



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations

Módulo 1

Del genotipo al fenotipo: predicción de la resistencia a los antimicrobianos mediante la secuenciación del genoma completo

Jette S. Kjeldgaard

DTU FOOD

Descargo de responsabilidad

La traducción de esta presentación del idioma inglés al francés fue realizada por la FAO en colaboración con el Instituto Nacional de Alimentos de la Universidad Técnica de Dinamarca (DTU), que actúa como Centro de Referencia de la FAO para la Resistencia a los Antimicrobianos en Dinamarca. Este trabajo se llevó a cabo en el marco del Proyecto de Seguridad Sanitaria Global de la FAO - Vigilancia de Alerta Temprana de Enfermedades Infecciosas, financiado por la United States Agency for International Development (USAID) (Agencia de los Estados Unidos para el Desarrollo Internacional).

La versión original en inglés de esta presentación fue desarrollada por la DTU como parte de la subvención regional SeqAfrica del Fondo Fleming, financiada por el Departamento de Salud y Asistencia Social del Reino Unido.



Descripción general

- ❖ ¿Por qué utilizar la secuenciación del genoma completo para la vigilancia de la RAM?
- ❖ ¿Cómo utilizar la secuenciación del genoma completo para la vigilancia de la RAM?
- ❖ ¿Cómo funciona la predicción de la RAM basada en la secuenciación del genoma completo?

- ❖ Ventajas e inconvenientes de la predicción de la RAM a partir de métodos fenotípicos y genotípicos en el contexto de la vigilancia

¿Por qué utilizar la secuenciación del genoma completo para la vigilancia de la RAM?

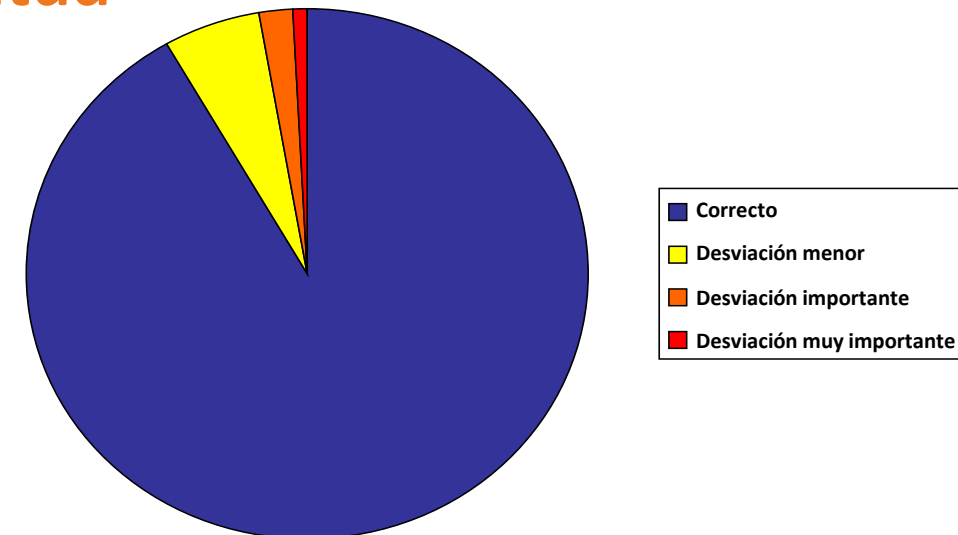
- ❖ Hay métodos fenotípicos de laboratorio robustos y estandarizados que llevan décadas elaborándose y perfeccionándose

Antibiogramas fenotípicos

- Nivel de desviación basado en pruebas de aptitud

Prueba de aptitud Salm-Surv mundial de la OMS para el antibiograma de aislados de Salmonela entre 2000 y 2007

