

Tipificación multilocus de secuencias aplicada a la caracterización molecular de hemoparásitos en el ganado bovino

Multi-locus sequence typing applied to the molecular characterization of hemoparasites in cattle

Adrian Alberto Díaz-Sánchez, Siomara Martínez-Marrero, Belkis Corona-González✉

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Los marcadores moleculares son valiosas herramientas en la investigación de la diversidad genética, la estructura poblacional y evolutiva de importantes agentes infecciosos, y tienen un enorme impacto en el diseño e implementación de estrategias de control. Para la tipificación de microorganismos patógenos se han desarrollado varios métodos, los cuales difieren en el poder discriminativo, la reproducibilidad y la facilidad de interpretación. La tipificación multilocus de secuencias se propuso en 1998 como un método universal y definitivo para la caracterización de bacterias, utilizando el patógeno *Neisseria meningitidis* como objeto de estudio. Actualmente, se cuenta con un número cada vez mayor de protocolos de tipificación multilocus de secuencias desarrollados y empleados en investigaciones epidemiológicas a diferentes escalas, así como en estudios de biología y estructura de distintas poblaciones microbianas, análisis de patogenicidad y evolución bacteriana. En el presente trabajo se exponen, de forma general, los principales esquemas de tipificación basados en esta metodología para el estudio de hemoparásitos que afectan el ganado bovino.

Palabras clave: marcadores moleculares, tipificación multilocus de secuencias, PCR, hemoparásitos, bovino.

ABSTRACT: Molecular markers are valuable tools for researches on the genetic diversity, population and evolutionary structure of important infectious agents, and they have a great impact on the design and implementation of control strategies. For the typing of pathogenic microorganisms, several methods have been developed differing in the discriminative power, reproducibility and easy of interpretation. The multi-locus sequence typing was proposed in 1998 as a universal and definitive method for the characterization of bacteria, using the pathogen *Neisseria meningitidis* as the object of study. There is currently an increasing number of multi-locus sequence typing protocols developed and used in epidemiological researches at different scales, as well as in biology and structure studies of different microbial populations, pathogenicity analysis and bacterial evolution. In the present work, the main typing schemes based on this methodology for the study of hemoparasites that affect cattle.

Key words: molecular markers, multi-locus sequence typing, PCR, hemoparasites, cattle.

✉ Autor para correspondencia: *Belkis Corona-González*. E-mail: bcorona@censa.edu.cu

Recibido: 20/1/2017

Aceptado: 18/6/2017

INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas el auge de enfermedades emergentes y reemergentes ha producido un interés creciente con relación a la delimitación de brotes de enfermedades infecciosas con aspectos estrechamente relacionados con bacterias patógenas, como el incremento en la virulencia, la transmisibilidad y la multiresistencia a antibióticos (1). La capacidad de identificar con precisión las cepas de un agente infeccioso causante de una enfermedad es fundamental en la toma de decisiones para el establecimiento de programas de vigilancia epidemiológica y estrategias de control, a fin de lograr un aseguramiento efectivo de la salud clínica y veterinaria (2).

Actualmente, el número de genomas bacterianos pertenecientes a importantes patógenos de interés clínico y veterinario, secuenciados completamente, aumenta a un ritmo acelerado debido a la expansión en la capacidad de procesamiento de la información que brindan las nuevas tecnologías de secuenciación de última generación (3).

La disponibilidad de estas secuencias, depositadas en bases de datos universales de libre acceso, ha provocado considerable interés para el desarrollo y la evaluación de metodologías en la identificación, localización y prevención de la propagación de agentes infecciosos. Los métodos basados en el análisis de secuencias de ADN han ganado un interés creciente en la búsqueda de métodos de tipificación más rápidos y menos laboriosos, ya que estos permiten la obtención de un resultado concreto fácilmente portable e intercambiable, ofreciendo una excelente reproducibilidad tanto a nivel intra como interlaboratorio (4).

Varios métodos se han desarrollado para la tipificación de microorganismos patógenos, que difieren en poder discriminatorio, reproducibilidad y complejidad en la interpretación de los resultados (5,6).

En la actualidad, uno de los métodos más prometedores es la tipificación multilocus de

secuencias [de sus siglas en inglés, *Multi-locus Sequence Typing* (MLST)]. Esta metodología se desarrolló por Maiden *et al.* (2) a finales de la década del 90, basada en la secuenciación de fragmentos de siete genes conservados “housekeeping” que no se encuentran sometidos a presión selectiva, donde las variaciones en los diferentes *locus* se detectan de forma directa mediante el análisis de las secuencias obtenidas, lo que permite la identificación de grupos de microorganismos con genotipos idénticos (clones) o altamente relacionados (líneas clonales) (2).

