

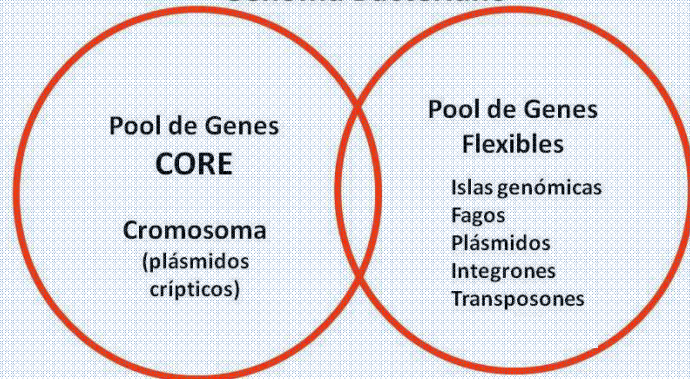


**Departamento de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.**

El papel de la Genómica en el Diagnóstico y Control de Brotes

Dra Mariana Catalano

Genoma Bacteriano



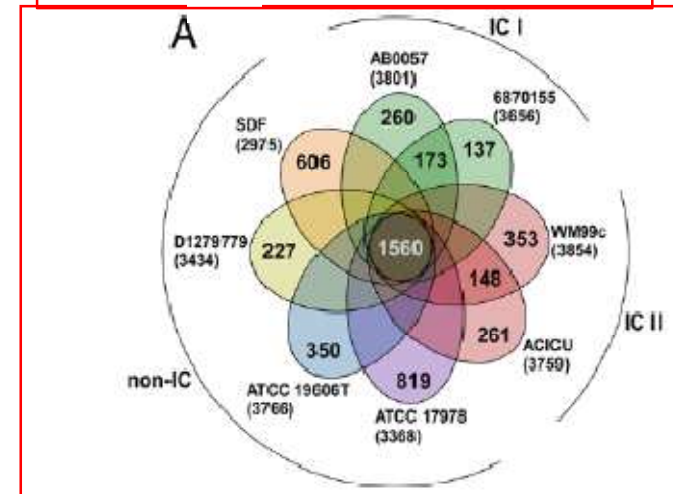
Genes que poseen un rol esencial en funcionamiento de la célula bacteriana.

- Replicación de ADN.
- Traducción.
- Ribosomas.
- Envoltura celular.
- Vías metabólicas primarias etc.

Genes que confieren funciones adicionales no esenciales para el desarrollo bacteriano pero dan ventaja en condiciones particulares.

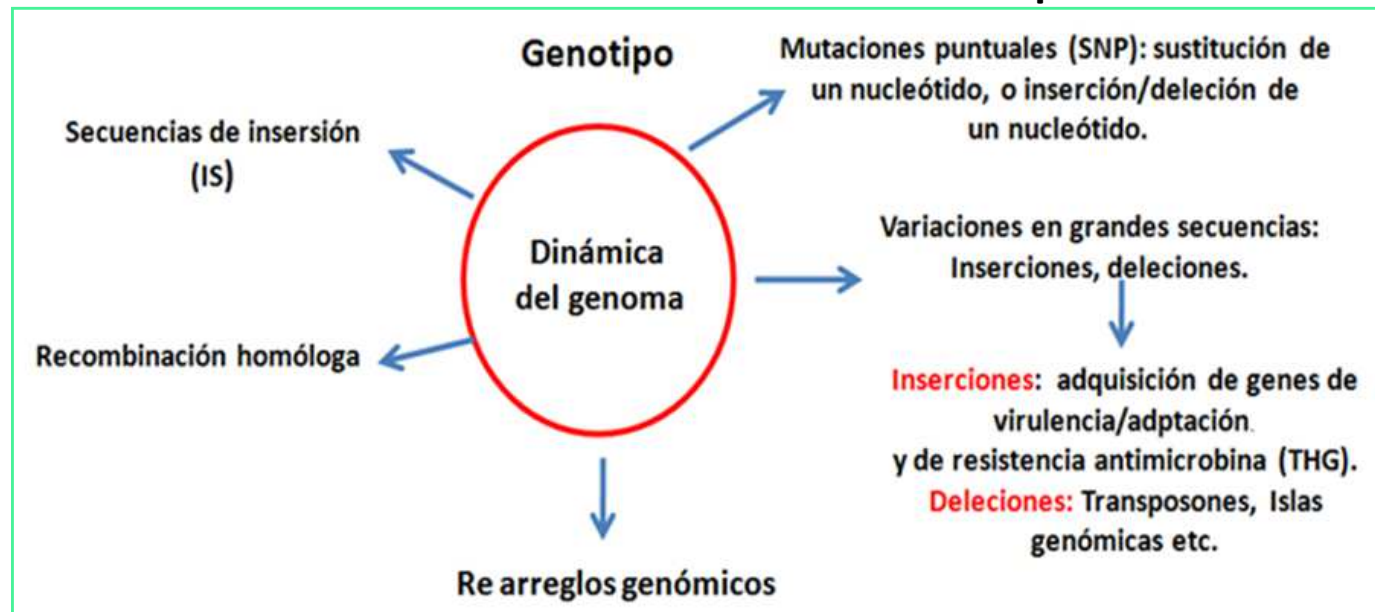
- Patogenicidad.
- Resistencia antimicrobiana.
- Sistemas de Secreción.
- Vías metabólicas secundarias etc.

1898 genes compartidos con todos los genomas



Acinetobacter baumannii

¿Cómo evoluciona cada individuo de una especie?



Métodos Moleculares Clásicos

Métodos dirigidos a evaluar la evolución a largo plazo (evolución neutra).

MLST: Multilocus Sequencing Typing.

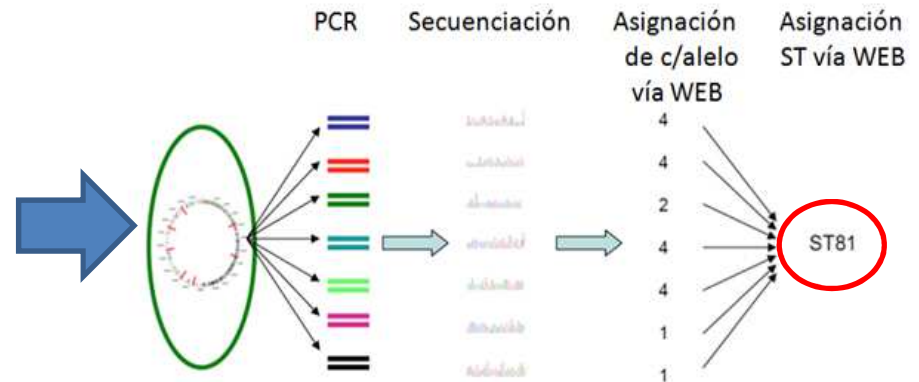
Análisis de fragmentos de 400- 450pb de 7 genes “housekeeping” o esenciales. Cada aislamiento es definido por una combinación particular de alelos.



Perfil Alélico o **Secuenciotipo, ST.**



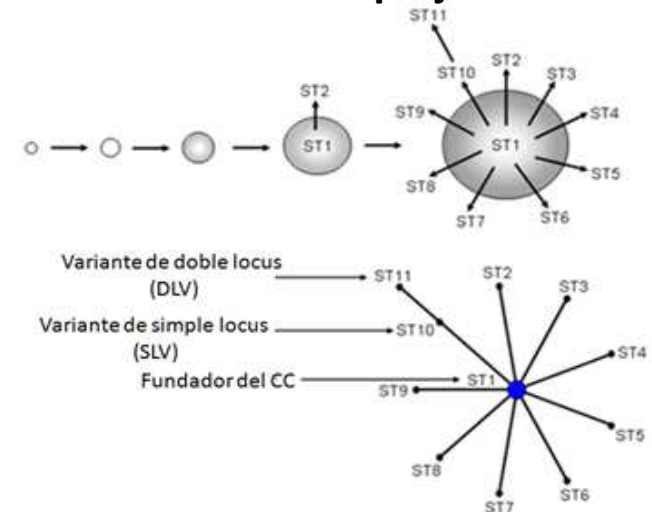
Modelos de evolución bacteriana simples, análisis por el programa eBURST (<http://eburst.mlst.net>) (Feil et al., 2004) infieren las relaciones evolutivas entre los ST. El análisis clasifica a los ST en grupos evolutivamente relacionados que reciben el nombre de **Complejos Clonales (CC)**.



