz P, Kremastinou J, Pangalis A, et al. Phenotypic and genotypic approaches to characterization of isolates of *Neisseria meningitidis* from patients and their close family contacts. *J Clin Microbiol* 2001;39:1235-40.
- Feil EJ, Smith JM, Enright MC, Spratt BG. Estimating recombinational parameters in *Streptococcus pneumoniae* from multilocus sequence typing data. *Genetics* 2000;154:1439-50.
- Feldman C, Klugman KP. Pneumococcal infections. *Curr Opin Infect Dis* 1997;10:109-15.
- Arreaza L, Alcalá B, Salcedo C, De la Fuente L, Vázquez JA. Dynamics of the *penA* gene in serogroup C meningococcal strains. *J Infect Dis* 2003;187:1010-4.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001;39:2565-71.
- Klugman KP. The successful clone: the vector of dissemination of resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1-6.
- McGee L, Goldsmith CE, Klugman KP. Fluoroquinolone resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* belonging to international multiresistant clones. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:173-6.
- Vázquez JA. El desarrollo de vacunas frente a meningococo: un largo, tortuoso y aún inacabado camino. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20:313-5.
- Black S, Shinefield H, Fireman B, Lewis E, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. Northern California Kaiser Permanente Vaccine Study Center Group. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:187-95.
- Maiden MC, Spratt BG. Meningococcal conjugate vaccines: new opportunities and new challenges. *Lancet* 1999;354:615-6.

ANEXO 1. *Multilocus sequence typing*: el marcador molecular de la era Internet

1. **La detección por parte de métodos moleculares como PFGE, AP-PCR, AFLP de pequeñas variaciones en el genoma bacteriano que se acumulan rápidamente en el proceso de dispersión de una cepa concreta, supone:**
 - a) Una ventaja en los estudios de epidemiología global o a largo plazo al permitir detectar un gran número de variantes.
 - b) Una ventaja en los estudios de epidemiología local o a corto plazo.
 - c) Es una característica que permite dar respuesta a ambos, estudios de epidemiología local y aquellos que analizan problemas relacionados con epidemiología global.
 - d) Esta característica no mejora sustancialmente el poder de estos marcadores en ningún sentido concreto.
 - e) Esta es una característica que permite detectar fácilmente la aparición de nuevos mecanismos de resistencia a antibióticos.
2. **El antecedente de *multilocus sequence typing* (MLST) es:**
 - a) El análisis de isoenzimas o MLEE.
 - b) El análisis de la movilidad electroforética de proteínas de membrana externa.
 - c) El análisis de ADN tras digestión y electroforesis en campo pulsado.
 - d) No hay un método bien definido que suponga un antecedente claro del MLST.
 - e) Una combinación de a) y c).
3. **MLST consigue reducir el número de *loci* o genes analizados en comparación con el análisis de isoenzimas porque:**
 - a) No es cierto que MLST reduzca el número de *loci* analizados.
 - b) Porque analiza genes con un alto grado de variabilidad.
 - c) Porque analiza genes con un bajo grado de variabilidad.
 - d) Porque la secuencia permite detectar muchas más variantes que las que se detectan con el análisis de la movilidad de enzimas.
 - e) Porque detecta variaciones que se acumulan muy rápidamente en el genoma.
4. **Si un grupo pretende desarrollar MLST para una especie en la que no se ha desarrollado hasta el momento, deberá:**
 - a) Estandarizar el método con el mismo protocolo utilizado en la especie más próxima en la que ya esté desarrollado.
 - b) Proceder a seleccionar tanto genes como fragmentos dentro de éstos. La aplicación es universal, pero el desarrollo, no.
 - c) Los genes son siempre los mismos por lo que sólo se procede a diseñar iniciadores específicos en cada especie.
 - d) El MLST sólo puede aplicarse y desarrollarse en especies que tengan la totalidad del genoma secuenciado.
 - e) Debe procederse a seleccionar los genes a utilizar. En función de la variabilidad obtenida, el número finalmente seleccionado varía entre 7 y 12.
5. **En el proceso de desarrollo de MLST para una nueva especie debe seguirse la norma de:**
 - a) Que los genes seleccionados estén localizados en una zona concreta del cromosoma bacteriano.
 - b) Que los genes estén dispersos a lo largo del cromosoma y flanqueados por genes de virulencia o de resistencia a antimicrobianos.
 - c) Que los genes presenten una selección neutra, estén dispersos a lo largo del cromosoma y que no estén flanqueados por genes sometidos a fuerte presión selectiva.
 - d) No hay una norma general para la elección de genes en el desarrollo de MLST.
 - e) Generalmente son genes codificantes de enzimas metabólicas localizadas en islas de patogenicidad.
6. **La asignación de alelos en MLST es autenticada porque:**
 - a) Se procede a secuenciar las dos hebras de ADN.
 - b) Se verifica varias veces el resultado.
 - c) El resultado se alinea con alelos existentes en una base de datos.
 - d) La asignación de alelos se realiza de forma casi automática y no hay ningún mecanismo de autenticación.
 - e) La secuenciación se realiza en capilar y no en gel.
7. **La aplicación de MLST directamente en muestras clínicas, en ausencia de cultivo utiliza:**
 - a) Una multiplex PCR para la amplificación simultánea de todos los fragmentos.
 - b) Una PCR en tiempo real, con utilización de sondas internas de los fragmentos.
 - c) Una *nested*-PCR, con una primera amplificación con iniciadores flanqueantes de los fragmentos amplificados en el esquema normal de MLST para cultivos, y una segunda utilizando los iniciadores estándar.
 - d) Una *nested*-PCR con un iniciador externo y otro interno de los fragmentos amplificados en el esquema normal de MLST para cultivos.
 - e) Una extracción de ADN en condiciones alcalinas.
8. **La aplicación de MLST en *Neisseria meningitidis* ha permitido conocer con un alto grado de exactitud:**
 - a) El proceso de dispersión de clones multirresistentes.
 - b) El desarrollo de resistencia moderada a penicilina.
 - c) La dispersión e impacto de líneas clonales hipervirulentas.
 - d) El análisis de mecanismos de virulencia en la especie.
 - e) El nivel de recombinación genética entre meningococo y otras especies próximas.
9. **La aplicación de MLST ha mostrado un alto grado de eficacia en la vigilancia de los procesos de intercambio genético capsular que se producen en *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* porque:**
 - a) Porque permite identificar el origen común de cepas que expresan diferente polisacárido capsular.
 - b) No está plenamente demostrado que se produzcan este tipo de procesos en las especies mencionadas.
 - c) Porque el MLST analiza la variabilidad de algunos genes codificantes de antígenos externos como los de la cápsula y otros.
 - d) No es posible aplicar el MLST a este nivel al estar implicados varios genes diferentes en los operones capsulares.
 - e) Esta afirmación sólo es cierta cuando la aplicación de MLST se produce junto con el análisis de campo pulsado, más indicado para el estudio de complejos clonales.
10. **El análisis mediante MLST de las cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina ha venido a demostrar que:**
 - a) La resistencia a meticilina tiene su origen en mutaciones puntuales en el gen *mecA* provocadas de forma específica por la elevada utilización del antimicrobiano.
 - b) Las cepas sensibles pertenecen generalmente a los mismos clones que las cepas resistentes.
 - c) Hay clones específicos que están asociados con resistencia mientras que otros lo están con susceptibilidad.
 - d) Hay un solo clon, ampliamente distribuido, de estafilococos con resistencia a meticilina.
 - e) Las características concretas del mecanismo genético de resistencia a meticilina no permiten concluir nada tras la aplicación de MLST.