Durante la estandarización de esta metodología 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; por tanto, se decidió analizar en cada gen solo un fragmento interno de 450-500 pb, cuyo nivel de variabilidad, combinado entre los genes analizados, proporciona un alto grado de discriminación (7).

La propuesta de MLST como una metodología universal fue posible por tres avances en microbiología molecular: (i) perfeccionamiento en el conocimiento sobre la evolución y biología de las poblaciones bacterianas (2); (ii) incremento en la disponibilidad y disminución del alto costo de los servicios de secuenciación de nucleótidos (8); (iii) la evolución de la tecnología de la información, en particular el desarrollo de Internet como un medio eficiente, instantáneo y rentable de intercambio de información (9). Esta metodología posee la deseable combinación de poder discriminatorio, reproducibilidad y fácil intercambio de resultados entre laboratorios alejados geográficamente.

En la última década han surgido otras técnicas basadas en la comparación de múltiples *locus*, entre las que se destaca el análisis multilocus de repeticiones en tándem de número variable [de sus siglas en inglés, *Multiple Locus Variable Number Tandem*

Repeats Analysis (MLVA)], que se basa en el análisis multilocus de secuencias polimórficas repetidas en tándem (VNTR).

Los estudios comparativos entre MLVA y MLST han dado resultados similares (10), aunque en especies emergentes el enfoque MLVA ha mostrado mayor poder discriminatorio (11). Esta técnica comparte todas las ventajas del esquema MLST en términos de portabilidad y reproducibilidad a un costo menor, pero las regiones VNTR pueden evolucionar demasiado rápido para proporcionar relaciones filogenéticas confiables entre cepas estrechamente relacionadas, y la diferencia de tamaño no siempre puede reflejar el número real de repeticiones en tándem debido a la presencia de inserciones y deleciones (12). También ha tenido gran importancia el método de tipificación multilocus de secuencias ribosomales [de sus siglas en inglés, *Ribosomal Multi-locus Sequence Typing* (rMLST)], que analiza la variación molecular entre los 53 genes que codifican para las subunidades de los ribosomas bacterianos (3).

Este nuevo método persigue la integración de un método taxonómico y de tipificación en un esquema MLST. Este método no requiere de un genoma secuenciado, los *loci* blanco de análisis se conservan en todo el dominio de las bacterias y no es necesario el reanálisis de las designaciones de alelos existentes (13). Aunque es más costoso, el rMLST probablemente proporcione una mejor resolución que las metodologías anteriores, que con la disminución en un futuro de los costos de secuenciación de ADN hacen que sea una técnica prometedora. El método aún requiere perfeccionar algunos aspectos, pero ciertamente tiene el potencial de proporcionar un método de tipificación bacteriana universal extendiendo la idea del esquema MLST.

En la presente revisión se pretende exponer los principales esquemas de tipificación basados en MLST desarrollados y evaluados en hemoparásitos de importancia veterinaria en el ganado bovino, así como la contribución de los

mismos en la comprensión de la diversidad genética y la estructura poblacional de estos patógenos.

Anaplasma marginale

Anaplasma marginale es el agente causante de la anaplasmosis bovina, una enfermedad presente en regiones tropicales y subtropicales del mundo, transmitida por garrapatas, donde *Rhipicephalus microplus* se considera como el vector biológico de mayor importancia. Esta rickettsia es un parásito intracelular obligado de eritrocitos bovinos, que provoca severas pérdidas económicas en las regiones tropicales y subtropicales (14).

Varios métodos y marcadores moleculares se han desarrollado para caracterizar la diversidad genética de *A. marginale*; estos se centran fundamentalmente en las regiones variables de las principales proteínas de superficie (MSP) MSP1a y MSP4, las cuales son útiles para discriminar aislamientos (15-17). Estrada-Pena *et al.* (18) describen la variabilidad de la secuencia de la proteína de membrana MSP1a en aislamientos de todo el mundo e informan que este marcador molecular está asociado solo a regiones ecológicas, lo cual infiere que la evolución de *A. marginale* puede estar relacionada con rasgos ecológicos que afectan los vectores. Por tanto, es necesario desarrollar métodos precisos para la genotipificación y caracterización de aislamientos, tanto para el estudio de la estructura como la dinámica de las poblaciones de *A. marginale*.

