AMPLIFICACIÓN GÉNICA DE *bla*$_{NDM-1}$ EN *Acinetobacter bereziniae* BAJO PRESIÓN DE SELECCIÓN POR CARBAPENEMES

XX Jornadas de Ciencias, Tecnologías e Innovación

BICHARA, Facundo - MORALES FLORES, Ailén - MARCHIARO, Patricia – MORÁN-BARRIO, Jorgelina
Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario (IBR-CONICET), Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (UNR)
Rosario, Santa Fe, Argentina
moran@ibr-conicet.gov.ar

Palabras clave: *Acinetobacter*, resistencia a carbapenemes, NDM-1, amplificación génica, plásmido

INTRODUCCIÓN

Acinetobacter es un género de bacterias Gram-negativas comúnmente encontradas en la naturaleza. Algunas especies, como *A. baumannii* (Ab), son patógenos humanos oportunistas, frecuentemente aislados de infecciones nosocomiales exibiendo resistencia a carbapenemes (carb^R), uno de los últimos recursos terapéuticos. Otras especies también han sido asociadas a infecciones nosocomiales, incluyendo *A.bereziniae*. Caracterizamos un aislado clínico local de *A. bereziniae* carb^R, HPC229[1], el cual presenta 6 plásmidos naturales[2] (Fig. 1). Uno de ellos, pNDM229, contiene el gen *bla*$_{NDM-1}$, codificando para la carbapenemasa NDM-1, inserto en un transposon Tn*125* con un gen de resistencia a aminoglucósidos, *aphA6*, corriente arriba. Dos secuencias de inserción tipo IS*Aba14* Se encuentran en pNDM229, sugiriendo la formación del nuevo transposón compuesto Tn*14* (Fig. 2).

Para evaluar la funcionalidad de estos transposones, HPC229 fue transformada con el plásmido pVRL1 como secuencia blanco adicional para la transposición, y posteriormente, fue sometida a concentraciones creciente del carbapeneme imipenem (IMP)[3] (Fig. 3). Obtuvimos la cepa evolucionada HPC229_HR, que mostró una mayor CIM a IMP en comparación a la cepa parental (256 µg/mL vs. 512 µg/mL). Hipotetizamos que la resistencia aumentada se debe a un aumento en el número de copias de pNDM229, o a la amplificación de *bla*$_{NDM-1}$ por transposición mediada por Tn*125* or Tn*14*, dado que tanto IS*Aba125* como IS*Aba14* presentan mecanismos replicativos.

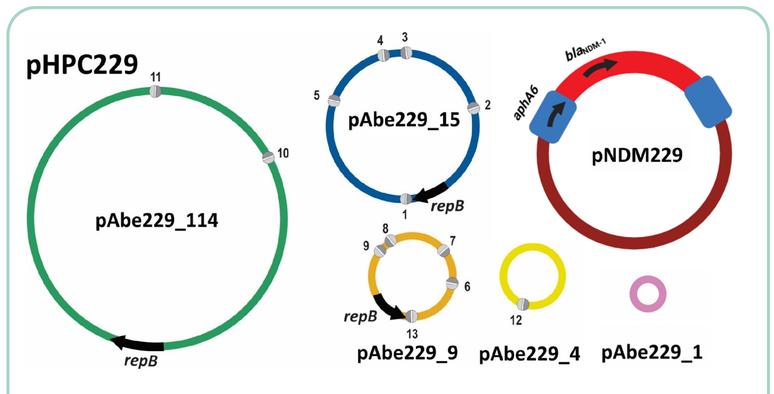


Figura 1. Estructuras de los plásmidos de HPC229 deducidas de datos de pirosecuenciación y ensayos de PCR con oligonucleótidos específicos[2].

