PLASTICIDAD ESTRUCTURAL DE pNDM229, PLÁSMIDO PORTADOR DE *bla*$_{NDM-1}$ PROVENIENTE DE *Acinetobacter bereziniae*

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 claves: Carbapenemes, resistencia, plásmido.

XX Jornadas de Ciencias, Tecnologías e Innovación

INTRODUCCIÓN

Entre las especies del género *Acinetobacter*, *A. baumannii (Ab)* resistente a carbapenemes (carb^R) es uno de los patógenos oportunistas más frecuentemente aislados en infecciones nosocomiales. Sin embargo, otras especies, como *A. bereziniae*[1], se han asociado a las mismas. Previamente, en nuestro grupo de investigación se caracterizó una cepa clínica local *A. bereziniae* HPC229[2] carb^R que alberga 6 plásmidos no conjugativos (Fig. 1)[3]. Uno de ellos, pNDM229, contiene el gen *bla*$_{NDM-1}$ (codificante de la carbapenemasa NDM-1) inserto en un transposón compuesto Tn*125.* Corriente arriba del mismo presenta un gen de resistencia a aminoglucósidos, *aphA6*, (Fig. 6). Adyacente a *aphA6* se localiza una secuencia de inserción, IS*Aba14*, dando lugar a la estructura IS*Aba14-aphA6*-Tn*125*, ampliamente distribuida en *Acinetobacter* carb^R. En pNDM229 se encontró, además, una segunda IS*Aba14* no idéntica, inmediatamente corriente abajo de Tn*125*, lo que sugiere la formación de un nuevo transposón compuesto, Tn*14*[2].

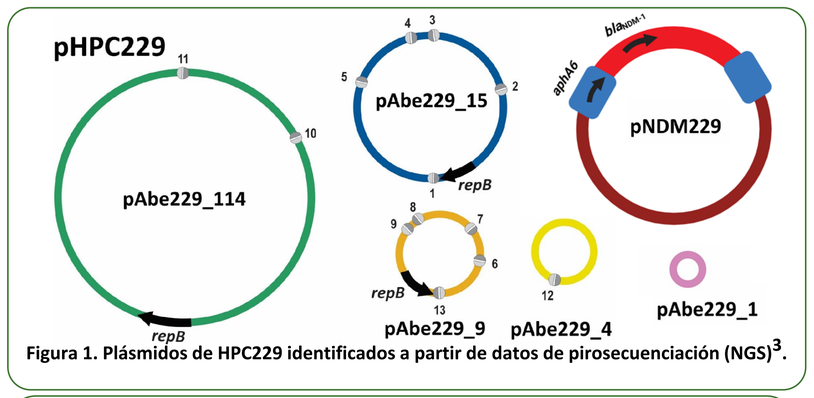


Figura 1. Plásmidos de HPC229 identificados a partir de datos de pirosecuenciación (NGS)[3].

Ensayos previos de transformación de la cepa sensible a carbapenemes (carb^S), *A. baylyi* ADP1 (ADP1) con el contenido plasmídico de HPC229 (pHPC229) no se logró obtener clones resistentes al carbapenem imipenem (IMP^R). Sin embargo, se obtuvieron clones IMP^R al transformar la cepa *A. baumannii* ATCC 17978 carb^S (Fig. 2, Tabla 1). Esto sugiere que pNDM229 es un plásmido no permisivo en ADP1 o que su concentración en el conjunto plasmídico natural es inferior a la requerida para transformar a este hospedador.