Recientemente, Guillemi *et al.* (19) describieron el desarrollo y la evaluación del primer ensayo MLST para *A. marginale* y su aplicación para los estudios de estructura de la población. El diseño de este ensayo fue posible debido a la disponibilidad de la secuencia del genoma completo de *A. marginale* y se aplicó en el estudio de 58 aislamientos de diferentes regiones del mundo, teniendo en cuenta los resultados publicados previamente por Estrada-Pena *et al.* (18) y Ruybal *et al.* (20). Este estudio se realizó utilizando genes aplicados para otros

ensayos MLST en microorganismos relacionados (21), previamente descritos en la literatura como genes de referencia; estos son genes de copia única y codifican para proteínas conservadas (22). Finalmente se eligieron siete genes que se encuentran distribuidos homogéneamente a través del genoma: *dnaA*, *ftsZ*, *groEL*, *lipA*, *recA*, *secY* y *sucB*.

Entre los genes analizados se identificó una alta diversidad de nucleótidos ($S_i = 0,9958$) con un alto número de STs por cepa (52 STs en 58 cepas), mientras que la proporción K_a/K_s mostró una gran proporción de sustituciones similares, indicativo de selección negativa. Estos resultados están acorde con lo que se espera en una bacteria intracelular obligada, ya que este tipo de organismo puede mostrar un equilibrio genómico después de la adaptación al parasitismo intracelular (23). Además, se detectaron eventos de recombinación en casi todos los genes, lo cual junto con la coexistencia de más de una cepa de *A. marginale* en un mismo hospedero, podría sugerir que el fenómeno de superinfección es una fuente potencial de variación en la población. En algunos casos se encontraron secuencias parentales y se identificó un patrón de recombinación de sustitución. Recientemente, la recombinación homóloga se convirtió en evidente por los resultados de estudios MLST obtenidos en organismos relacionados como *Orientia tsutsugamushi* (24) y *A. phagocytophilum* (25).

El análisis de los perfiles alélicos realizado a través del programa goeBURST muestra la existencia de dos complejos clonales principales sin una asociación evidente entre regiones geográficas y genotipos, ya que las secuencias tipo provenientes de diferentes regiones fueron agrupadas en un mismo complejo clonal. Por otro lado, la prueba AMOVA confirmó la aparición de al menos dos grupos principales genéticamente divergentes. Finalmente, se concluyó que la composición de estos grupos refleja el impacto de rasgos de corte históricos y ambientales en la estructura de la población *A. marginale* (19).

El desarrollo y la evaluación de este primer ensayo MLST para *A. marginale* permitió diferenciar los 58 aislamientos, con un alto poder de discriminación, y estimar algunos parámetros básicos de biología poblacional, incluyendo los índices de diversidad y el impacto del proceso de recombinación homóloga.

Anaplasma phagocytophilum

Anaplasma phagocytophilum es una bacteria Gram negativa, intracelular obligada, que se replica en el interior de los neutrófilos (26). Esta rickettsia se considera un patógeno de importancia veterinaria con un amplio rango de hospederos y se reconoce como el agente causante de la fiebre transmitida por garrapatas en ganado bovino, caprino y ovino, así como la anaplasmosis granulocítica canina, equina y humana (27); esta última es una zoonosis de importancia clínica clasificada como una enfermedad emergente (28).

Los principales vectores que transmiten esta bacteria son garrapatas del género *Ixodes* spp. distribuidas geográficamente en el hemisferio norte con predominio de *Ixodes ricinus* en gran parte de Europa, *I. scapularis* e *I. pacificus* en América del Norte e *I. persulcatus* en Europa del Este y Asia (29). Actualmente, se considera que *A. phagocytophilum* no se transmite de forma transovárica, al menos en garrapatas del género *Ixodes* spp., por tanto, depende de reservorios naturales para completar su ciclo de vida (30).

Entre los marcadores moleculares empleados con mayor frecuencia en estudios de caracterización filogenética de nuevos aislados de *A. phagocytophilum* se destacan los genes ARNr 16S, *groESL*, *ankA*, *msp2* y *msp4* (31). Todos estos genes, con excepción del gen ARNr 16S, han revelado altos niveles de diversidad genética, pero a menudo los estudios filogenéticos, basados en un único gen variable, producen resultados inconsistentes (32).

Huhn *et al.* (25) desarrollaron un ensayo MLST con el objetivo de realizar un análisis de la estructura poblacional de *A.*

phagocytophilum y determinar específicamente cuáles cepas de este patógeno circulan en las diferentes especies de animales hospederos, así como cuáles especies de animales salvajes son reservorios potenciales para la transmisión de la anaplasmosis granulocítica, tanto en humanos como en animales de granja y de compañía en el continente europeo.

