

PROTOCOLOS RED DE LABORATORIOS PARA LA VIGILANCIA DE LOS MICROORGANISMOS RESISTENTES (RedLabRA)

**Tipificación bacteriana mediante *Multi Locus Sequence Typing (MLST)***

Aprobado por:	Código:	<b>RedLabRa-I-004</b>
Fecha: 20/10/2020	Ed.:	<b>01</b>
Firma:	Fecha edición:	<b>20/10/2020</b>

**OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN**

La **Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST)** es una técnica de epidemiología molecular que permite la tipificación bacteriana mediante la identificación de polimorfismos tras la amplificación y secuenciación de fragmentos de entre 300-500 pb de 7 genes conservados, diferentes para cada especie bacteriana. Se trata de una técnica sencilla, objetiva y fácilmente reproducible que permite identificar asociaciones clonales y establecer relaciones evolutivas. Sin embargo, no presenta una alta capacidad discriminativa.

**RECURSOS MATERIALES**

Equipos

- Termociclador.
- Secuenciador de ácidos nucleicos.
- Tubos eppendorf 0.2 ml.

Materiales

- Agua destilada libre de nucleasas.
- Taq MIX (amplificación).
- ExoSAP-IT (secuenciación).
- Iniciadores específicos de los 7 genes de cada especie.

**REALIZACIÓN**

1. Realizar un cultivo bacteriano puro en **Agar Müeller-Hinton**.
2. **Extraer el ADN** mediante hervido a 100°C 10min.
3. **Amplificar los 7 genes conservados** según la especie:
  - a. Genes e iniciadores de amplificación:

<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
Gen	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Longitud del fragmento (pb)
gapA	gapA_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG	440 - 460
	gapA_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAACGGCTTTGATGGCTT	
rpoB	rpoB_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA	308-328
	rpoB_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
phoE	phoE_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCCAGTTCTTCGG	411-422
	phoE_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
mdh	mdh_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACCTCGCTTCAGGTTTCAG	465-480
	mdh_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCAGCAGCAG	
infB	infB_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCCAGTTCTTCGG	316-319
	infB_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCTTTCAGCTCAAGACTTC	
tonB	tonB_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCCAGTTCTTCGG	390-432
	tonB_R	TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	
pgi	pgi_F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	426-434
	pgi_R	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	

<b><i>Escherichia coli</i></b>			
<b>Gen</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Longitud del fragmento (pb)</b>
adk	adk_F	ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG	536
	adk_R	CCGTCAACTTTTCGCGTATTT	
fumC	fumC_F	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	354-478
	fumC_R	GTACGCAGCGAAAAAGATTC	
gyrB	gyrB_F	TCGGCGACACGGATGACGGC	460-469
	gyrB_R	ATCAGGCCTTCACGCGCATC	
icd	icd_F	ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA	515-519
	icd_R	GGACGCACCAGGATCTGTT	
mdh	mdh_F	ATGAAAGTCGCAGTCTCGGGCGCTGCTGGCGG	416-455
	mdh_R	TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT	
purA	purA_F	TCGGTAACGGTGTGTGCTG	475-478
	purA_R	CATACGGTAAGCCACGCAGA	
recA	recA_F	ACCTTTGTAGCTGTACCACG	510
	recA_R	AGCGTGAAGGTAAAACCTGTG	

<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>			
<b>Gen</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Longitud del fragmento (pb)</b>
arcC	arcC_F	TTGATTCACCAGCGCGTATTGTC	435-522
	arcC_R	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	
aroE	aroE_F	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	453-456
	aroE_R	GGTGTGTATTAATAACGATATC	
glpF	glpF_F	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	450-478
	glpF_R	TGGTAAAATCGCATGTCCAATTC	
gmk	gmk_F	ATCGTTTTATCGGGACCATC	417-420
	gmk_R	TCATTAACCTACAACGTAATCGTA	
pta	pta_F	GTTAAAATCGTATTACCTGAAGG	468-474
	pta_R	GACCCTTTTGTGAAAAGCTTAA	
tpi	tpi_F	TCGTTCACTTCTGAACGTCGTGAA	402
	tpi_R	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	
yqiL	yqi_F	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	507-516
	yqi_R	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	

<b>Enterobacter cloacae</b>			
<b>Gen</b>	<b>Iniciador</b>	<b>Secuencia 5'-3'</b>	<b>Longitud del fragmento (pb)</b>
pyrG	pyrG-F	AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT	481-535
	pyrG-R	GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC	
dnaA	dnaA-F	AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC	696-749
	dnaA-R	KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG	
leuS	leuS-F	GATCARCTSCCGGKATCCTGCCGGAAG	791-845
	leuS-R	ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT	
gyrB	gyrB-F	TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA	1099-1153
	gyrB-R	GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCCTTCCA	
fusA	fusA-F	TCGCGTTCGTTAACAAAATGGACCGTAT	852-906
	fusA-R	TCGCCAGACGGCCAGAGCCAGACCCAT	
rplB	rplB-F	GTAACCGACATCTCCGGGTCGTGCCA	692-746
	rplB-R	ACCTTTGGTCTGAACGCCCCACGGAGTT	
rpoB	rpoB-F	CCGAACCGTTCGCGAACATCGCGCTGG	694-749
	rpoB-R	CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT	

b. Condiciones de amplificación:

