

# ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA SECUENCIA GENÓMICA COMPLETA DE *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM PORTADORA DE CTX-M- 14

Luna, Valentina

Cátedra de Microbiología General. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas – UNL, Santa Fe, Argentina.

Director: Marchisio, Martín  
Co-directora: Chuard, Daniela

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: bioinformática, secuenciación, CTX-M-14, *Salmonella*

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias pertenecientes al género *Salmonella* son unas de las principales causas de infecciones alimentarias a nivel mundial. La mayoría de los aislamientos de *Salmonella enterica* son causantes de gastroenteritis, mientras que otras más invasivas, son capaces de provocar infecciones sistémicas. Una alternativa antibiótica muy utilizada son las Cefalosporinas de Tercera Generación (CTG) (Frère y col., 1992). Sin embargo, la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y en menor medida las de tipo AmpC plasmídica (AmpCp), son el principal mecanismo de resistencia a las CTG en enterobacterias. Además, en los últimos años, se ha observado, en este género de bacterias, sensibilidad disminuida a quinolonas y un incremento en el número de tratamientos fallidos en estos casos. Es por ello que, la Organización Mundial de la Salud recomienda la vigilancia en la resistencia a fluoroquinolonas y CTG de *S. enterica* no Typhi.

En la actualidad, se encuentran cefotaximasas pertenecientes a diferentes grupos en todo el mundo, lo que demuestra la gran velocidad con que se han expandido desde su aparición. Esto, podría reflejar la diseminación tanto de múltiples clones como de elementos génicos móviles. En consecuencia, la vigilancia epidemiológica de los mecanismos de resistencia en nuestra región, permitirá optimizar los esquemas terapéuticos empleados para estas infecciones, aplicar medidas de contención adecuadas y proponer alternativas para controlar su propagación.

En el presente trabajo, se desarrolla el análisis del genoma completo de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediante herramientas bioinformáticas. Del mismo, se obtuvo información sobre su secuencia, sobre los genes que codifican proteínas involucradas en mecanismos de resistencia a CTG y se logró identificar una relación entre diferentes genes de resistencia a CTG y elementos genéticos circundantes, los cuales determinan la posibilidad de intercambiar diferentes bloques genéticos y favorecer la diseminación de este tipo de marcadores de resistencia (Cantón y Coque, 2006; Carattoli, 2011; Woodford y col., 2011).

## OBJETIVOS

Caracterizar mediante plataformas bioinformáticas el genoma completo de un aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium portador de BLEE del tipo CTX-M-14, aislada en la provincia de Santa Fe, en el año 2014.

Para ello se propuso; (1) Obtener las secuencias nucleotídicas completas del genoma de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium portadora de CTX-M-14; (2) Llevar a cabo la

Título del proyecto: Avances en el conocimiento de las plataformas de resistencia móviles en enterobacterias y de la epidemiología molecular de *Staphylococcus aureus* de importancia clínica.

Instrumento: CAI+D/2016

Año de convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Director/a: Prof. Dra. Emilce Méndez.

anotación de las secuencias correspondientes a su genoma; (3) Evaluar la existencia de distintos mecanismos de resistencia a antibióticos como también plataformas involucradas en la diseminación de estos mecanismos; y (4) Comparar secuencias plasmídicas obtenidas con secuencias similares alojadas en bases de datos.

## METODOLOGÍA

**Secuenciación.** Se realizó la secuenciación genómica completa de un aislamiento clínico correspondiente a la especie *S. enterica* serovar Typhimurium utilizando la tecnología *Next-Generation Sequencing* (NGS) y la metodología MiSeq de Illumina (San Diego, USA). La misma fue aislada en la provincia de Santa Fe a partir de un estudio previo llevado a cabo en el laboratorio de Microbiología General de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL. La secuenciación se llevó a cabo por un servicio especializado, generando como resultado secuencias nucleotídicas crudas.

**Ensamblado y anotación.** Para realizar el ensamblado de estas secuencias se utilizó la plataforma BaseSpace® de Illumina, según las recomendaciones de Edwards y Holt (2013). La anotación de los ensamblados se llevó a cabo utilizando la plataforma *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/>).

**Determinación de mecanismos de resistencia.** Se realizó para cada ensamblado la búsqueda de secuencias codificantes de mecanismos de resistencia a antibióticos mediante la plataforma *online* Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>).