Se analizaron 380 muestras positivas para *A. phagocytophilum* procedentes de humanos, animales y garrapatas *I. ricinus*; también se incluyeron en el estudio 11 muestras procedentes de Estados Unidos. Para el desarrollo de este estudio los siete genes conservados seleccionados fueron *pheS*, *glyA*, *fumC*, *mdh*, *sucA*, *dnaN* y *atpA*, los cuales se encuentran distanciados al menos 10 kb en el genoma de *A. phagocytophilum* HZ disponible en el GenBank con número de acceso CP000235. También se realizó una caracterización molecular basada en los genes ARNr 16S y *ankA*, con la finalidad de evaluar la concordancia entre los resultados obtenidos por MLST y la genotipificación basada en el análisis de secuencia de un único gen variable (25).

Los resultados en este estudio infieren que las cepas de *A. phagocytophilum* procedentes de humanos, perros, caballos, jabalíes y puerco espín son homólogas, ya que, a diferencia de las cepas procedentes de Estado Unidos, estas pertenecen a un mismo complejo clonal y se agrupan juntas en el análisis filogenético basado en el gen *ankA*. Estos resultados se corresponden con estudios previos realizados en el viejo continente, donde aislamientos de *A. phagocytophilum* en humanos, canes y equinos se agrupan juntos en los análisis filogenéticos basados en los genes *groESL* (33) y *ankA* (32).

Otro resultado interesante fue la incapacidad del gen ARNr 16S para diferenciar entre aislamientos europeos y norteamericanos, basado en el análisis filogenético de secuencias, a diferencia del ensayo MLST donde ninguno de los aislamientos compartió alelos en común y se demostró diversificación transcontinental. Por tanto, los estudios genotípicos con el gen

ARNr 16S requieren la combinación con otro *loci* como genes de referencia o el gen *ankA*, ya que por sí solo no tiene suficiente valor de discriminación (34).

La principal desventaja del MLST desarrollado puede estar en la posibilidad de la ocurrencia de infecciones múltiples de un mismo hospedero con diferentes cepas de *A. phagocytophilum*, lo cual ocurre frecuentemente y es un fenómeno que ha sido descrito previamente en otras especies de mamíferos domésticos y salvajes (35).

Huhn *et al.* (25) concluyeron que animales de vida salvaje, como el jabalí y el puerco espín, pueden actuar como reservorios en la transmisión de la anaplasmosis granulocítica en humanos y animales domésticos, ya que los aislamientos de *A. phagocytophilum* procedentes de estas especies se agrupan en un mismo complejo clonal. No obstante, a pesar de que este análisis del tipo MLST pueda ser afectado por la ocurrencia de infecciones múltiples en un mismo hospedero, este esquema constituye una valiosa herramienta para investigar la variación genética en *A. phagocytophilum*.

Ehrlichia ruminantium

Ehrlichia ruminantium es el agente causal de la hidropericarditis o coudriosis, una enfermedad fatal en rumiantes, transmitida por garrapatas del género *Amblyomma*. Esta enfermedad es endémica en países de África subsahariana, Madagascar y algunas islas del Caribe, desde donde representa una amenaza para el continente americano en regiones donde están presentes especies de vectores competentes (36).

En países endémicos la coudriosis causa un gran impacto económico, fundamentalmente en términos de mortalidad, costos por tratamiento con acaricidas, vacunación, reducción de la productividad y prohibición del comercio ganadero (37). Recientemente, la detección de ADN de *E. ruminantium* se ha asociado con tres casos clínicos mortales en pacientes humanos, lo que sugiere que esta bacteria, o al menos

algunas cepas dentro de esta especie, pueden ser zoonóticas, al igual que otros miembros de la familia *Anaplasmataceae* (38). Aunque se han desarrollado varios tipos de vacunas para el tratamiento de la coudriosis, estas han tenido una eficiencia limitada en estudios de campo, lo cual indica la existencia de diferentes genotipos de *E. ruminantium* con diferentes capacidades de protección cruzada, circulando simultáneamente en una misma región (39).

Actualmente, se han desarrollado varios métodos y marcadores moleculares para caracterizar la diversidad genética de esta rickettsia, entre estos el gen *map1* que codifica para la proteína de superficie MAP1 y muestra un elevado nivel de polimorfismo en su secuencia entre diferentes cepas (40). No obstante, aunque el análisis de secuencias del gen *map1* permite caracterizar la diversidad genética entre aislamientos de campo, este no proporciona información fiable para el establecimiento adecuado de relaciones filogenéticas que permitan encontrar una correlación entre aislamientos (41).