<https://pubmlst.org/databases/>
<http://bigsddb.pasteur.fr/>



Complejo Clonal



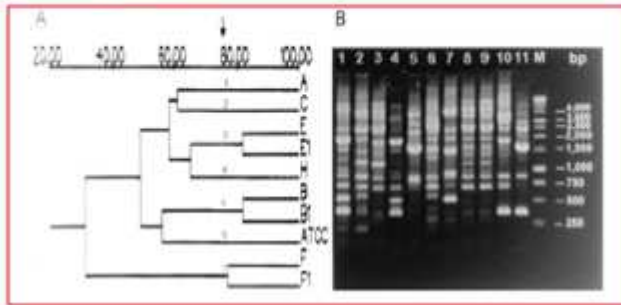
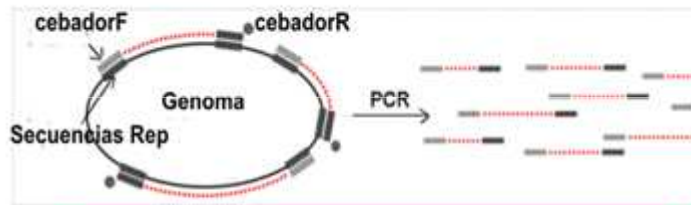
Métodos Moleculares Clásicos

Métodos dirigidos a evaluar la evolución a corto plazo.

Generalmente, Comparación de Patrones de Bandas.

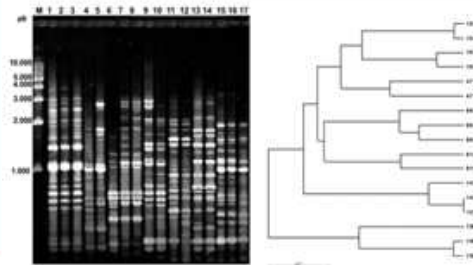
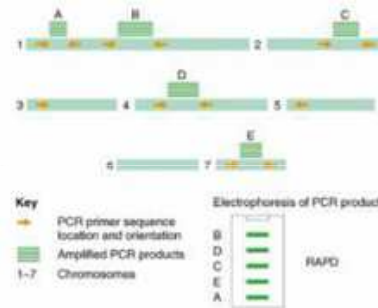
Rep-PCR

Repetitive
sequences -based
PCR



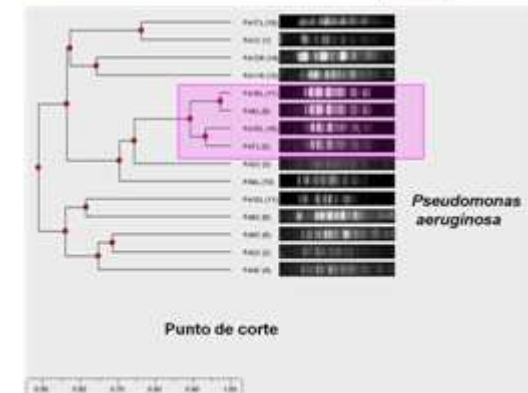
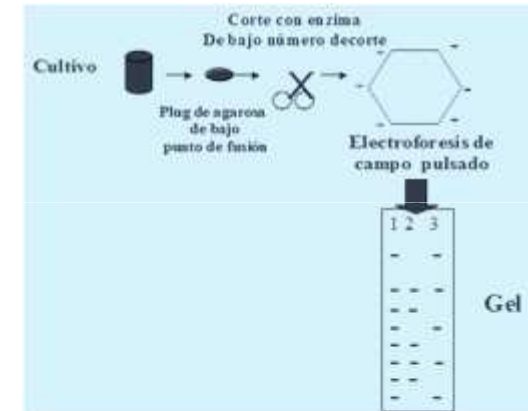
RAPD-PCR

