



## BÖLÜM 29

# MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) YÖNTEMLERİ: PRENSİPLERİ, METODOLOJİ VE KULLANIM ALANLARI

Dilek GÜLDEMİR<sup>1</sup>

### Giriş

Multilocus sequence typing (MLST), esasen bir moleküler mikrobiyolojik tiplendirme yöntemidir. Yöntem; isminden de anlaşılacağı üzere mikroorganizmaları sekans tip [sequence type (ST)]'lerine göre tiplendirir, bunu yaparken de mikroorganizmaların genomu üzerinde korunmuş gen bölgelerini (housekeeping genes) kullanır. Klasik MLST yönteminde genellikle 5-7 korunmuş gen bölgesinin DNA dizilemesi yapılır, bu bölgelerin her biri için bir numara ve bütünü için bir numara elde edilir ki; bu da bize bir ST numarası verir. Tabii ki bu noktada, MLST'ye yönelik standardize veri bankaları olduğunu ve elde ettiğimiz dizileri bu şekilde numaralandırabildiğimizi, böylelikle küresel düzeyde **MLST dil birliği** bulunduğunu belirtmek gerekir.

Günümüzde, mikrobiyolojinin tüm genom çağında **yeni nesil dizileme [next-generation sequencing (NGS)]** teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte MLST yönteminin daha yüksek genetik ayırım gücü ve performansa sahip ve "**next-generation**

**sequencing MLST (NGMLST)**" başlığı altında toplayabileceğimiz "ribosomal multilocus sequence typing (rMLST)", "core genome multilocus sequence typing (cgMLST)", High-throughput MLST (HiMLST) "whole genome multilocus sequence typing (wgMLST)", "metagenomic multilocus sequence typing (MG-MLST)", "plasmid MLST" ve "nanoMLST" gibi çeşitli modifikasyonları geliştirilmiştir. Bu kitapta bunların tümü birden **MLST yöntemleri** olarak anılacaktır. Bu bölümde, MLST konusuna ilgi duyan ve yeni başlayacak olan bilim insanlarımız ve genç meslektaşlarımıza yönelik tecrübe ve literatür bilgilerinden harmanlanmış bilgilerle birlikte, özellikle klasik MLST konusunda ihtiyaç duyulabilecek bazı temel teknik detayları da incelememiz mümkün olacaktır.

### Multilocus Sequence Typing (MLST) Yöntemleri

MLST yöntemleri günümüzde oldukça yaygın bir kullanım alanı bulmuştur <sup>1,2,3,4,5,6</sup>. Bunlardan bazıları; i) toplumda yaygın olan genotipin belirlenmesi,

<sup>1</sup> Doç. Dr., Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Daire Başkanlığı, dilekg06@yahoo.com.tr

PubMLST veri tabanı, cgMLST veya wgMLST için yetkili veri tabanı olmamakla birlikte, *Escherichia* spp. için (<https://pubmlst.org/organisms/escherichia-spp/submissions>) tüm genom verilerinin sadece kaydının yapılmasına olanak tanımaktadır, ilgili şemalar için alelleri ve şema tanımlarını **Enterobase**'den senkronize etmekte ancak bunların atamasını yapamamaktadır. Başta *Enterobacteriales* üyeleri olmak üzere, *Mycobacterium* wgMLST açısından da yetkili veri tabanı Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) veri tabanıdır. Bu nedenle, alel ve profil ataması için başvuruların Enterobase üzerinden yapılması gerekmektedir. Günümüzde, Enterobase veri tabanında *Salmonella*, *Escherichia/Shigella* başta olmak üzere belli cinsler için pek çok suşa ait rMLST, cgMLST ve wgMLST verisi mevcuttur<sup>24</sup>. Bunun dışında wgMLST için **BioNumerics** (<https://www.applied-maths.com/applications/wgmlst>) veri tabanından da bahsetmek gerekir. Aslında burada hangi veri tabanı ve şemalar üzerinden çalışmak gerektiği çalışacağınız mikroorganizma ve yöntemle göre farklılık göstermektedir, bunların güncel olarak takip edilmesi uygun olacaktır.

### Metagenomic Multilocus Sequence Typing (MG-MLST) Yöntemi

Günümüzde insan mikrobiyomunun suş düzeyinde tanımlanabilmesinin önemi giderek artmaktadır. 16S rRNA geninin Sanger yöntemi ile dizilenmesi oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca çok sayıda patojenin bir arada çalışılması için yetersiz kalmakta ve genel olarak suş düzeyine kadar ayırım sağlayamamaktadır. MG-MLST, mikrobiyomdaki suş popülasyonlarının nicel analizine olanak sağlayan bir yöntem olarak geliştirilmiştir<sup>25</sup>.