Adakal *et al.* (21) desarrollaron un esquema MLST para *E. ruminantium* basado en ocho genes de referencia (*gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB*, y *sucA*). Este método demostró tener una resolución lo suficientemente alta para discriminar, incluso, entre los genotipos estrechamente relacionados que circulan en Burkina Faso. Sin embargo, los perfiles alélicos de este esquema MLST disponibles fueron limitados a colecciones geográficamente restringidas. Por tanto, teniendo en cuenta la amplia distribución de *E. ruminantium* en todo el continente africano, se hizo necesario la expansión de una base de datos global para incluir nuevos genotipos de diferentes orígenes geográficos, así como determinar la utilidad de este método para la detección de genotipos que circulan en zonas endémicas de coudriosis (42).

Para alcanzar estos objetivos, Nakao *et al.* (43) analizaron un panel de 17 cepas de referencia de orígenes geográficamente diversos y ocho muestras de garrapatas

Amblyomma variegatum positivas para *E. ruminantium* procedentes de Uganda. Todos los *loci* MLST fueron amplificados con éxito en las 25 muestras y se identificaron 21 secuencias tipo (ST), de las cuales 19 fueron de nuevo reporte.

Con estos resultados, Nakao *et al.* (43) infieren que las STs obtenidas son de cepas recombinantes originarias de países de África occidental. Una posible explicación para esta restricción regional es que los eventos de recombinación no se pudieron detectar correctamente, debido a la toma parcial de muestras o a los bajos niveles de diversidad genética entre las cepas analizadas. Por tanto, aún es necesario continuar compilando datos en el esquema MLST, especialmente de aquellas cepas que circulan en países del este y el sur de África, los cuales serán de gran valor para la comprensión de la función que desempeña la recombinación en la evolución del genoma bacteriano, a fin de proporcionar una visión general sobre la situación actual de la diversidad genética de *E. ruminantium* en los países africanos.

Podemos concluir que los eventos de recombinación identificados en este estudio demuestran que un método genotípico de múltiples *locus*, en lugar de los métodos basados en caracterizar un único gen, constituye un requisito previo para una adecuada comprensión de las relaciones filogenéticas de *E. ruminantium*. El hecho de que el esquema MLST empleado no consiguió discriminar entre dos cepas estrechamente relacionadas, pone de relieve la necesidad de mejorar dicho esquema o desarrollar otros métodos genotípicos de múltiples *locus* con poder de resolución superior, tales como el MLVA.

Babesia bovis* y *Babesia bigemina

Los protozoarios *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* son los agentes etiológicos de la babesiosis bovina, una enfermedad de importancia veterinaria que afecta notablemente la producción ganadera en

regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde *Rhipicephalus microplus* constituye el principal vector (44). Ambas especies de *Babesia* parasitan los eritrocitos del huésped mamífero asegurando la supervivencia a través de la reproducción asexual y la transmisión efectiva a su vector artrópodo. La fase aguda de la enfermedad se caracteriza por fiebre, anemia, hemoglobinuria e ictericia, lo cual resulta en altas tasas de mortalidad en rebaños susceptibles (45). Los costos debido a esta enfermedad no solo están relacionados con la mortalidad, abortos, pérdidas en la producción de leche y carne, sino también con costos atribuidos a la toma de medidas de control como los tratamientos acaricidas, la compra de vacunas y antiparasitarios (46).

Guillemi *et al.* (47) desarrollaron dos esquemas de MLST, utilizando fragmentos de secuencias de seis genes (*cyp*, *dnaJ*, *sbp3*, *sbp4*, *rcc* y *zfc*) para *B. bigemina* y siete (*gpad*, *check*, *dnaJ*, *pkid*, *rcc*, *rip9* y *rho4*) para *B. bovis*, con el fin de caracterizar molecularmente un conjunto de cepas de referencia y de campo con diferentes características fenotípicas y origen geográfico. El diseño de dicho esquema de MLST fue posible, en gran medida, a la disponibilidad de la secuencia del genoma completo de *B. bovis* y del genoma parcialmente terminado de *B. bigemina*.

Para la evaluación de ambos esquemas MLST, Guillemi *et al.* (47) trabajaron con 10 cepas de *B. bigemina* y 14 cepas de *B. bovis*. Durante el proceso de secuenciación se visualizaron picos de nucleótidos dobles superpuestos sobre las secuencias de los cromatogramas para ambas especies de *Babesia*. Los autores concluyeron que estos picos dobles encontrados solo se pueden atribuir a la presencia de infecciones mixtas con diferentes genotipos, ya que ambas especies de *Babesia* son haploides y todos los *loci* seleccionados fueron de copia única. En ambos hemoparásitos se encontró un alto nivel de diversidad de nucleótidos, con una relación ST/Cepa de 1 para *B. bovis* y 0,83 para *B. bigemina*. Simuunza *et al.* (48) obtuvieron

resultados similares en un estudio previo sobre *B. bovis*, en el cual se logró un único genotipo multilocus, atribuyendo la recombinación como la principal causa de este fenómeno.