Random Amplified
Polymorphic DNA-
PCR



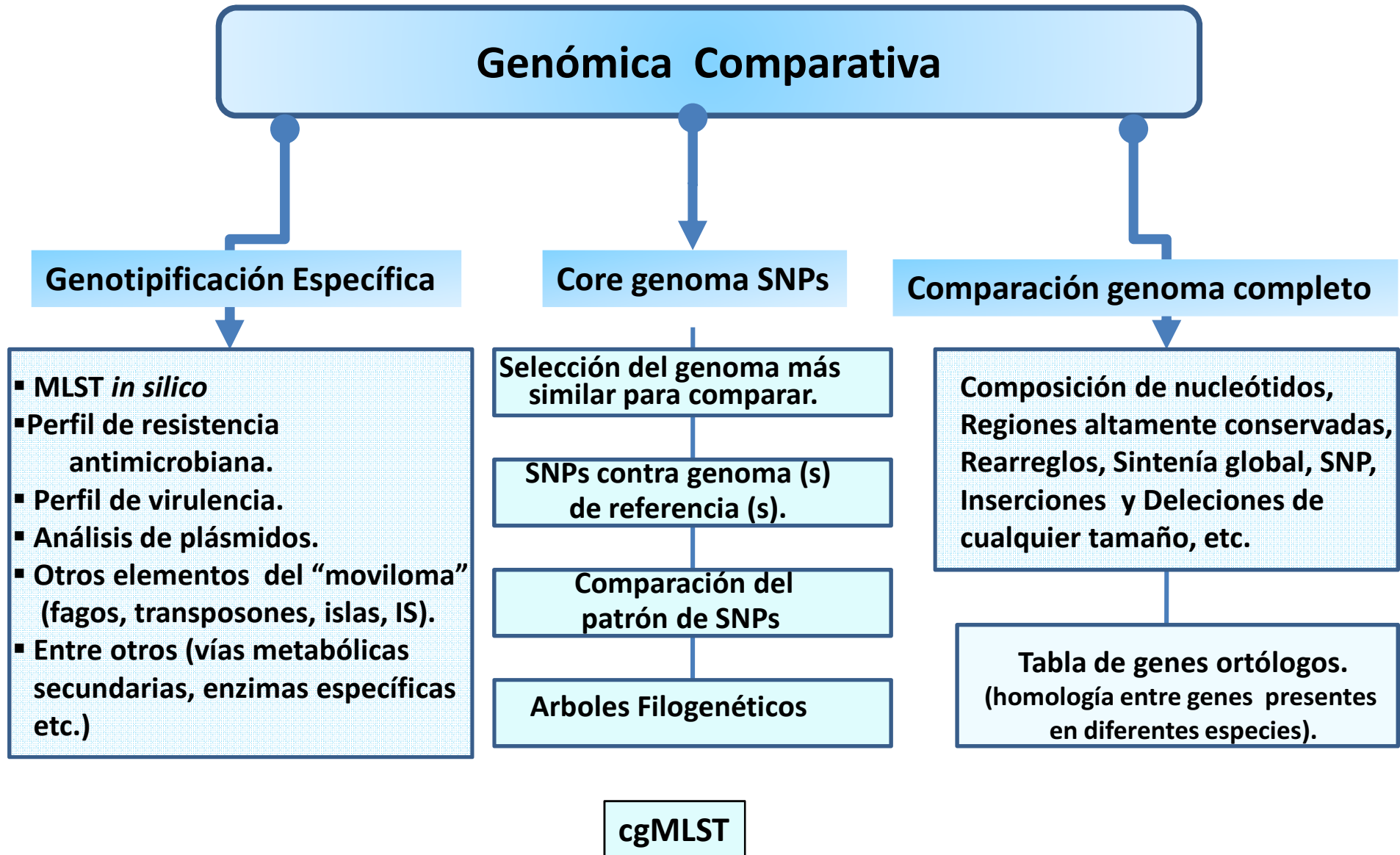
PFGE

Pulsed-field Gel
Electrophoresis



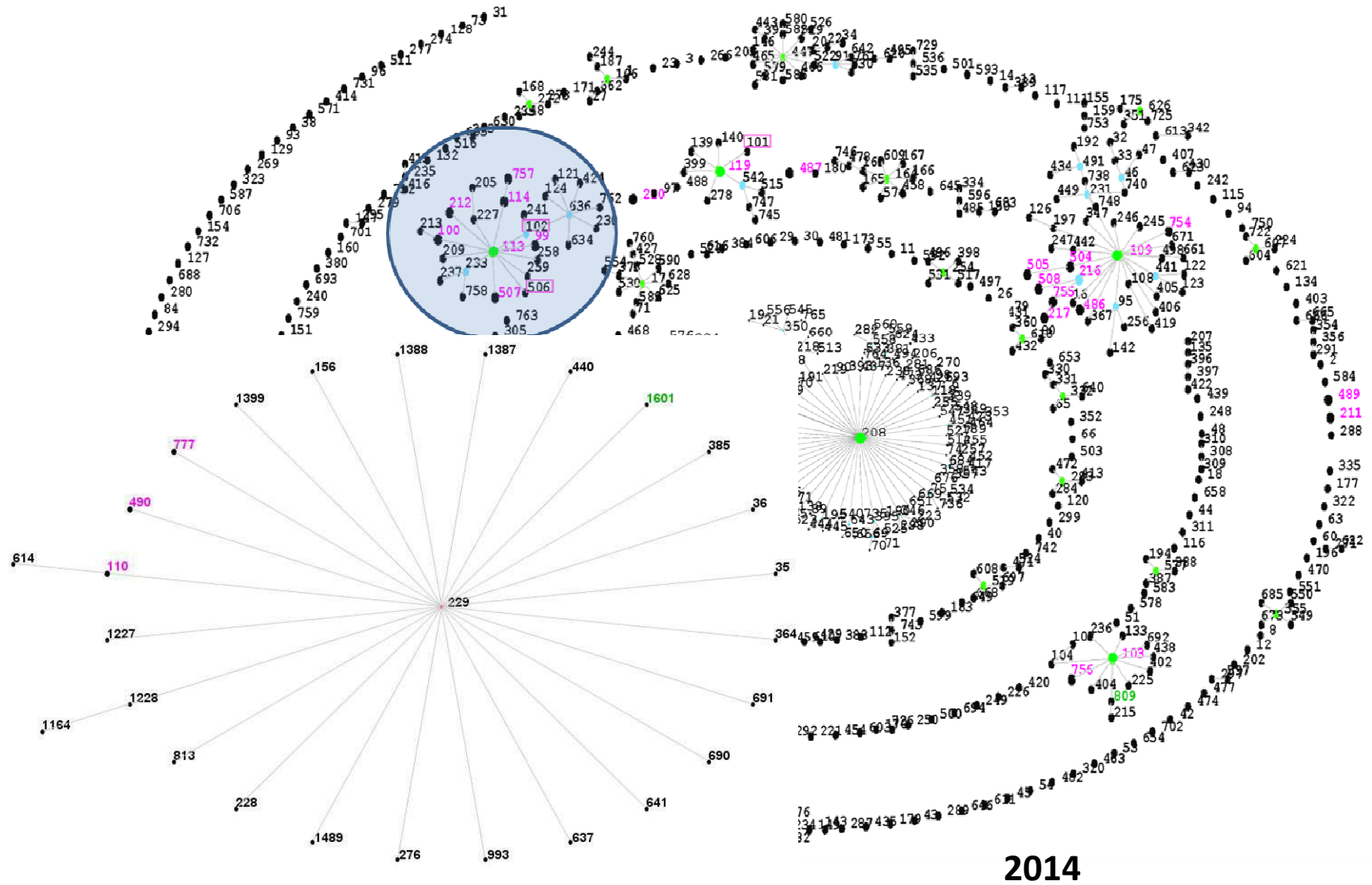
Se observan cambios evolutivos en el **genoma** pero se desconoce el evento que lo origina.

Secuenciación de genomas



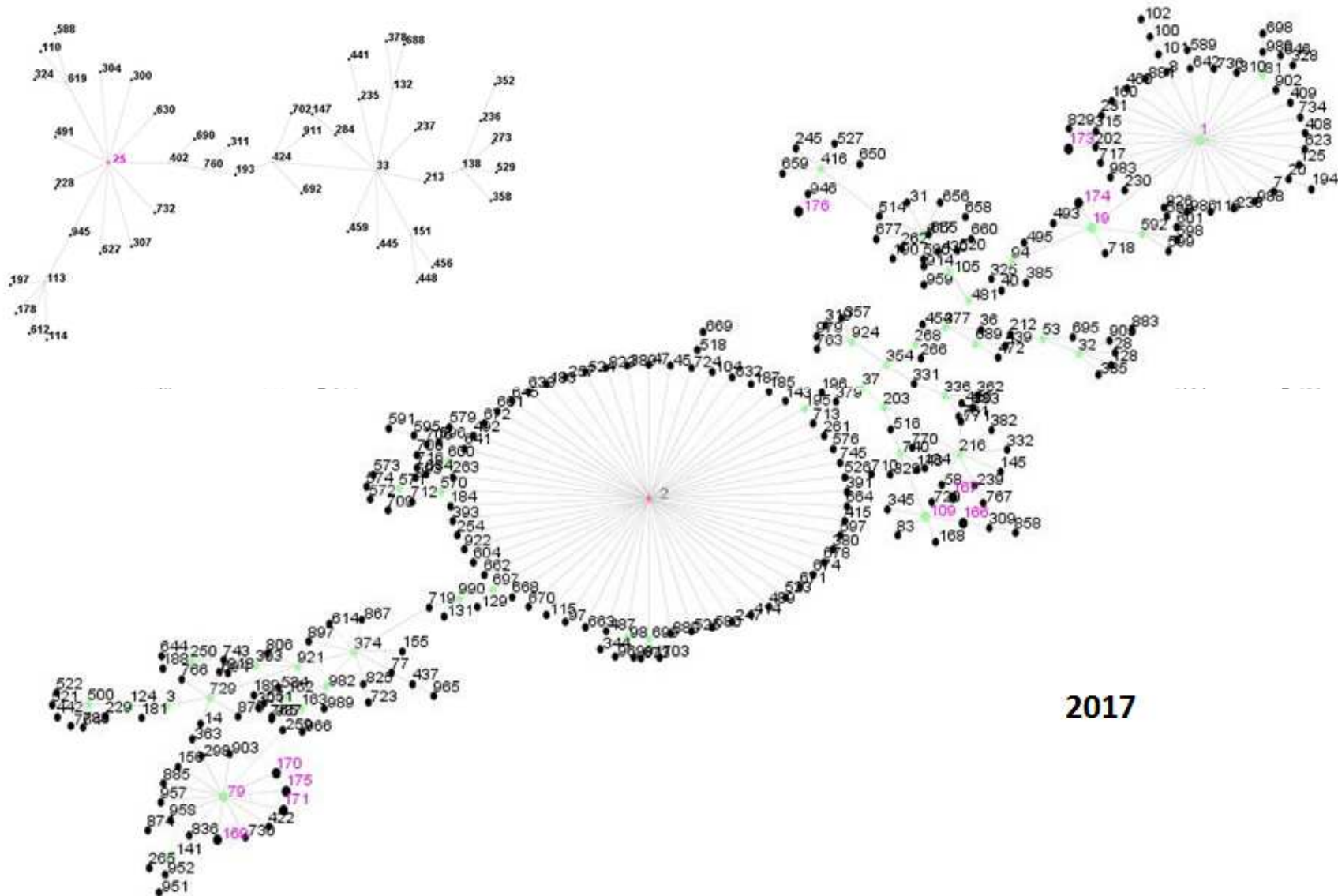
Acinetobacter baumannii 1983-2012

MLST: OXFORD (Bartual et al)