<b>Klebsiella pneumoniae y Enterobacter cloacae</b> (para todos los genes)		
<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
94°C	5min	30
94°C	1min	
50°C	1min	
72°C	2min	
72°C	10min	
4°C	∞	

<b>Staphylococcus aureus</b> (para todos los genes)		
<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95°C	5min	30
95°C	1min	
55°C	1min	
72°C	1min	
72°C	5min	
4°C	∞	

<b>Escherichia coli</b>								
<b>Genes adk, fumC y icd</b>			<b>Genes purA y recA</b>			<b>Genes gyrB y mdh</b>		
<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>	<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>	<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
95°C	2min	30	95°C	2min	30	95°C	2min	30
95°C	1min		95°C	45seg		95°C	1min	
54°C	1min		58°C	45seg		60°C	1min	
72°C	2min		72°C	2min		72°C	2min	
72°C	7min		72°C	7min		72°C	7min	
4°C	∞		4°C	∞		4°C	∞	

c. Se pueden consultar genes, iniciadores y condiciones de amplificación para MLST de otras especies en <https://pubmlst.org/organisms/>

4. Detectar los resultados positivos mediante electroforesis en **gel de agarosa** low EEO al 1%.

5. **Purificar y secuenciar** de los fragmentos seleccionados. Para *E. coli* y *S. aureus* se utilizan los mismos iniciadores usados para la amplificación, mientras que para *K. pneumoniae* y *E. cloacae* se utilizan los siguientes:

<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>		
Gen	Iniciador	Secuencia 5'-3'
pgi	pgi_seq_F	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
	pgi_seq_R	TTATAGCGGTTAATCAGGCGT
resto	Seq_F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	Seq_R	TTGTGAGCGGATAACAATTC

<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>		
Gen	Iniciador	Secuencia 5'-3'
gyrB	gyrB_seq_F	AAAACCGGTACYATGGTGCCTTTCTGG
	gyrB_seq_R	GCAGAACCGCCCGCGGAGTCCCCTTCC
fusA	fusA_seq_R	ATCTCTTACGYTCGTTAGCGTGCATCT
resto	Mismos iniciadores que los usados para la amplificación.	

6. **Comparar y cortar las secuencias** obtenidas según las secuencias de referencia de cada gen.

Enlaces de descarga de las secuencias de referencia:

- Para *K. pneumoniae*:  
[https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef&page=downloadAlleles](https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=downloadAlleles).
- Para *E. coli*:  
[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef&page=downloadAlleles&tree=1](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=downloadAlleles&tree=1).  
Seleccionar "Typing" – "MLST (Achtman)"
- Para *S. aureus*:  
[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_saureus\\_seqdef&page=downloadAlleles](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_saureus_seqdef&page=downloadAlleles).
- Para *E. cloacae*:  
[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_ecloacae\\_seqdef&page=downloadAlleles](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_ecloacae_seqdef&page=downloadAlleles).
- Para otras de las especies:  
<https://pubmlst.org/organisms/>.  
Seleccionar la especie – "Typing" – "Downloads" – "Allele sequences" – "Strain typing" – "MLST".

7. **Asignar un número a la variante** obtenida de cada gen para determinar el perfil alélico de la cepa.

- Para *K. pneumoniae*:  
[https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef&page=sequenceQuery](https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=sequenceQuery).  
Seleccionar el esquema "MLST".
- Para *E. coli*:  
[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef&page=sequenceQuery](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=sequenceQuery).  
Seleccionar el esquema "MLST (Achtman)".
- Para *S. aureus*:  
[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_saureus\\_seqdef&page=sequenceQuery](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_saureus_seqdef&page=sequenceQuery).  
Seleccionar el esquema "MLST".
- Para *E. cloacae*:  
[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_ecloacae\\_seqdef&page=sequenceQuery](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_ecloacae_seqdef&page=sequenceQuery).  
Seleccionar el esquema "MLST".
- Para otras de las especies:  
<https://pubmlst.org/organisms/>.  
Seleccionar "Typing" - "Single sequence" y el esquema "MLST".

8. **Asignar un serotipo (ST)** comparando con los perfiles alélicos de bases de datos.

a. Para *K. pneumoniae*:

[https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef&page=profiles](https://bigsdbs.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdbs/bigsdbs.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=profiles).

Seleccionar el esquema "MLST".

b. Para *E. coli*:

[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_escherichia\\_seqdef&page=profiles](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles).

Seleccionar el esquema "MLST (Achtman)".

c. Para *S. aureus*:

[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_saureus\\_seqdef&page=profiles&scheme\\_id=1](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_saureus_seqdef&page=profiles&scheme_id=1).

d. Para *E. cloacae*:

[https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst\\_ecloacae\\_seqdef&page=profiles&scheme\\_id=1](https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_ecloacae_seqdef&page=profiles&scheme_id=1).

e. Para otras de las especies:

<https://pubmlst.org/organisms/>.

Seleccionar la especie - "Typing" - "By MLST allelic profile".