A pesar de que el número de muestras estudiadas por Guillemi *et al.* (47) fue bajo, se encontró un elevado número de genotipos, junto con el hallazgo de más de un genotipo en la misma muestra proveniente de bovino; lo anterior indicó que en las regiones con alta tasa de infestación, las garrapatas pueden alimentarse de animales portadores de diferentes genotipos que tendrán la posibilidad de recombinar en el intestino del vector, dando como resultado la ocurrencia de intercambio genético. En este sentido, se realizó un análisis de recombinación donde fueron positivos cuatro *loci* en *B. bovis* y tres en *B. bigemina*, lo cual corrobora la hipótesis de ocurrencia de intercambio genético de ambos hemoparásitos en el vector. Consistente con esta hipótesis, no se detectó desequilibrio de ligamiento entre los genes para ninguno de los parásitos en estudio, lo cual indica la ausencia de estructura clonal y sí una fuerte influencia de la etapa sexual en acontecimientos de variación genética. Otro resultado de interés fue la incongruencia observada entre los árboles filogenéticos derivados de los *loci* individuales que componen ambos esquemas MLST, resultado que ha sido interpretado como evidencia de recombinación en diferentes microorganismos (49).

El programa goeBURST se empleó para dividir dos conjuntos de cepas en complejos clonales por comparación de sus perfiles alélicos. Este análisis indicó que solo dos aislamientos de *B. bovis* se relacionan estrechamente con el establecimiento de un único complejo clonal (ST11 y ST12) dentro de la colección estudiada. Este complejo clonal fue construido como consecuencia de que ambos aislamientos comparten seis de los siete *loci* en estudio. Estas cepas también comparten un origen geográfico y epidemiológico común, ya que corresponden a aislamientos de un brote de babesiosis en la provincia Corrientes,

Argentina. El hecho sugiere que la falta de una estructura de población más general se deba, probablemente, al hecho de que la mayoría de los aislamientos proceden de muestras no relacionadas (47).

En resumen, ambos esquemas MLST desarrollados por Guillemi *et al.* (47) constituyen una tecnología robusta, objetiva y fácilmente adaptable para analizar diversos aspectos de la diversidad genética y la estructura poblacional de parásitos del género *Babesia*. Además, debe realizarse el análisis de un mayor número de muestras, para llegar a conclusiones definitivas sobre la prevalencia o ausencia de ciertos genotipos en regiones geográficas definidas. La posible aplicación de estos marcadores puede incluir la comparación a nivel mundial de diferentes poblaciones de cepas, el diseño de vacunas de subunidades, la caracterización de líneas de hemoparásitos utilizados para la producción de vacunas vivas y las comparaciones entre las cepas provenientes de ganado y aquellas que se encuentran en animales salvajes.

Bases de datos para MLST

Existen bases de datos para cada microorganismo en el que se ha desarrollado un esquema MLST, accesibles mediante las páginas web <http://mlst.net> (50) y <http://bioinformatica.inta.gov.ar/galaxy>; esta última da acceso al pipeline denominado “Galaxy MLST-Pipeline” desarrollado por Guillemi *et al.* (19) para el caso particular de *A. marginale*, *B. bovis* y *B. bigemina*. Estos sitios funcionan como nexo común para todos los posibles participantes, puede realizarse todo el proceso de consulta y análisis, así como enviar las propias cepas para inclusión en las bases de datos con libre acceso.

El programa de gestión de la base de datos permite al usuario realizar consultas de alelos, de perfiles alélicos y de aislados específicos con el objeto de conocer su relación con otros aislados incluidos en la base. 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.

CONCLUSIONES

MLST ha jugado un papel importante en el diagnóstico y la caracterización de patógenos de interés clínico y veterinario. El control efectivo de estos depende, en gran medida, de la capacidad de realizar el diagnóstico rápido y confiable de los agentes etiológicos involucrados en los brotes infecciosos. MLST ha demostrado ser un método genotípico de alta resolución que proporciona datos fiables para realizar análisis filogenéticos de estructura y evolución de las poblaciones bacterianas; sin embargo, con la disminución en el costo de los servicios de secuenciación de genomas completos, la tendencia es hacia la comparación de las secuencias de diferentes genomas.