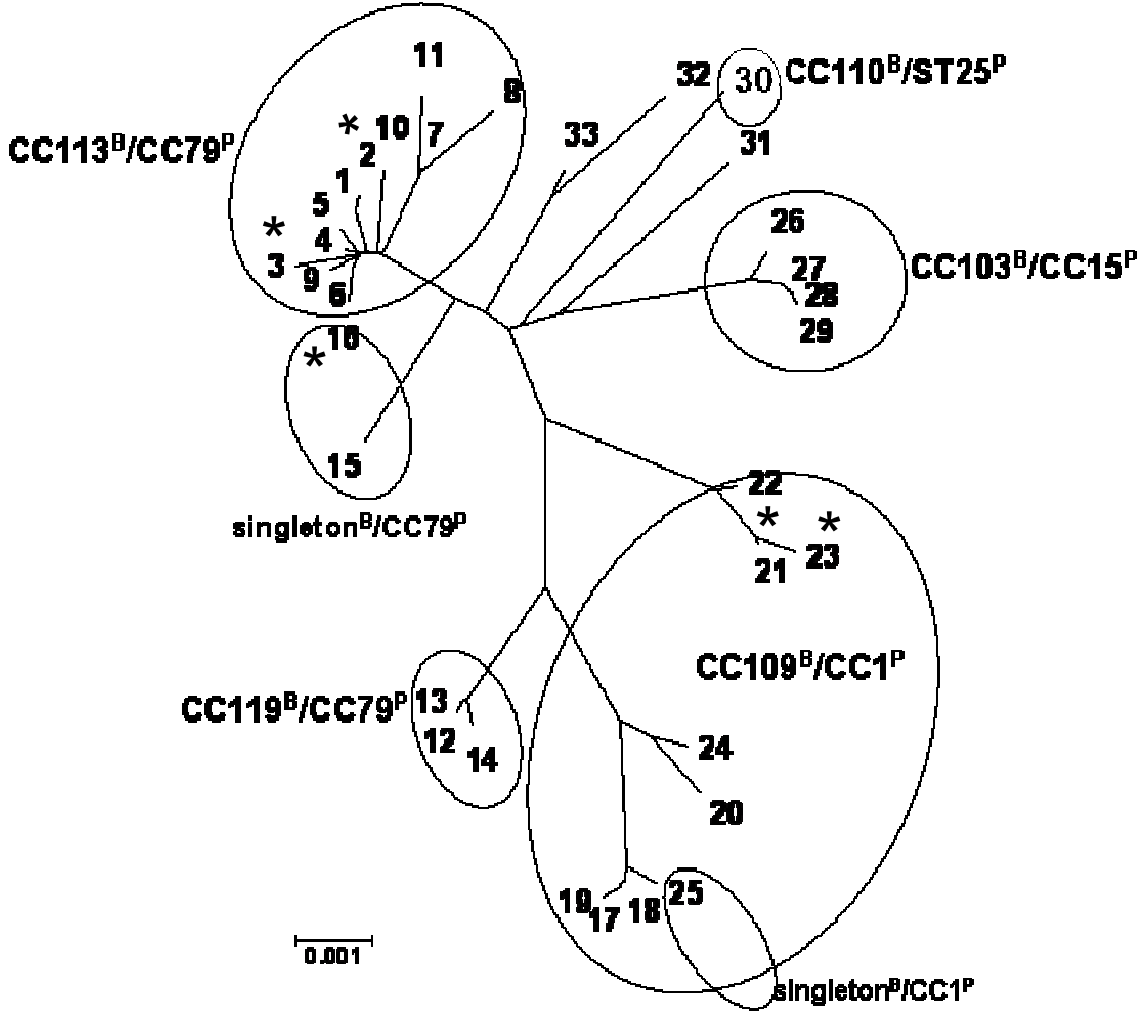


Acinetobacter baumannii 1983-2012

MLST: PASTEUR

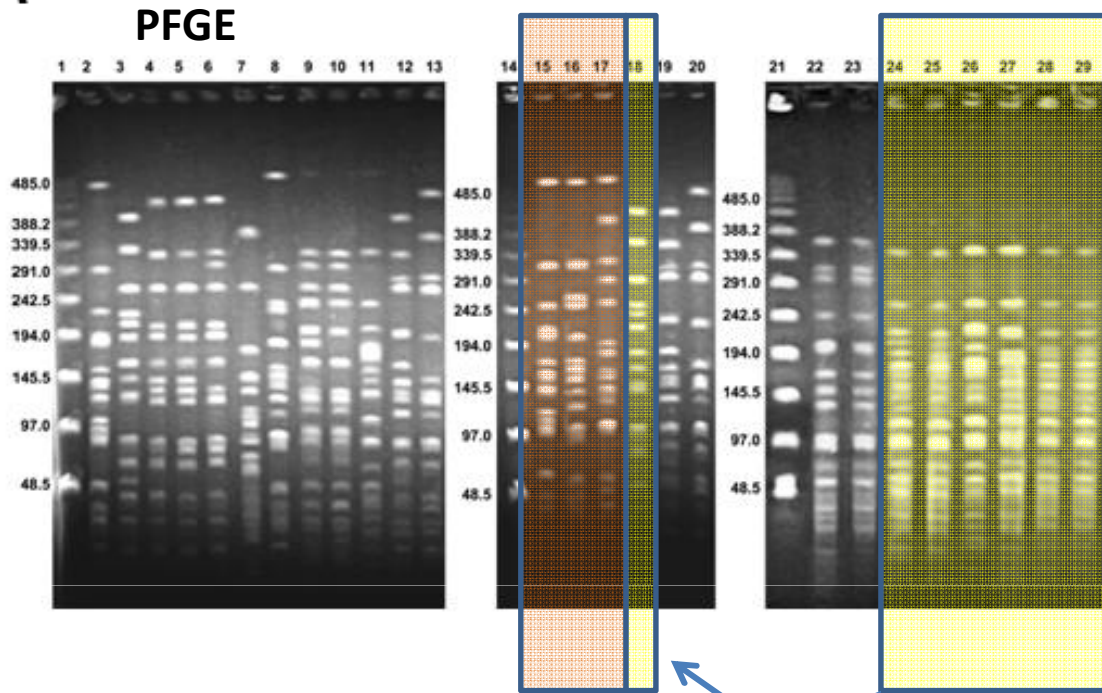


MLST: Secuencias concadenadas.
Filogenia: Neighbour-joining analysis.



***Acinetobacter baumannii* 1983-2012**

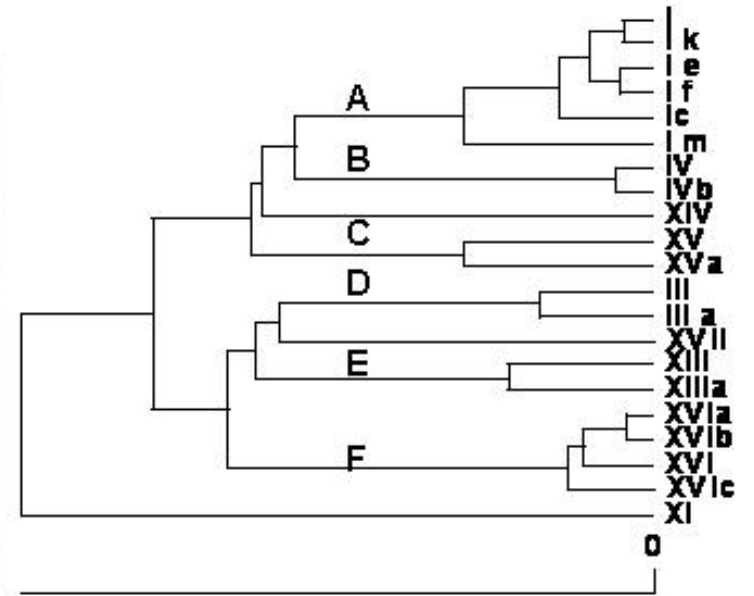
A

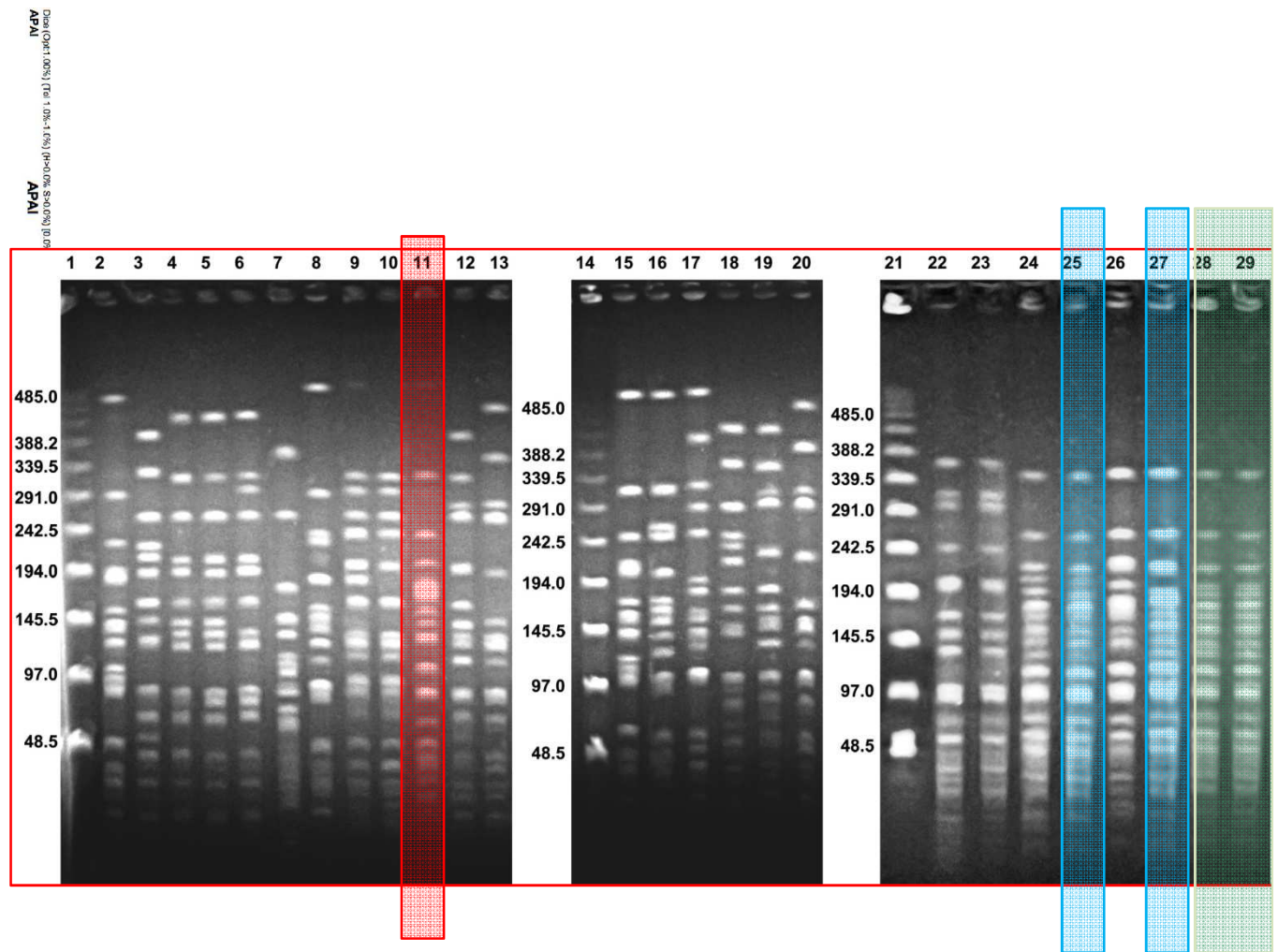
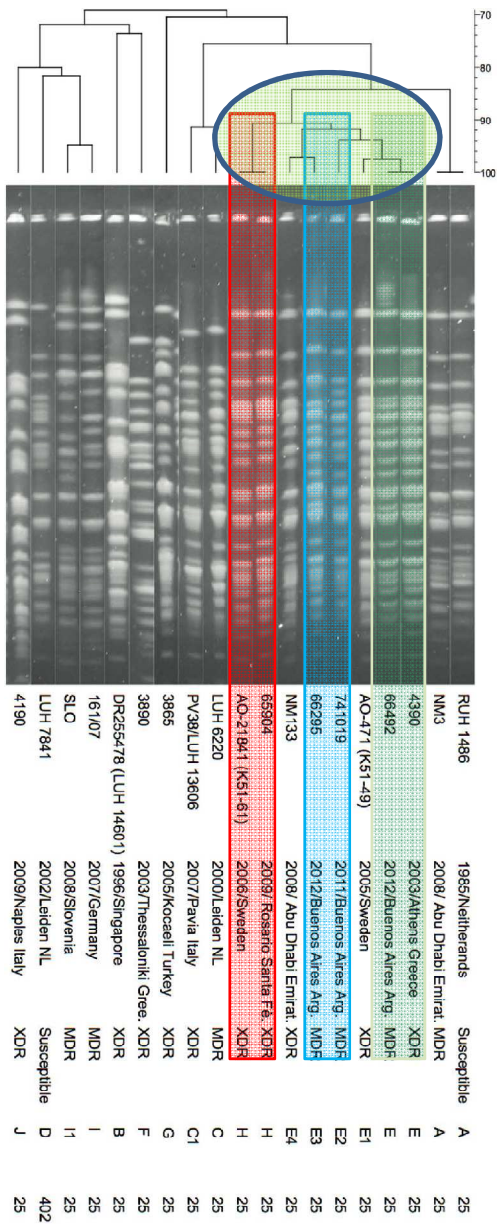