**Búsqueda y caracterización de plataformas involucradas en la transferencia de genes.** Para investigar la presencia de grupos de incompatibilidad y sistemas toxina-antitoxina (T-A) se utilizaron los *softwares* Plasmidfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) y TADB versión 2.0 (<https://bioinfo-mml.sjtu.edu.cn/TADB2/>), respectivamente. Esta última es una base de datos de loci bacterianos de T-A de tipo II que realiza la búsqueda de coincidencias en la secuencia de entrada con la herramienta WU-BLAST 2.0. La determinación de integrones, secuencias de inserción y transposones se realizó con las plataformas web ISfinder (<https://isfinder.biotoul.fr/>) y RAST. Asimismo, la utilización de la plataforma Bacterial Analysis Pipeline de GoSeqIt ApS en Illumina permitió un análisis integral de todos los elementos involucrados en la transferencia de genes, en particular, de mecanismos de resistencia.

**Comparación con secuencias en base de datos.** La comparación a nivel de secuencia entre los plásmidos obtenido y presentes en la base de datos se realizó con el servidor *online* BLAST.

## RESULTADOS

Se obtuvo la secuencia nucleotídica del genoma completo del aislamiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium portadora de CTX-M-14. La misma resultó en 8 librerías con secuencias crudas cortas de una longitud máxima de 75 pares de bases (pb) con 1,31GB de lecturas, que corresponde a 22.754.632 lecturas.

La calidad del ensamblado obtenido en la plataforma SPAdes Assembly de Illumina, se evaluó según los criterios de Narzisi y Mishra (2011), teniendo en cuenta los parámetros especificados en Tabla 1:

Tabla 1. Parámetros del ensamblado.

Parámetros	
Tamaño (pb)	5.121.450
n° de contig	140
N50	200.971
Cobertura	150,52
# N'S POR 100 Kbp	0,00

La anotación en la plataforma RAST identificó la secuencia cargada como proveniente de *Salmonella enterica*. El software reconoció automáticamente 5.319 secuencias codificantes de las cuales, aproximadamente el 24% corresponden a proteínas hipotéticas. De las secuencias codificantes identificadas solo el 37% es clasificado en subsistemas, lo cual facilita la búsqueda de genes específicos.

Utilizando la base de datos ResFinder se detectaron los genes de resistencia a antibióticos presentes en los diferentes *contigs* (Tabla 2) y mediante la plataforma PlasmidFinder se reconocieron los grupos de incompatibilidad dentro de las secuencias de entrada (Tabla 3). Un análisis complementario, en la plataforma Bacterial Analysis Pipeline de GoSeqIt ApS en Illumina, confirmó los resultados hallados en las etapas anteriores. A continuación, se detallan los resultados obtenidos:

Tabla 2. Resultados obtenidos en la búsqueda de genes de resistencia.

Gen	% de identidad	Longitud	Posición en <i>contig</i> (N° de <i>contig</i> )	Fenotipo	N° de acceso
<i>qnrB19</i>	100	645/645	921-1565 (57)	Resistencia a quinolonas	HM146784
<i>bla<sub>CTX-M-14</sub></i>	100	876/876	1114-1989 (63)	Resistencia a $\beta$ -lactámicos	AF252622

Tabla 3. Detalle de la búsqueda de grupos de incompatibilidad.

Grupo de incompatibilidad	% de identidad	Longitud	Posición en <i>contig</i> (N° de <i>contig</i> )	N° de acceso
Incl1	100	142/142	16702 a 16843 (16)	AP005147
IncFII(S)	100	262/262	29426 a 29687 (17)	CP000858
IncFIB(S)	100	643/643	46730 a 47372 (17)	FN432031

La aplicación Bacterial Analysis Pipeline realizó la búsqueda de secuenciotipos multilocus (MLST) para todas las especies que, según <http://pubmlst.org/data/>, tienen un esquema MLST. Para este caso, el aislamiento presentó el secuenciotipo ST19. Adicionalmente, realizó la búsqueda de pMLST identificando los secuenciotipos plasmídicos S1:A-B17 para IncF y ST-80 para Incl1.

En la plataforma TADB se pudo identificar por el uso de la herramienta WU-BLAST2, un sistema T-A en las posiciones 49.814 a 50.032 (antitoxina) y 50.034 a 50.336 (toxina) del *contig* 17, el cual mostró homología con secuencias plasmídicas. Estas secuencias proteicas presentaron el 100% de homología con las proteínas *CcdA* y *CcdB* presentes en la base de datos de TADB, y que corresponden al sistema T-A *ccdAB*.