REFERENCIAS

1. Vazquez JA, Berron S. Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era. *Enferm Infec Micr Cl.* 2004;22(2):113-120.
2. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1998;95(6):3140-145.
3. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, Bratcher HB, Brehony C, Colles FM, *et al.* Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiol.* 2012;158(4):1005-1015.
4. Aires-de-Sousa M, Boye K, de Lencastre H, Deplano A, Enright MC, Etienne J, *et al.* High interlaboratory reproducibility of DNA sequence-based typing of bacteria in a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2006;44(2):619-621.
5. Lindstedt BA. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic

- fingerprinting of pathogenic bacteria. Electrophoresis. 2005;26(13):2567-2582.
6. Platt S, Pichon B, George R, Green J. A bioinformatics pipeline for high-throughput microbial multilocus sequence typing (MLST) analyses. Clin Microbiol Infect. 2006;12(11):1144-1146.
 7. Ibarz Pavon AB, Maiden MC. Multilocus sequence typing. Method Mol Biol. 2009;551:129-140.
 8. Maiden MC. High-throughput sequencing in the population analysis of bacterial pathogens of humans. Int J Med Microbiol. 2000;290(2):183-190.
 9. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006;60:561-588.
 10. Elberse KE, Nunes S, Sa-Leao R, van der Heide HG, Schouls LM. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis for *Streptococcus pneumoniae*: comparison with PFGE and MLST. PloS One. 2011;6(5):e19668.
 11. Vergnaud G, Pourcel C. Multiple locus variable number of tandem repeats analysis. Method Mol Biol. 2009;551:141-158.
 12. Li W, Raoult D, Fournier P-E. Bacterial strain typing in the genomic era. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(5):892-916.
 13. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. BMC Bioinformatics. 2010;11:595.
 14. Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. The natural history of *Anaplasma marginale*. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):95-107.
 15. de la Fuente J, Van Den Bussche RA, Garcia-Garcia JC, Rodriguez SD, Garcia MA, Guglielmone AA, et al. Phylogeography of New World isolates of *Anaplasma marginale* based on major surface protein sequences. Vet Microbiol. 2002;88(3):275-285.
 16. da Silva JB, Dos Santos PN, de Santana Castro GN, da Fonseca AH, Barbosa JD. Prevalence survey of selected bovine pathogens in water buffaloes in the north region of Brazil. J Parasitol Res. 2014:Article ID 603484. doi:10.1155/2014/603484
 17. Lew AE, Bock RE, Minchin CM, Masaka S. A msp1alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. Vet Microbiol. 2002;86(4):325-335.
 18. Estrada-Pena A, Naranjo V, Acevedo-Whitehouse K, Mangold AJ, Kocan KM, de la Fuente J. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. BMC Biol. 2009;7:57.
 19. Guillemi EC, Ruybal P, Lia V, Gonzalez S, Lew S, Zimmer P, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the study of *Anaplasma marginale* population structure over space and time. Infect Genet Evol. 2015;30:186-194.
 20. Ruybal P, Moretta R, Perez A, Petrih R, Zimmer P, Alcaraz E, et al. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. Vet Parasitol. 2009;162(1-2):176-180.
 21. Adakal H, Meyer DF, Carasco-Lacombe C, Pinarello V, Allegre F, Huber K, et al. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso. Infect Genet Evol. 2009;9(6):1320-1328.
 22. Vitorino L, Chelo IM, Bacellar F, Ze-Ze L. Rickettsiae phylogeny: a multigenic approach. Microbiol. 2007;153:160-168.
 23. Tamas I, Klasson L, Canback B, Naslund AK, Eriksson AS, Wernegreen JJ, et al. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. Science. 2002;296(5577):2376-9.
 24. Sonthayanon P, Peacock SJ, Chierakul W, Wuthiekanun V, Blacksell SD, Holden MT, et al. High rates of homologous