**Pulsotipo I
CC113/79**

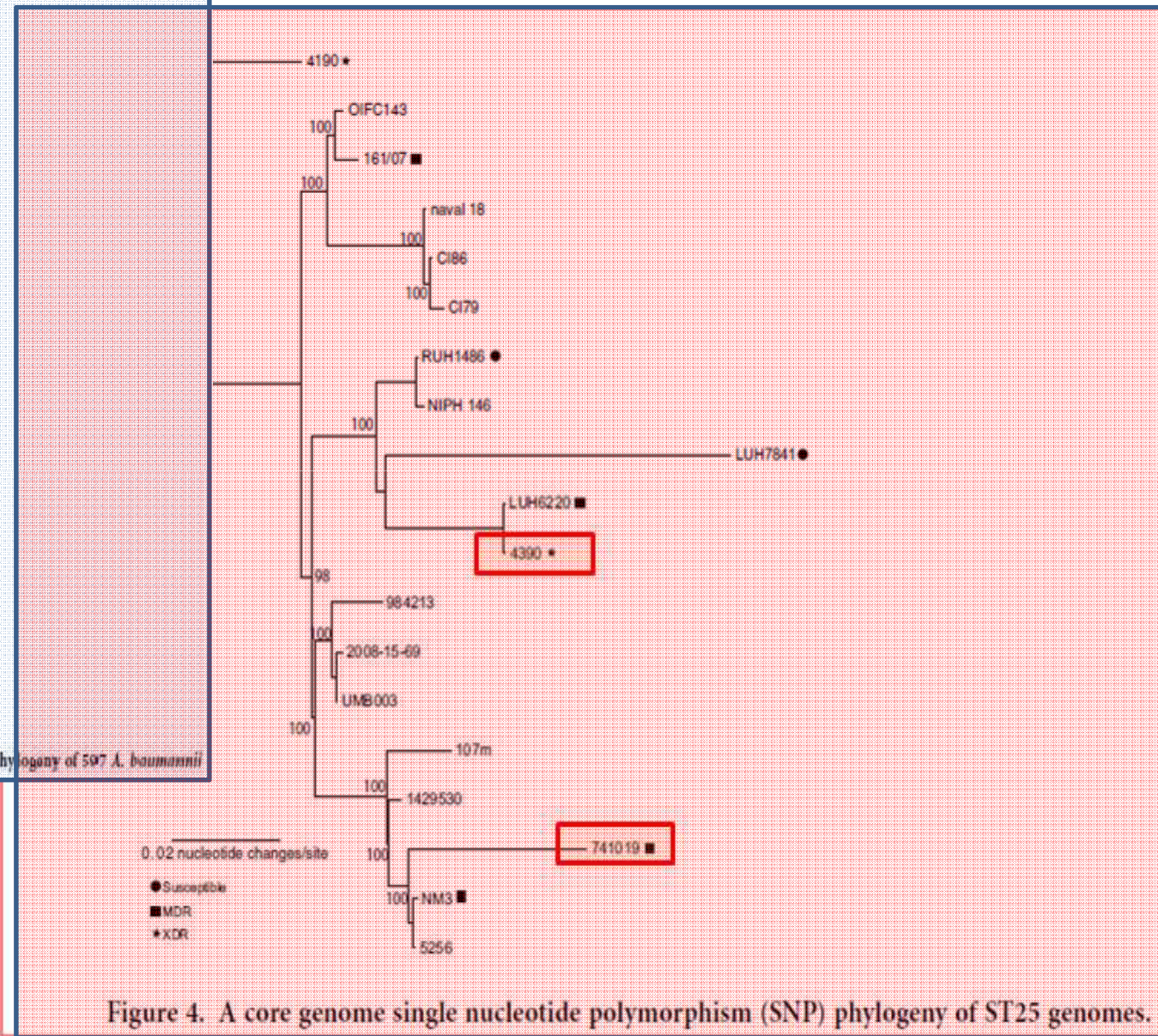
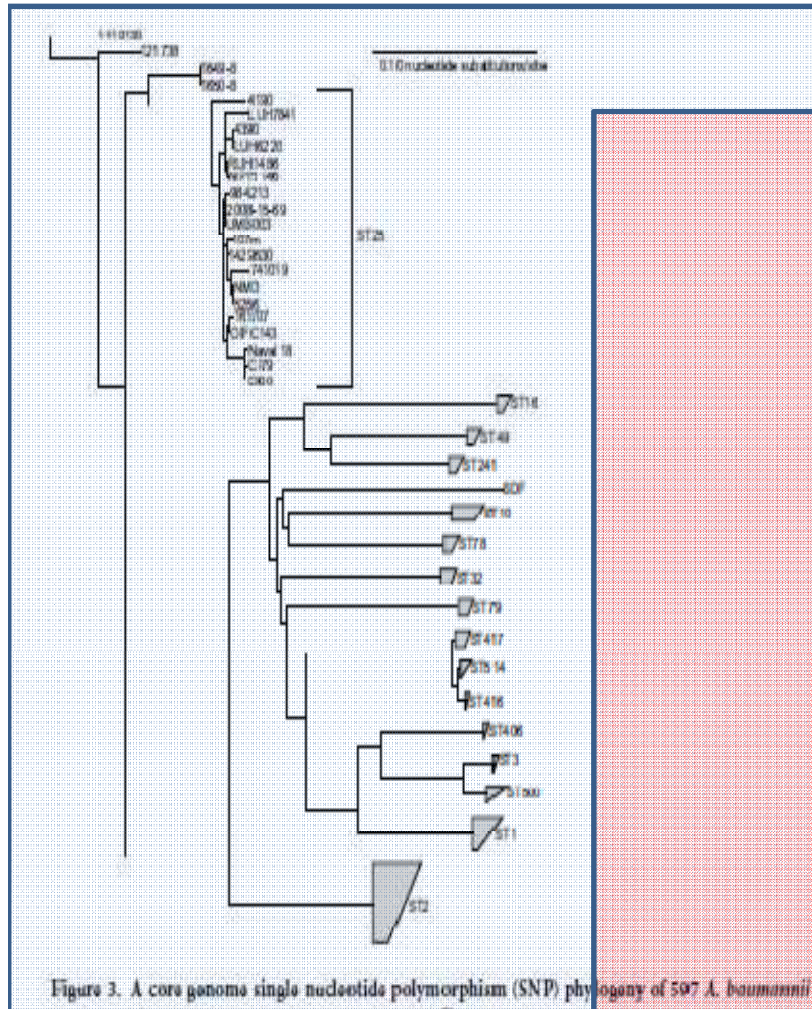
**Pulsotipos XVI
CC110/25
Actualmente 229/25**