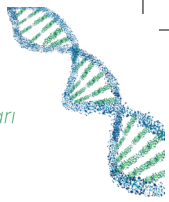
### nanoMLST Yöntemi

Klasik MLST yönteminde 5-7 "housekeeping" geninin Sanger yöntemi ile dizilenmesi işlemi, oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu nedenle çok sayıda patojenin "housekeeping" genlerinin bir arada dizilenmesine olanak sağlayan nanoMLST yöntemi geliştirilmiştir<sup>26</sup>.

Özetle; kitabın bu bölümünde topluca MLST yöntemleri olarak anılan "multilocus sequence typing" temelli yöntemler klasik ya da geleneksel MLST ve "next-generation sequencing MLST (NGMLST)" olarak iki ana başlık altında tasnif edilerek okuyucuya sunulmuştur. Klasik MLST başlığı altında Sanger dizileme yöntemi temelinde geliştirilen geleneksel MLST bulunmakta olup; bu bölümde başka yerlerde rastlanması ve bir arada bulunması pek muhtemel olmayan teknik detaylar sunulmuştur. "Next-generation sequencing MLST (NGMLST)" başlığı altında ise; "ribosomal multilocus sequence typing (rMLST)", "core genome multilocus sequence typing (cgMLST)", "whole genome multilocus sequence typing (wgMLST)", "metagenomic multilocus sequence typing (MG-MLST)" ve nanoMLST gibi yeni nesil dizileme teknolojilerine dayalı yöntemler kısaca özetlenmiştir.

### Kaynaklar

1. 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(6): 3140-5.
2. 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(3): 1008-15.
3. Feil EJ, Maiden MC, Achtman M, Spratt BG. The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol* 1999;16(11): 1496-502.
4. 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(12): 4492-8.
5. Kidgell C, Reichard U, Wain J, Linz B, Torpdahl M, Dougan G, et al. *Salmonella typhi*, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infect Genet Evol* 2002;2(1): 39-45.
6. 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(7): 2565-71.
7. Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol* 2003;11(10): 479-87.
8. Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiry A, Carniel E. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl*



- Acad Sci U S A 1999;96(24): 14043-8.
9. Bounoux ME, Morand S, d'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 2002;40(4): 1290-7.
  10. Crisóstomo MI, Westh H, Tomasz A, Chung M, Oliveira DC, de Lencastre H. The evolution of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: similarity of genetic backgrounds in historically early methicillin-susceptible and -resistant isolates and contemporary epidemic clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(17): 9865-70.
  11. Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2006; 60: 561-88.
  12. Ibarz Pavón AB, Maiden MC. Multilocus sequence typing. *Methods Mol Biol* 2009;551: 129-40.
  13. Nunney L, Elfekih S, Stouthamer R. The importance of multilocus sequence typing: cautionary tales from the bacterium *Xylella fastidiosa*. *Phytopathology* 2012;102(5): 456-60.
  14. Guldemir D, Acar S, Otgün SN, Unaldi O, Gozalan A, Ertek M, et al. Invasive Pneumococcal Diseases Study Group. High-Level Genetic Diversity among Invasive *Streptococcus pneumoniae* Isolates in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2016;69(3): 207-12.
  15. Domenech A, Ardanuy C, Grau I, Calatayud L, Pallares R, Fenoll A, et al. Evolution and genetic diversity of the Spain23F-ST81 clone causing adult invasive pneumococcal disease in Barcelona (1990-2012). *J Antimicrob Chemother* 2014;69(4): 924-31.
  16. Gozalan A, Unaldi O, Guldemir D, Aydoğan S, Kuzucu C, Cakırlar FK, et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Blood Culture Isolates from Three Hospitals in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2021;74(3): 200-8.
  17. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998;144: 3049-60.
  18. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *J Bacteriol* 2004;186(5): 1518-30.
  19. Zhou Z, Alikhan NF, Sergeant MJ, Luhmann N, Vaz C, Francisco AP, et al. GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Res* 2018;28(9): 1395-1404.
  20. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013;11(10): 728-36.
  21. 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. *Microbiology (Reading)* 2012;158(Pt 4): 1005-15.
  22. Pérez-Losada M, Arenas M, Castro-Nallar E. Microbial sequence typing in the genomic era. *Infect Genet Evol* 2018;63: 346-59.
  23. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 2018;3: 124.
  24. Achtman M, Zhou Z, Charlesworth J, Baxter L. Enterobase: hierarchical clustering of 100 000s of bacterial genomes into species/subspecies and populations. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2022;377(1861): 20210240.
  25. Bangayan NJ, Shi B, Trinh J, Barnard E, Kasimatis G, Curd E, et al. MG-MLST: Characterizing the Microbiome at the Strain Level in Metagenomic Data. *Microorganisms* 2020;8(5): 684.
  26. Liou CH, Wu HC, Liao YC, Yang Lauderdale TL, Huang IW, Chen FJ. nanoMLST: accurate multilocus sequence typing using Oxford Nanopore Technologies MinION with a dual-barcode approach to multiplex large numbers of samples. *Microb Genom* 2020;6(3): e000336.