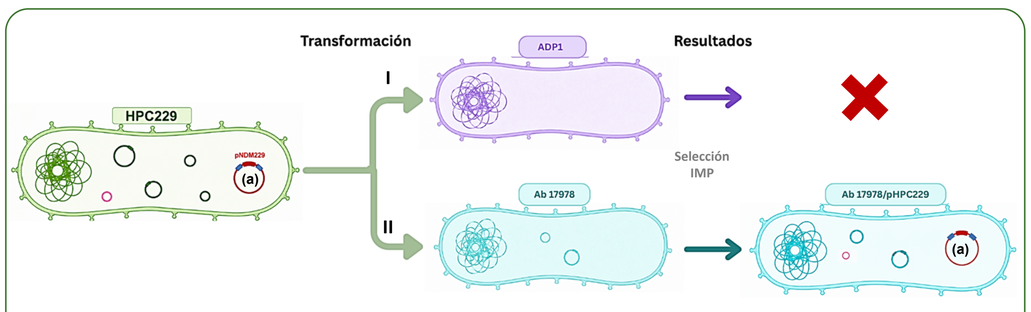


Figura 2. Ensayos de transformación con pNDM229. pHPC229 fue usado para transformar las cepas carb^S: **I)** *A. baylyi* ADP1 y **II)** *A. baumanni*i 17978. pNDM229 se indica con **(a)**, pAbe229_1 en rosa.

Tabla 1. Ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos

Fuente de ADN plasmidicos	Hospe-dador	Clones_tf IMP^R	Halos de inhibición en mm (interpretación según CLSI) [a]		
			IMP	EDTA[b]	AKN
HPC229			6 (R)	+	14 (R)
	Ab 17978		32 (S)	-	23 (S)
		#3[c]	6 (R)	+	6 (R)
	ADP1		31 (S)	-	21 (S)
		n[d]			

[a]Clasificación como: Resistante **(R)**, Sensible **(S)** o Intermedio **(I)**, según CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). AKN, amikacina.
[b]Ensayo de sinergia con discos (EDTA-carbapenemes).
[c]El análisis de secuencia confirmó la presencia de pNDM229 y pAbe229_1.
[d]n, la selección con IMP no recuperó clones transformantes.

Se generó una cepa derivada de HPC229 que mostró una alta resistencia a IMP, denominada HPC229_HR, a partir de pases sucesivos en concentraciones crecientes de IMP[4]. Esta cepa presentó un aumento en el número de copias del plásmido pNDM229 (NCP) y amplificación del gen *bla*$_{NDM-1}$ (Fig. 3).

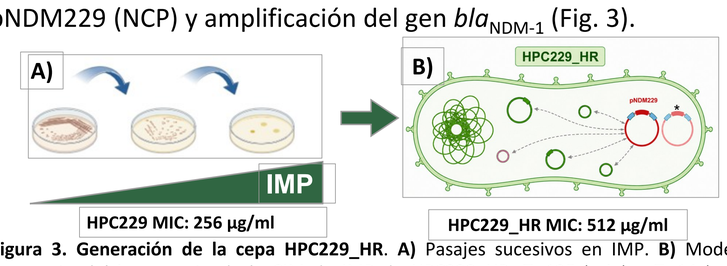


Figura 3. Generación de la cepa HPC229_HR. A) Pasajes sucesivos en IMP. **B)** Modelo propuesto del incremento de la CIM de IMP de HPC229_HR: Tn*125* (rojo) o Tn*14* (azul) eventos de transposición (flechas grises) o un aumento de pNDM229 NCP (*).

RESULTADOS

1) Se identificó un reordenamiento de pNDM229 en clones ADP1 transformantes.

- ✓ Ab 17978 y *A. baylyi* ADP1 fueron transformadas con pHPC229_HR y seleccionadas con IMP (Fig. 4, I y II). Subsecuentes transformaciones con el contenido plasmídico de ADP1 #30 (pADP1) se llevaron a cabo en las mismas cepas (Fig. 4, III).
- ✓ Se realizaron ensayos de sensibilidad a IMP y AKN (Tabla 2) y se analizaron diferentes regiones marcadoras de pNDM229 mediante PCR (Fig. 6, Tabla 2).
- ✓ Se analizaron los perfiles plasmídicos de las cepas: HPC229-HR, ADP1 y ADP1 #30 (Fig. 5).
- ✓ Se llevó a cabo la secuenciación del plásmido mediante Tecnología Oxford Nanopore (ONT) en el clon ADP1 #30 (Fig. 6).