B

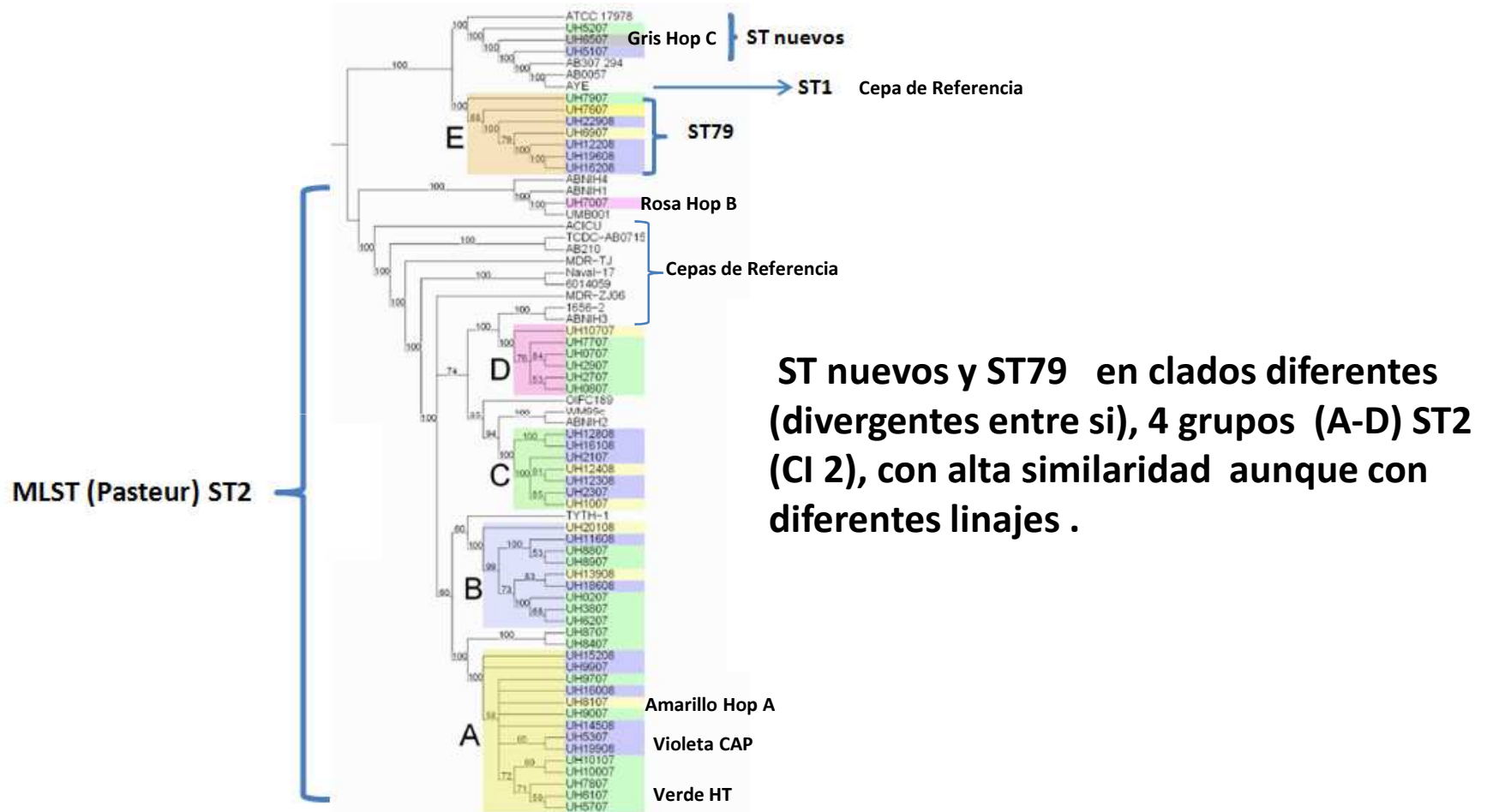




A. baumannii ST25 (Pasteurs)



Diseminación y diversidad de aislamientos de *A. baumannii* 2007-2008 en un hospital terciario (HT), sus hospitales comunitarios afiliados y un centro de atención prolongada (CAP).



Wright et al, MBio. 2014, 5(1):e00963-13.
doi: 10.1128/mBio.00963-13

Fig 1. Core SNP phylogenetic tree topology showing the relationships among all of the isolates.

Diversidad en las cepas de *A. baumannii* 2007-2008 en un hospital terciario, sus hospitales comunitarios afiliados y una clínica de larga estancia

Evidencias de transmisión intra hospital : Clado o grupo D, 5/6 aislamientos originados en el mismo periodo de tiempo de un ancestro común mostraron un contenido de genes indistinguibles.

Journal of Clinical Microbiology, 2014, 5(1):e00963-13.
doi:10.1128/JCM.00963-13

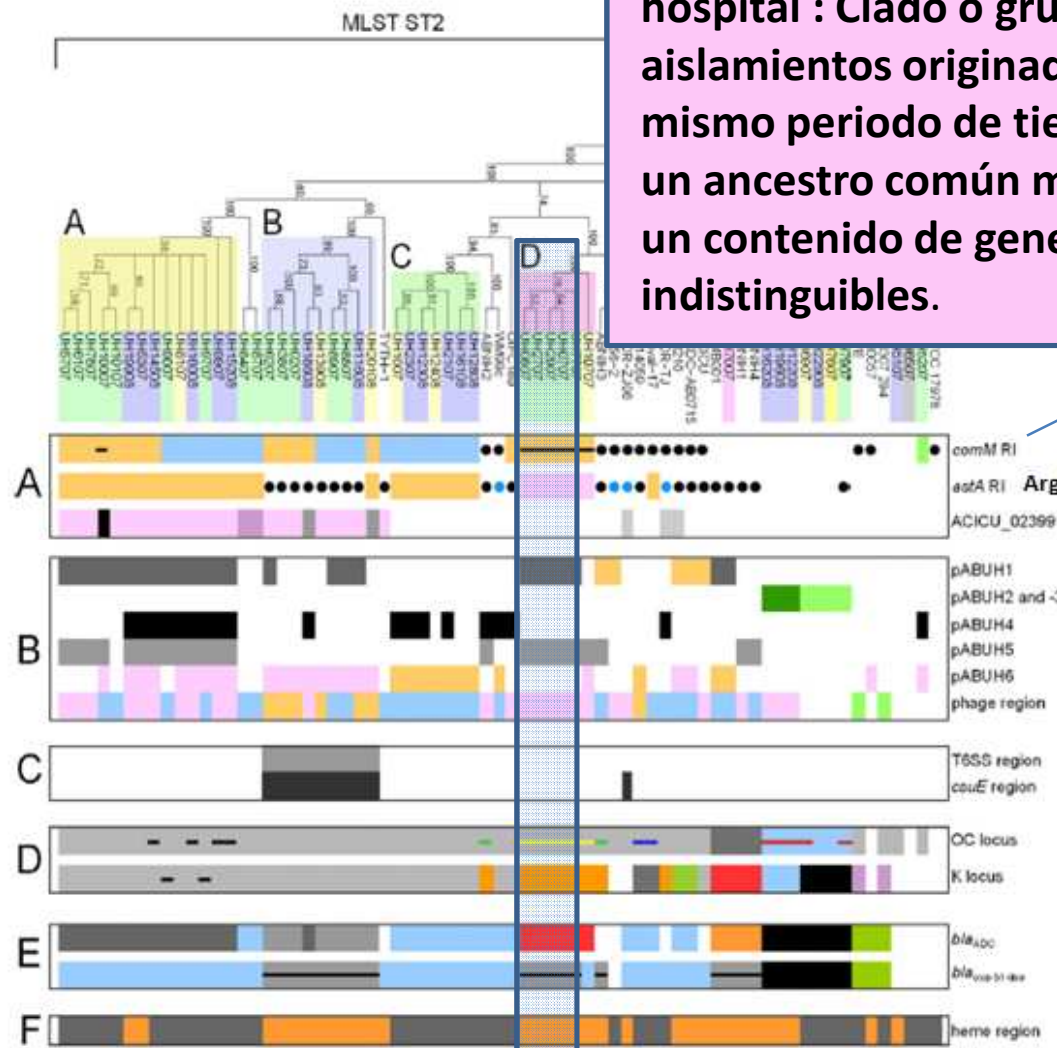
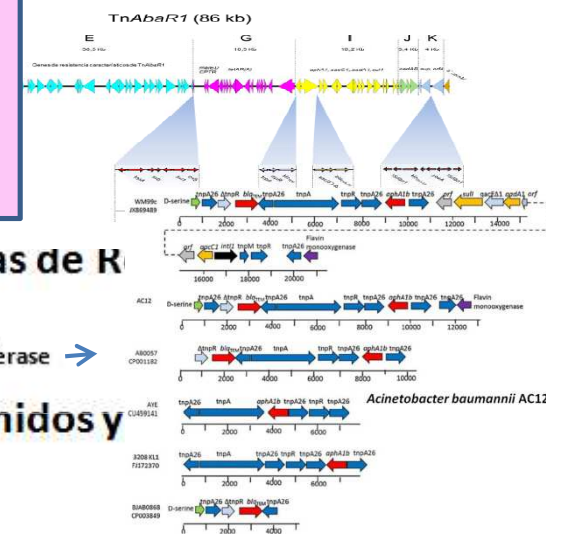


FIG 2 Genome features.