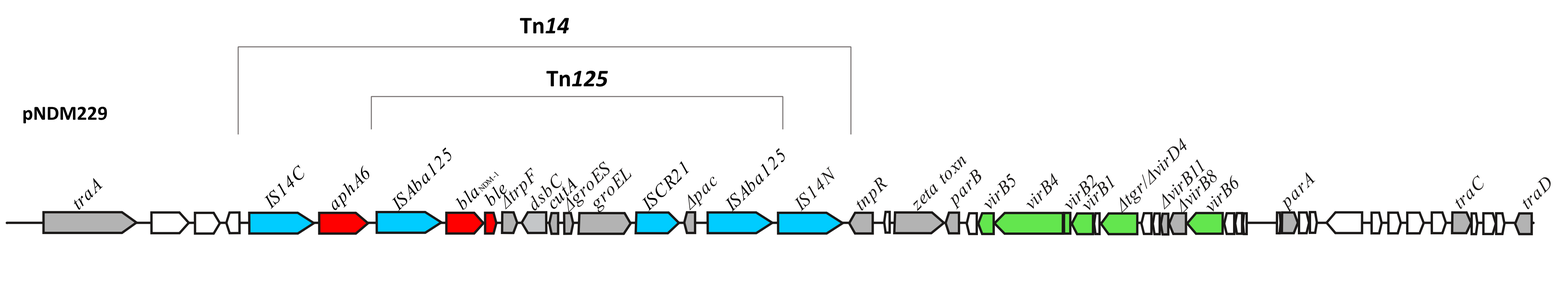


Figura 2. Representación lineal de pNDM229. Secuencias de inserción (celeste), genes de resistenca a antimicrobianos (rojo), genes de transferencia (verde) y los transposons compuestos Tn*125* y Tn*14* (indicados por corchetes).

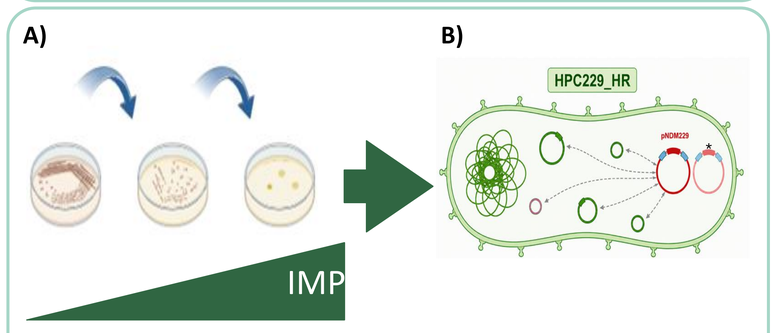


Figura 3. A) Generación de la cepa evolucionada HPC229_HR. HPC229 fue transformada con pVRL1 (GEN^R) (HPC229-1) y sometida a pasajes sucesivos en concentraciones crecientes de IMP, resultando en HPC229_HR. **B) Modelo propuesto para el aumento en la CIM a IMP en HPC229_HR.** Eventos de transposición (indicados en flechas grises) de Tn*125* (rojo) o Tn*14* (azul), o aumentos en pNDM229 PCN (*).

En este trabajo presentamos las bases genéticas del aumento de la resistencia a IMP (IMP^R) en HPC229_HR en base al anásis del **número de copias de pNDM229** (PCN), el **número de copias del gen *bla*$_{NDM-1}$** (GCN), junto a datos de secuenciación del genoma completo.

RESULTADOS

1) HPC229_HR presentó un aumento en el número de copias de pNDM229 y *bla*$_{NDM-1}$

- pNDM229 PCN y *bla*$_{NDM-1}$ GCN fueron determinados por qPCR, utilizando el gen cromosomal *dnaA* como referencia. Los genes plasmídicos *virB6* y *bla*$_{NDM-1}$ fueron usados para determiner el PCN y el GCN, respectivamente (Fig. 4).
- Se obtuvieron curvas de estándares para calcular la eficiencia de cada amplificación[4]. PCN y GCN fueron determinados utilizando la siguiente expresión:

$$PCN = \frac{Ef_{virB6}{}^{-Ct_{virB6}}}{Ef_{dnaA}{}^{-Ct_{dnaA}}} \qquad GCN = \frac{Ef_{NDM}{}^{-Ct_{NDM}}}{Ef_{dnaA}{}^{-Ct_{dnaA}}}$$