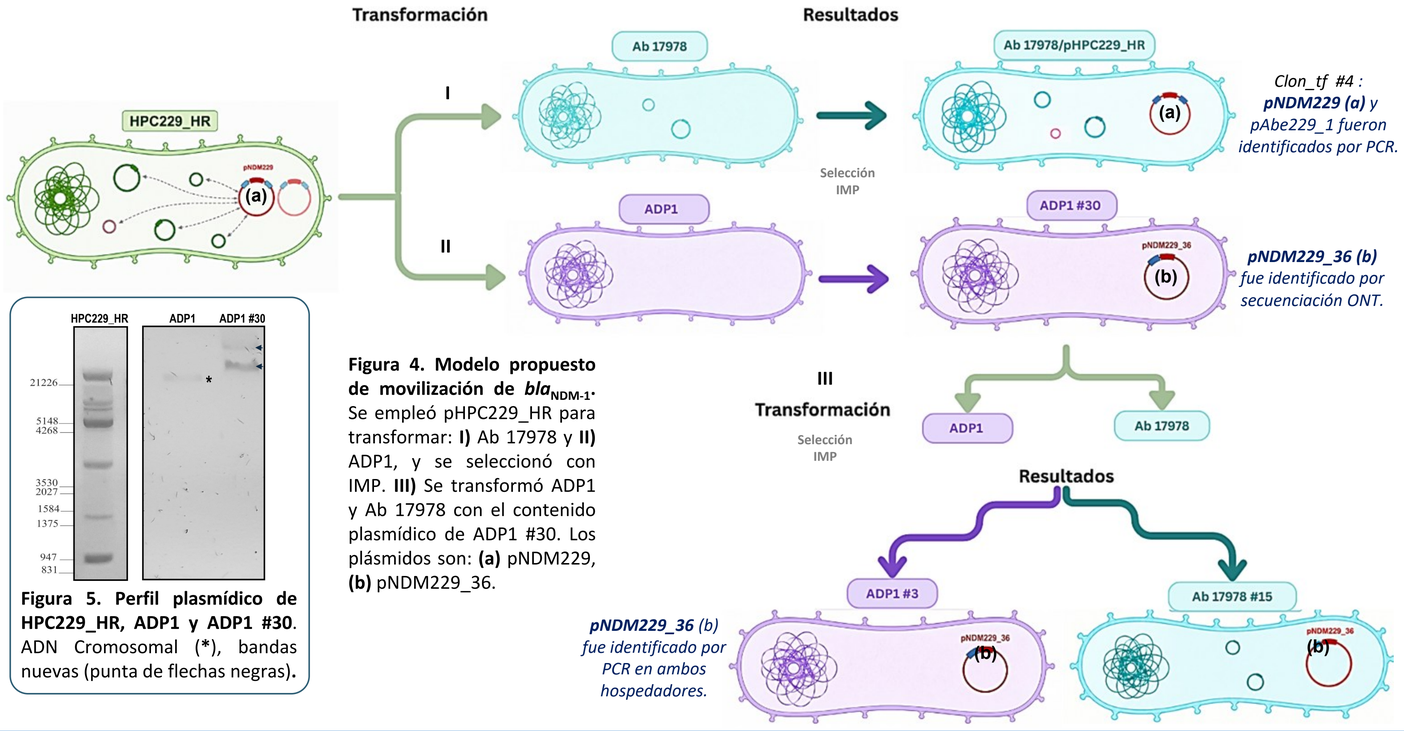


Figura 4. Modelo propuesto de movilización de *bla*$_{NDM-1}$. Se empleó pHPC229_HR para transformar: **I)** Ab 17978 y **II)** ADP1, y se seleccionó con IMP. **III)** Se transformó ADP1 y Ab 17978 con el contenido plasmídico de ADP1 #30. Los plásmidos son: **(a)** pNDM229, **(b)** pNDM229_36.

Figura 5. Perfil plasmídico de HPC229_HR, ADP1 y ADP1 #30. ADN Cromosomal (*), bandas nuevas (punta de flechas negras).

Tabla 2. Ensayos de sensibilidad y amplificación por PCR de regiones marcadoras de pNDM229.