Región *csu* codifica la fimbria tipo I, TS6SS sistema de secreción tipo 6, Locus K síntesis y ensamblado del antígeno O, OC síntesis y ensamblado de los azúcares del core externo del LPS, *bla* ABC cefalosporina, *bla*_{OXA51like} solo se expresa cuando la IS*Aba* 1 río arriba. Fe(II)-Hemo es capturado y metabolizado proveyendo una alternativa fuente de hierro.



RI (Islands of Resistance)

Plásmidos y

Factores de Virulencia

β-Lactamasas Cromosomales

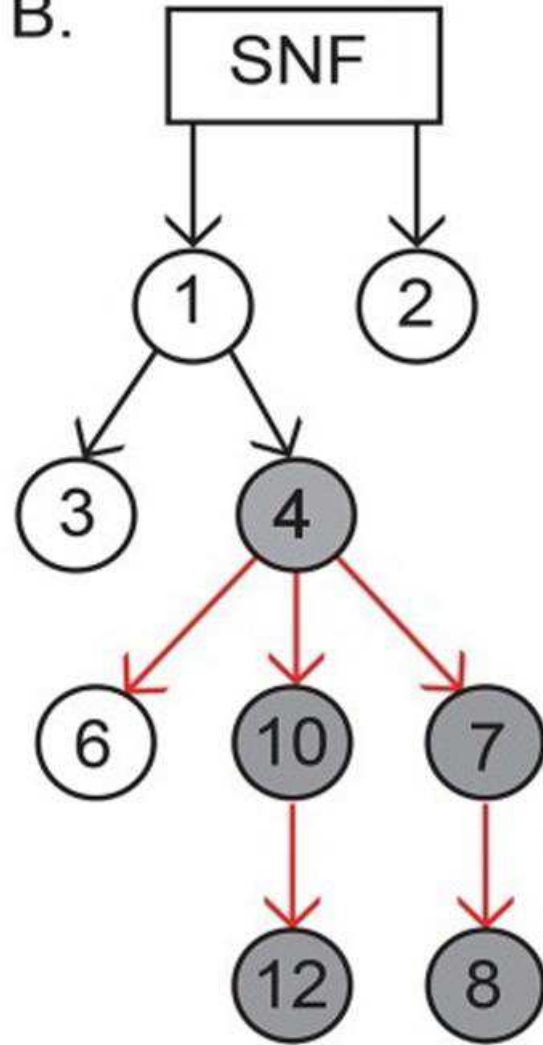
Conclusiones:

La dinámica de la población de *A. baumannii* sugiere cepas endémicas que interactúan entre sí y con un influjo periódico de cepas novedosas que aportan potencialmente nuevo material genético.

Sumado a la variabilidad en los determinantes de resistencia, otras regiones muestran cambios genéticos que pueden evolucionar en corto tiempo que apuntarían a otros aspectos fisiológicos de *A. baumannii* que pueden contribuir a su éxito como patógeno nosocomial.

Polimorfismo de SNP Genoma core de *A. baumannii* (cgMLST)

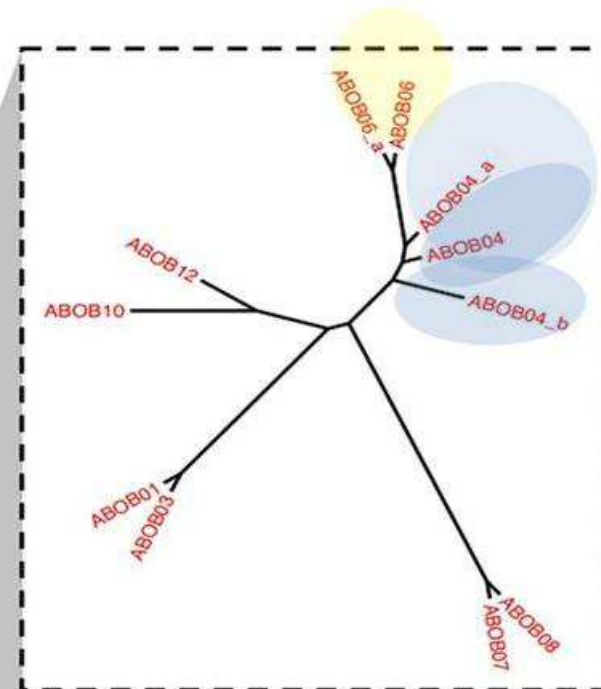
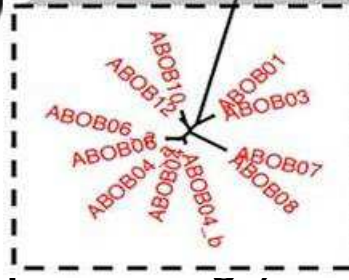
B.



BEAST software
<https://github.com/CompEvol/beast2>

Múltiples variantes en un mismo huésped ("nube de diversidad"). P4: un paciente puede diseminar diferentes cepas.

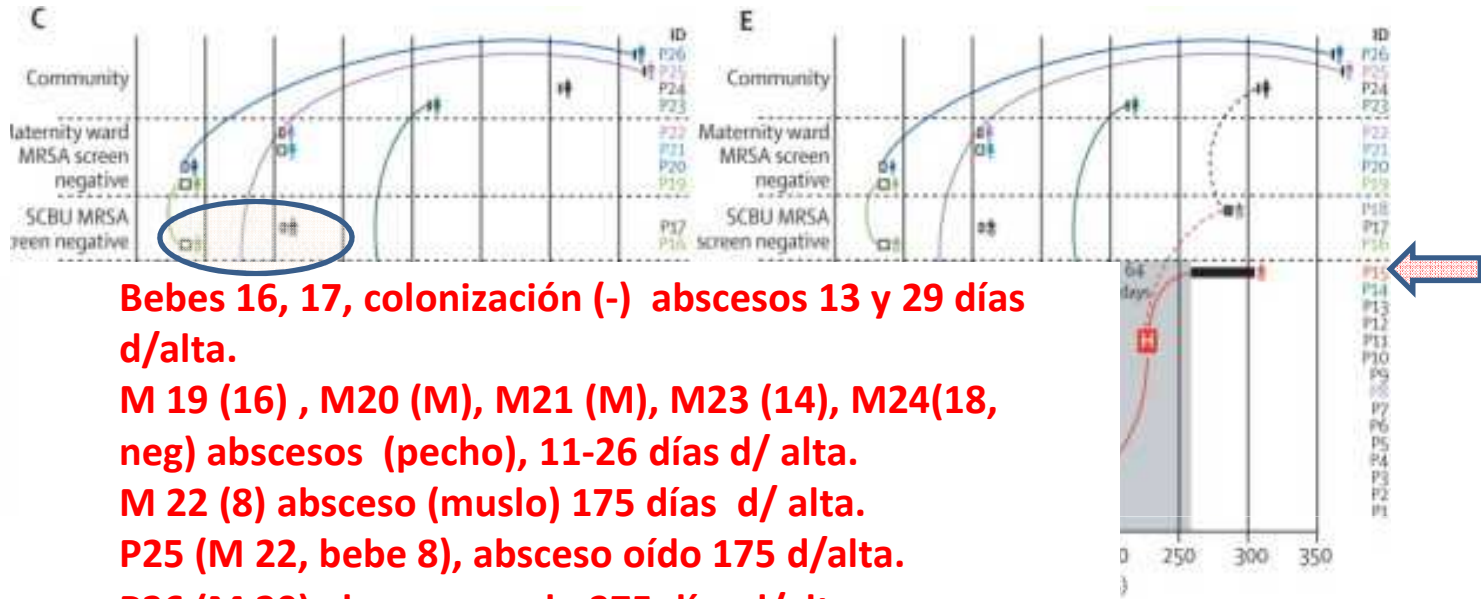
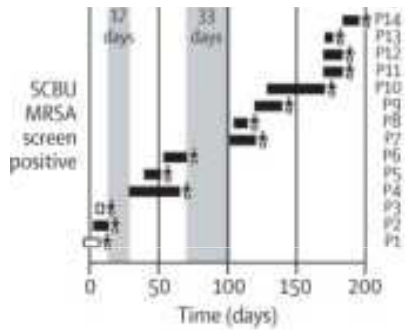
P6: una cepa puede evolucionar mientras coloniza un paciente.



Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study

Outbreak of MRSA en sala de neonatología (SCBU), ST2371. Período 6 meses, 2011.

Bebes 1, 2, 4 y 11 desarrollaron pústulas superficiales (internación)



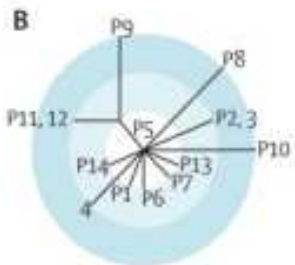
Bebes 16, 17, colonización (-) abscesos 13 y 29 días d/alta.

M 19 (16) , M20 (M), M21 (M), M23 (14), M24(18, neg) abscesos (pecho), 11-26 días d/ alta.

M 22 (8) absceso (muslo) 175 días d/ alta.

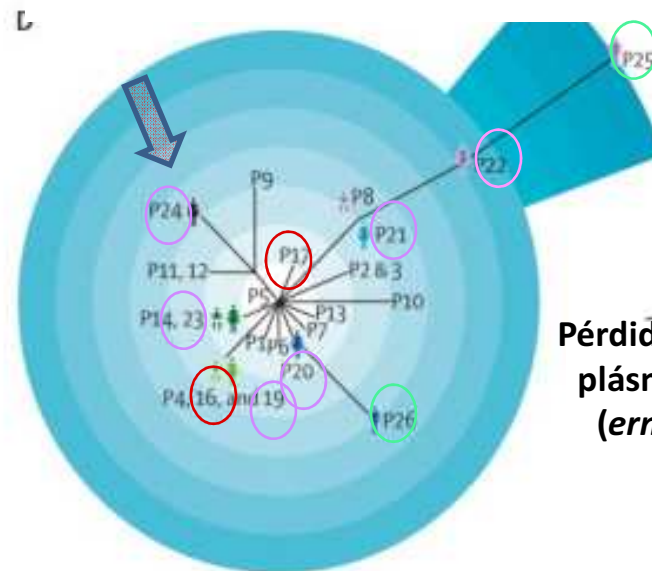
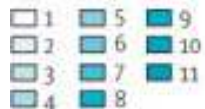
P25 (M 22, bebe 8), absceso oído 175 d/alta.

P26 (M 20) absceso muslo 375 días d/alta.

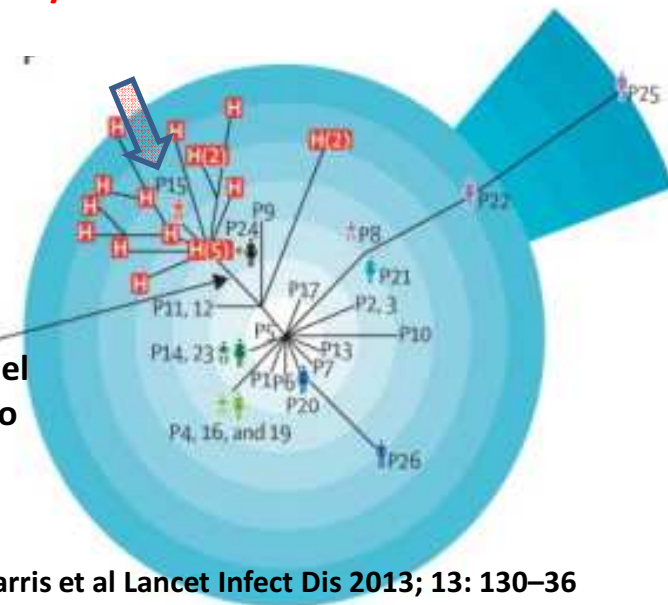


SNP genome core (1861 genes)

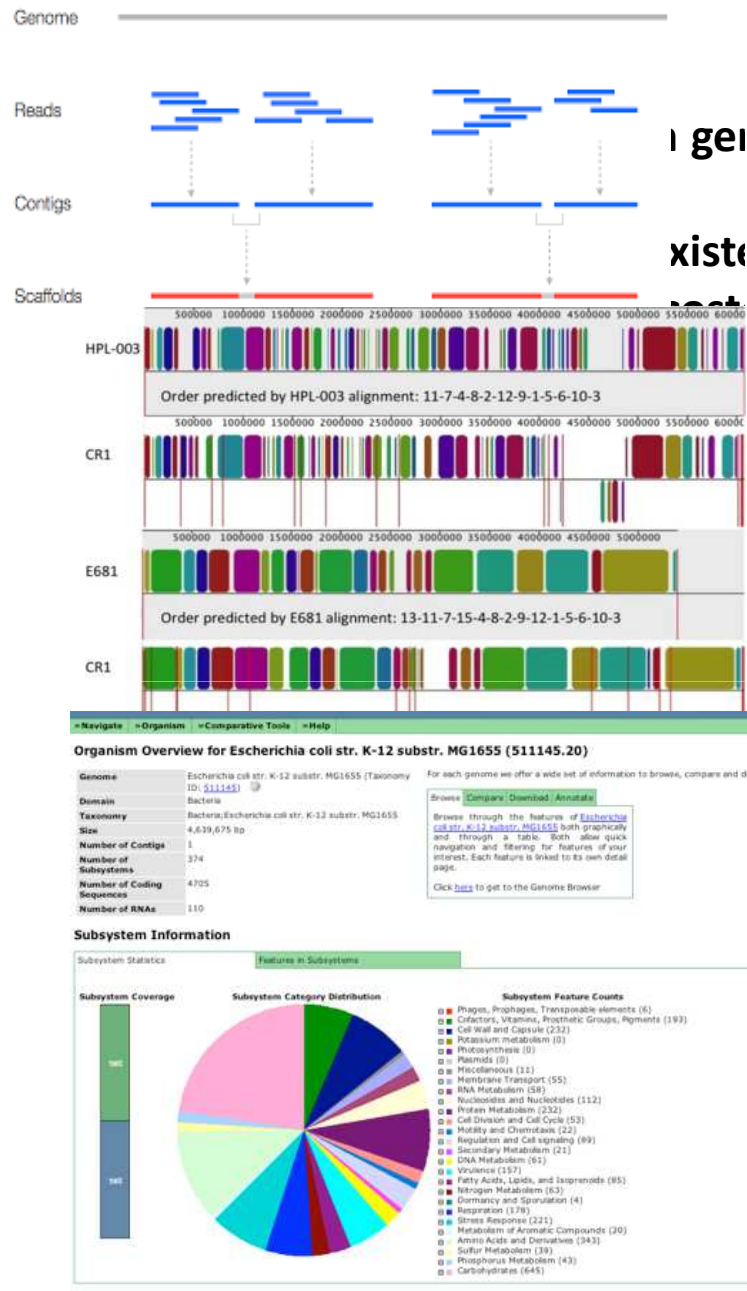
SNPs from root*



Pérdida del plásmido (ermC)



Programas de Bioinformática



Ensamblado (contigs o scaffolds): Velvet y SPADES.

Calidad del ensamblado: QUASt.

Orden y orientación de los contigs: Mauve Contig Mover

Anotación de los contigs: servidor RAST y luego cura manual.

Genes ortólogos: genes ortólogos genes ortólogos: OrthoMCL.

Transferencia horizontal de genes: BLASTp.

Filogenia de los genes involucrados en el intercambio genético: JModelTest2 y PhyML.

Replicasas plasmídicas propias de cada especie: BLAST

Identificación de IS: ISFinder.

Identificación de profagos y secuencias fágicos: PHAST.

Predicción de genes de resistencia antibiótica: base de datos ARG-ANNOT y Genbank.

Rearreglos genómicos, identificación de SNP: alineamiento progresivo con genomas completos disponibles en la base de datos GenBank mediante MAUVE (proceso de filtrado, SNP no recombinantes para general la filogenia del core).

Construcción del árbol filogenético: RAxML.

Pangenoma: program PanOCT.

Matrix de distancias: árboles filogenéticos: FASTME.

MUCHAS GRACIASiiiiiiii