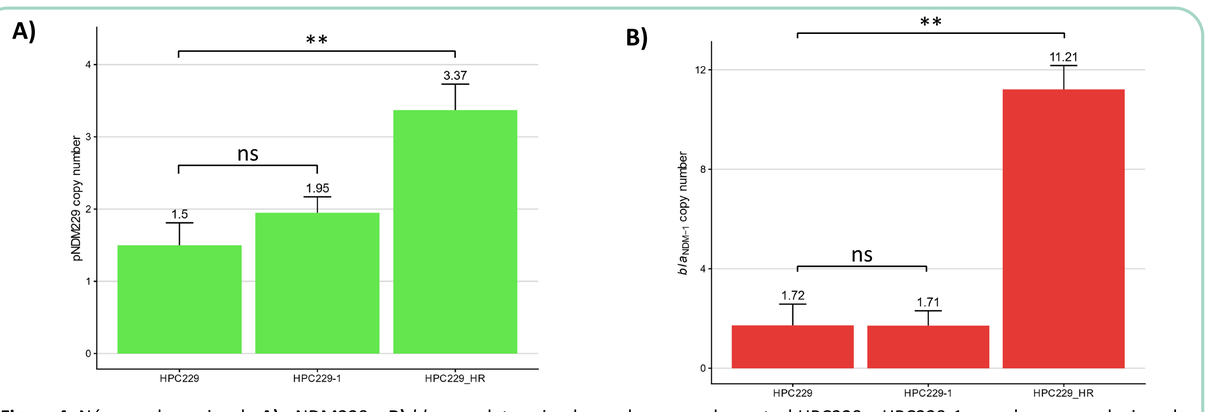


Figura 4. Número de copias de **A)** pNDM229 y **B)** *bla*$_{NDM-1}$ determinados en las cepas de control HPC229 y HPC229-1, y en la cepa evolucionada HPC229_HR. Se utilizó la prueba t de Student, estableciendo la significancia a un P-value < 0.05. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

❖ HPC229_HR mostró un **incremento de 2 veces en el número de copias de pNDM229 y de 6 veces en el número de copias de *bla*$_{NDM-1}$** en comparación a la cepa parental.

El aumento en *bla*$_{NDM-1}$ GCN fue mayor al aumento en pNDM229 PCN en HPC229_HR, sugiriendo amplificación adicional de ***bla*$_{NDM-1}$ en el genoma de HPC229_HR**

2) El fenotipo de resistencia aumentada a IMP resistió por más de 100 generaciones

- La estabilidad del fenotipo de IMP^R aumentado en HPC229_HR fue evaluada luego de pasajes seriados en condiciones no selectivas.