Fuente de ADN plasmídico	Hospedador	clones_tf IMP^R	Halos de inhibición en mm (interpretación según CLSI)			PCR de regiones marcadoras de pNDM229[a]						
			IMP	EDTA	AKN	A	B	C	D	E	F	G
HPC229_HR			6 (R)	+	14 (R)	+	+	+	+	+	+	+
ADP1 #30	ADP1		40 (S)	-	31 (S)	-	-	-	-	-	-	-
		#30 [b]	6 (R)	+	20 (S)	+	+	+	-	-	-	+
	Ab 17978		32 (S)	-	23 (S)	-	-	-	-	-	-	-
		#4 [b]	6 (R)	+	17 (S)	+	+	+	+	+	+	+
	ADP1	#3	6 (R)	+	18 (S)	+	+	+	-	-	-	+
	Ab 17978	#15	6 (R)	+	16 (I)	+	+	+	-	-	-	+

[a]Las regiones marcadoras están indicadas en la Fig. 6.
[b]pNDM229_36 fue confirmado por secuenciación ONT.

❑ La primera transformación con pHPC229_HR mostró:
- ➢ Clones Ab 17978 #4 y ADP1 #30, IMP^R y AKN^S (Tabla 2). Sin embargo, se observó una reducción de la sensibilidad a AKN en ambos clones.
- ➢ Ensayos de PCR mostraron diferencias en los marcadores de pNDM229: 7/7 en Ab 17978 **#4** y solo 4/7 en ADP1 **#30** (Tabla 2, Fig. 6).
- ➢ La extracción plasmídica de ADP1 #30 mostró diferencias electroforéticas comparado con el perfil parental (Fig. 5).

Estos resultados sugieren que pNDM229 puede diseminarse a Ab 17978, pero requiere reordenamientos genéticos en ADP1.

❑ La subsecuente transformación de Ab 17978 y ADP1 con pADP1 #30 mostró:
- ➢ Fenotipo IMP^R y las mismas 4/7 regiones marcadores de pNDM229 de ADP1 #30 en ambos hospedadores (ADP1 **#3** y Ab 17978 **#15**, Tabla 2).
- ➢ Una mayor eficiencia de transformación en ADP1 en comparación con pHPC229_HR.

Estos resultados indican una variante plasmídica de pNDM229 capaz de replicarse en ADP1.