- recombination in the mite endosymbiont and opportunistic human pathogen *Orientia tsutsugamushi*. PLoS Neglect TropD. 2010;4(7):e752.
25. Huhn C, Winter C, Wolfsperger T, Wuppenhorst N, Strasek Smrdel K, Skuballa J, *et al.* Analysis of the population structure of *Anaplasma phagocytophilum* using multilocus sequence typing. PloS One. 2014;9(4):e93725.
 26. Dumler JS, Barbet AF, Bekker C, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(6):2145-2165.
 27. Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):108-122.
 28. Bakken JS, Dumler JS. Human granulocytic anaplasmosis. Infect Dis Clin N Am. 2015;29(2):341-355.
 29. Ismail N, Bloch KC, McBride JW. Human ehrlichiosis and anaplasmosis. Clin Lab Med. 2010;30(1):261-292.
 30. de la Fuente J, Estrada-Pena A, Cabezas-Cruz A, Kocan KM. *Anaplasma phagocytophilum* uses common strategies for infection of ticks and vertebrate hosts. Trends Microbiol. 2016;24(3):173-180.
 31. Rar V, Golovljova I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and "*Candidatus* Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infect Genet Evol. 2011;11(8):1842-1861.
 32. Scharf W, Schauer S, Freyburger F, Petrovec M, Schaarschmidt-Kiener D, Liebis G, *et al.* Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* *ankA* gene clusters. J Clin Microbiol. 2011;49(3):790-796.
 33. Rymaszewska A. Divergence within the marker region of the groESL operon in *Anaplasma phagocytophilum*. Eur J Clin Microbiol InfDis. 2008;27(11):1025-1036.
 34. Strašek Smrdel K, von Loewenich FD, Petrovec M, Avšič Županc T. Diversity of *ankA* and *msp4* genes of *Anaplasma phagocytophilum* in Slovenia. Ticks Tick-borne Dis. 2015;6(2):164-166.
 35. Tveten AK. Prevalence and Diversity among *Anaplasma phagocytophilum* Strains Originating from *Ixodes ricinus* Ticks from Northwest Norway. J Pathogens. 2014:824897. doi: 10.1155/2014/824897 824-897.
 36. Allsopp BA. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):123-135.
 37. Mukhebi AW, Chamboko T, O'Callaghan CJ, Peter TF, Kruska RL, Medley GF, *et al.* An assessment of the economic impact of heartwater (*Cowdria ruminantium* infection) and its control in Zimbabwe. Prev Vet Med. 1999;39(3):173-189.
 38. Allsopp MT, Louw M, Meyer EC. *Ehrlichia ruminantium*: an emerging human pathogen? Ann Acad Sci. 2005;1063:358-360.
 39. Adakal H, Stachurski F, Konkobo M, Zoungrana S, Meyer DF, Pinarello V, *et al.* Efficiency of inactivated vaccines against heartwater in Burkina Faso: impact of *Ehrlichia ruminantium* genetic diversity. Vaccine. 2010;28(29):4573-4580.
 40. Raliniaina M, Meyer DF, Pinarello V, Sheikboudou C, Emboule L, Kandassamy Y, *et al.* Mining the genetic diversity of *Ehrlichia ruminantium* using map genes family. Vet Parasitol. 2010;167(2-4):187-195.
 41. Martinez D, Vachery N, Stachurski F, Kandassamy Y, Raliniaina M, Aprelon R, *et al.* Nested PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*: use

- in genetic diversity analysis. *Ann Acad Sci*. 2004;1026:106-113.
42. Adakal H, Gavotte L, Stachurski F, Konkobo M, Henri H, Zoungrana S, *et al*. Clonal origin of emerging populations of *Ehrlichia ruminantium* in Burkina Faso. *Infect Genet Evol*. 2010;10(7):903-912.
 43. Nakao R, Magona JW, Zhou L, Jongejan F, Sugimoto C. Multi-locus sequence typing of *Ehrlichia ruminantium* strains from geographically diverse origins and collected in *Amblyomma variegatum* from Uganda. *Parasites Vector*. 2011;4:137.
 44. Almeria S, Castella J, Ferrer D, Ortuno A, Estrada-Pena A, Gutierrez JF. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet Parasitol*. 2001;99(3):249-259.
 45. Bock R, Jackson L, de Vos A, Jorgensen W. Babesiosis of cattle. *Parasitol*. 2004;129 Suppl:S247-69.
 46. Shkap V, de Vos AJ, Zweygarth E, Jongejan F. Attenuated vaccines for tropical theileriosis, babesiosis and heartwater: the continuing necessity. *Trends Parasitol*. 2007;23(9):420-426.
 47. Guillemi E, Ruybal P, Lia V, Gonzalez S, Farber M, Wilkowsky SE. Multi-locus typing scheme for *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* reveals high levels of genetic variability in strains from Northern Argentina. *Infect Genet Evol*. 2013;14:214-222.
 48. Simuunza M, Bilgic H, Karagenc T, Syakalima M, Shiels B, Tait A, *et al*. Population genetic analysis and sub-structuring in *Babesia bovis*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;177(2):106-115.
 49. Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, *et al*. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglect Trop D*. 2011;5(6):e1049.
 50. Chan MS, Maiden MC, Spratt BG. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*. 2001;17(11):1077-83.