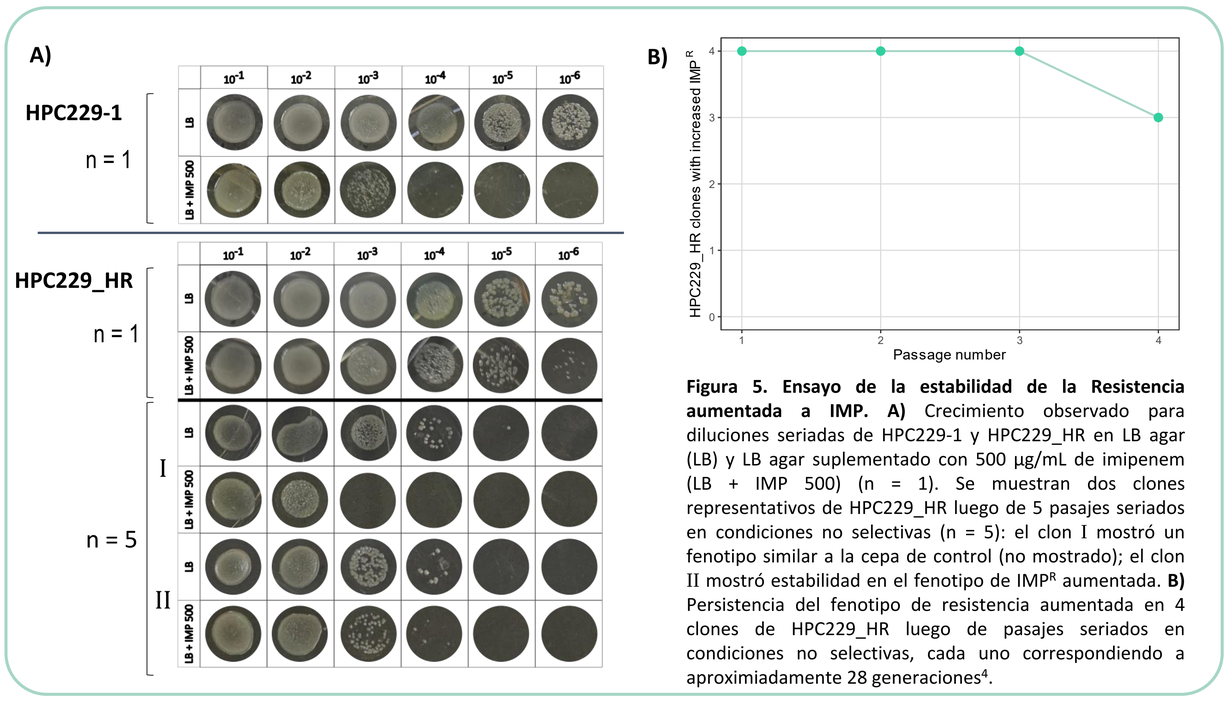


Figura 5. Ensayo de la estabilidad de la Resistencia aumentada a IMP. A) Crecimiento observado para diluciones seriadas de HPC229-1 y HPC229_HR en LB agar (LB) y LB agar suplementado con 500 µg/mL de imipenem (LB + IMP 500) (n = 5). Se muestran dos clones representativos de HPC229_HR luego de 5 pasajes seriados en condiciones no selectivas (n = 5): el clon I mostró un fenotipo similar a la cepa de control (no mostrado); el clon II mostró estabilidad en el fenotipo de IMP^R aumentada. **B)** Persistencia del fenotipo de resistencia aumentada en 4 clones de HPC229_HR luego de pasajes seriados en condiciones no selectivas, cada uno correspondiendo a aproximiadamente 28 generaciones[4].

El aumento en la resistencia a IMP persistió por más de de 112 generaciones en tres de los cuatro clones de HPC229_HR analizados.

3) El análisis de la secuenciación por ONT reveló la amplificación en tándem de una region plasmídica conteniendo *bla*$_{NDM-1}$

- Se extrajo AND genómico de HPC229_HR y se lo secuenció utilizando Oxford Nanopore Technologies (ONT).

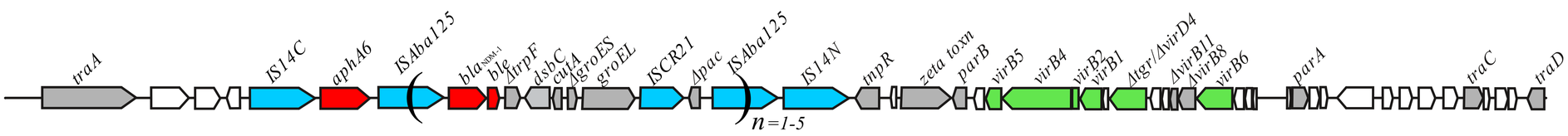


Figura 6. Representación esquemática de las variantes de pNDM229 encontradas en HPC229_HR por el análisis de los datos de secuenciación obtenidos por ONT. Las diferentes variantes del plásmido contienen de una a cinco copias en tandem (*n*) de la región indicada entre paréntesis (repeticiones en tándem).

❖ Variantes de pNDM229 conteniendo un número de copias variable de Tn*125* (n = 1-5) fueron identificadas en HPC229_HR.

❖ No se detectaron eventos de transposición de Tn*125* o Tn*14* ni copias adicionales de *bla*$_{NDM-1}$ en el cromosoma.

Estos resultados sugieren la amplificación de *bla*$_{NDM-1}$ mediada por recombinación homóloga.

CONCLUSIONES

- ✓ **Presentamos una cepa de *A. bereziniae* carb^R con una IMP^R aumentada luego de la exposición a este carbapeneme, HPC229_HR. Este fenotipo persistió por más de 100 generaciones en ausencia de presión del antibiótico, indicando estabilidad genómica.**
- ✓ **Este fenómeno puede explicarse por dos fenómenos: el aumento en el número de copias de pNDM229, que podría promover la diseminación de genes de resistencia a antibióticos por transferencia horizontal de genes, y la amplificación de *bla*$_{NDM-1}$ por repeticiones en tándem de Tn*125*.**
- ✓ **Una caracterización más profunda de HPC229_HR podría aportar información sobre los mecanismos subyacentes a la diseminación de *bla*$_{NDM-1}$ en cepas clínicas de *Acinetobacter*.**

REFERENCIAS

1) Brovedan M et al. (2015) doi: 10.1128/AAC.00367-15. 2) Brovedan M et al. (2019) doi: 10.1371/journal.pone.0220584. 3) Morales F. Ailen et al., SAMIGE 2025; 4) Sanchez RI, Tesis Doctoral, UNR, 2023.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por CONICET, ANPCyT, PEIC I+D (Santa Fe) y UNR.