2) El análisis de secuencias revela el nuevo plásmido pNDM229_36

✓ **El contenido plasmídico de ADP1 #30 fue secuenciado mediante ONT.**

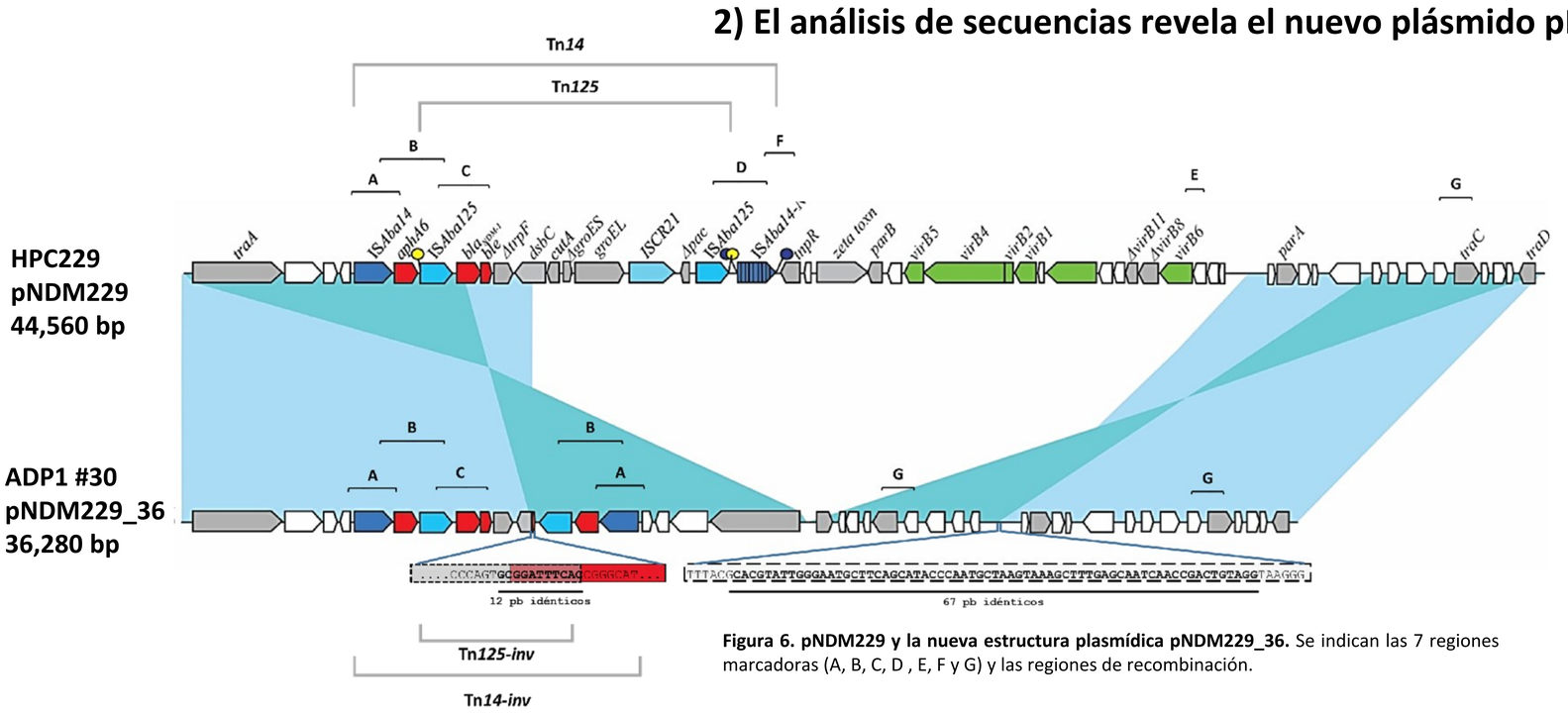


Figura 6. pNDM229 y la nueva estructura plasmídica pNDM229_36. Se indican las 7 regiones marcadoras (A, B, C, D , E, F y G) y las regiones de recombinación.

❑ El análisis de secuencia confirmó la presencia de una nueva estructura plasmídica conteniendo *bla*$_{NDM-1}$ de 36 kpb, **pNDM229_36** (Fig. 6).

❑ La estructura pNDM229_36 presenta dos inversiones. Esto puede explicarse mediante eventos de recombinación homóloga:
- ✓ Un fragmento de 12 pb idéntico en *bla*$_{NDM-1}$ y *dsbC*.
- ✓ Un fragmento de 67 pb idéntico en dos regiones intergénicas.

La nueva estructura pNDM229_36 contiene dos nuevos transposones compuestos, Tn*125*-inv y Tn*14*-inv, que presentan secuencias de inserción invertidas.

CONCLUSIONES

- ✓ El plásmido pNDM229 se recuperó en *A. baumannii* 17978, pero no en *A. baylyi* ADP1. En cambio, en esta última, se identificó una estructura plasmídica nueva pNDM229_36, lo que sugiere que *A. baylyi* es un hospedador no permisivo para el plásmido natural de *A. bereziniae*.
- ✓ pNDM229 exhibe una plasticidad estructural impulsada por la recombinación.
- ✓ Dos nuevas plataformas de movilización de *bla*$_{NDM-1}$, Tn*125-inv* and Tn*14-inv*, fueron detectadas en pNDM229_36.

Estos hallazgos evidencian una elevada plasticidad estructural de pNDM229 y destacan el potencial de reordenamientos plasmídicos para generar nuevas variantes que pueden contribuir a la diseminación de genes de resistencia de relevancia clínica, como bla$_{NDM-1}$, entre patógenos.

REFERENCIAS

1) Bonnin et al., 2012 doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03928.x. 2) Brovedan M et al. (2015) doi: 10.1128/AAC.00367-15. 3) Brovedan et al. 2019. doi.org/10.1371/ journal. pone.0220584. 4) Bichara F. et al, poster MM-3 in SAMIGE 2026.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por subsidios de ANPCyT, PEIC I+D (Santa Fe) y UNR a JMB.