A través de la plataforma ISFinder y RAST se identificaron y ubicaron secuencias de inserción y transposones. La secuencia de trabajo demostró la presencia de genes que codifican la transposasa Tn1525 asociada a secuencia de inserción IS15. En la misma región génica se presentaron secuencias correspondientes a IS903B e ISEcp1 involucradas en la movilización de genes CTX-M (Poirel y col., 2005; Bennett., 2008). Estos elementos génicos se encuentran flanqueando al gen codificante de CTX-M-14.

Por último, se realizó una búsqueda en base de datos, de secuencias con alta homología en los *contigs* portadores de los mecanismos de resistencia hallados, utilizando la plataforma BLAST. Como se observa en la Tabla 4, se obtuvieron alineamientos coincidentes con secuencias de plásmidos conocidas. Estos plásmidos fueron secuenciados de aislamientos de diversas especies bacterianas de diferentes géneros de *Enterobacterales* localizados en diferentes partes del mundo.

Tabla 4. Información de 7 secuencias plasmídicas que presentan 100% de identidad y 100% de cobertura con CTX-M-14 y las IS que la flanquean presentes en la secuencia estudiada (*contig 63*). Estas secuencias corresponden a plásmidos secuenciados presentes en la base de datos.

Organismo	Hospedador	Ubicación Geográfica	Año	Nº de acceso
<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	Bolivia	2014	LM651376.1
<i>Klebsiella michiganensis</i>	<i>Homo sapiens</i>	China	2014	CP024641.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Homo sapiens</i>	Taiwan	2014	CP030132.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Homo sapiens</i>	Estados Unidos de América	2018	CP028996.1
<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	Francia	2018	LT985224.1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar typhimurium	<i>Homo sapiens</i>	Uruguay	2019	MN241904.1
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar typhimurium	<i>Homo sapiens</i>	China	2018	MH522424.1

## CONCLUSIONES

Las secuencias crudas se ensamblaron obteniendo buenos valores en los parámetros de calidad. Sin embargo, no fue posible la obtención de secuencias de plásmidos completos.

El aislamiento se caracterizó como *Salmonella enterica* no typhi y se identificó con el secuenciotipo ST19.

El análisis de secuencia demostró que el gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se encuentra alojado en un plásmido, y está flanqueado por IS de la familia 5 de secuencias de inserción, lo que demuestra su capacidad de movilización y diseminación.

Se detectó el gen *qnrB19* en una secuencia plasmídica incompleta, y en este caso no se encontraron elementos responsables de su diseminación.

Los grupos de incompatibilidad, los sistemas T-A y los elementos de transferencia y conjugación de plásmidos detectados no se pudieron relacionar con los marcadores de resistencia encontrados.

La secuencia que contiene al gen *bla*<sub>CTX-M-14</sub> se ha encontrado en varios plásmidos con diferentes características y en diversas locaciones geográficas. Cabe destacar que la secuencia de inserción que flanquea al gen también aparece en estos plásmidos, lo que permite suponer que es la responsable de la propagación de este marcador de resistencia.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Bansal A.**, 2005. Bioinformatics in microbial biotechnology- a mini review. *Microbial Cell Factories*. 4:19.

**Bennett P.**, 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*: 153: S347–S357.

**Cantón R., Coque T.**, 2006. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 466–475.

**Carattoli A., Villa L., Poirel L., Bonnin R., Nordmann P.**, 2011. Evolution of IncA/C *bla*<sub>COMY-2</sub> Carrying Plasmids by Acquisition of the *bla*<sub>NDM-1</sub> Carbapenemase Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 56(2): 783–786

**Edwards D., Hold K.**, 2013. Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. *Microb Inform Exp*. 3(1):2.

**Frère J., Nguyen-Distéche M., Coyette J.**, 1992. *The Chemistry of  $\beta$ -lactams* Ed. Page, MI.148197p

**Narzisi G, Mishra B.** 2011. Comparing De Novo Genome Assembly: The Long and Short of It. *PLOS ONE* 6(4): e19175.

**Poirel L., Lartigue, M., Decusser J., Nordmann P.**, 2005. *ISEcp1B*-Mediated Transposition of *bla*<sub>CTX-M</sub> in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49 (1): 447–450.

**Woodford N., Turton J., Livermore D.**, 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*. 35:736–755.