6051 de 67.229 pruebas (el 9%) fueron incorrectas



Antibiogramas fenotípicos: nivel de desviación basado en pruebas de aptitud

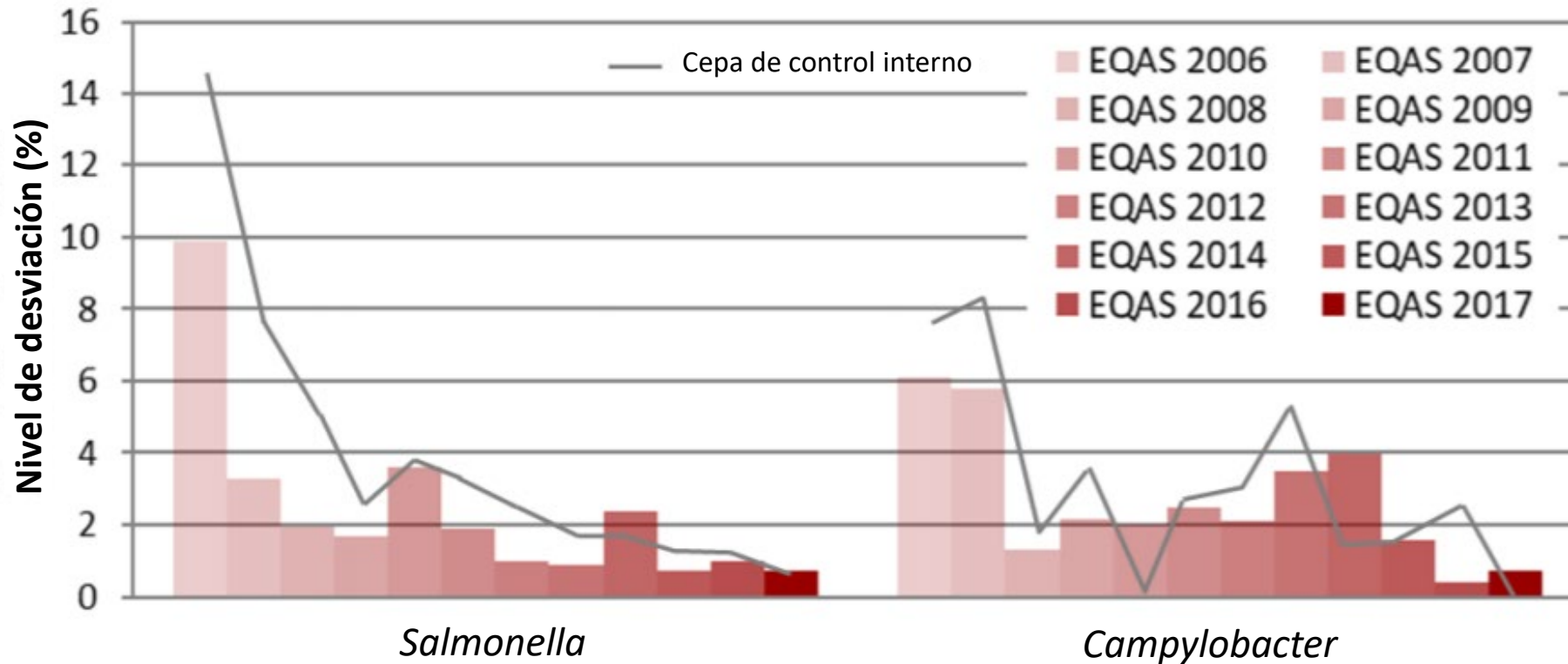


Figura 2: Comparación del EQAS de EURL-AR desde 2006, que muestra el porcentaje total de desviaciones de los antibiogramas hechos por los laboratorios participantes.

Cómo "mide" la resistencia la secuenciación del genoma completo

- ❖ Los datos de la secuencia se consultan para comprobar:
 - la presencia/ausencia de genes de resistencia a los antimicrobianos o
 - mutaciones cromosómicas concretas
- ❖ Cómo consultar los datos de la secuencia: alineación/mapeo
- ❖ Qué se busca al consultar los datos de la secuencia: genes/mutaciones que proporcionan RAM recogidos en las bases de datos

Base de datos de factores determinantes de la resistencia

En el mejor de los casos, contiene una lista de:

- ❖ todos los genes de RAM existentes
- ❖ todas las mutaciones existentes de los genes cromosómicos que intervienen en la RAM
- ❖ todas las mutaciones que conducen a una expresión modificada de porinas y bombas de expulsión que intervienen en la RAM

- El contexto del gen influye
- La expresión del gen influye
- Nuestros conocimientos son imperfectos

Instrumentos para predecir los genes resistentes a los antimicrobianos

- ❖ Existen unos 47 recursos de predicción informática de los factores determinantes de la RAM
- ❖ Las características de los sistemas difieren mucho en cuanto a formatos de entrada y salida
- ❖ Basado en Internet o en línea de comandos (GitHub)
 - Evitan complejidades al usuario final
- ❖ Acceso libre o de mercado
- ❖ Tiempo de computación

Concordancia entre fenotipo y genotipo

Patógeno	N.º de patógenos	Método de antibiograma	N.º de antimicrobianos	Herramienta bioinformática	Datos de secuenciación	Concordancia	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
<i>S. typhimurium</i>	49	CMI	17	ResFinder	Ensamblados, Velvet	99,74%			Zankari et al., 2013
<i>E. coli</i>	48								
<i>E. faecalis</i>	50								
<i>E. faecium</i>	50								
<i>E. coli</i> (ESBL)	74	DD	7	BLASTn, grupo seleccionado	Ensamblados, Velvet		96%	97%	Stoesser et al., 2013
<i>K. pneumoniae</i> (ESBL)	69								
<i>S. aureus</i>	501	DD/CMI (Vitek)	12	BLASTn, grupo seleccionado	Ensamblados, Velvet		97%	99%	Gordon, N. C. et al., 2014
<i>C. jejuni</i>	32	CMI	9	BLASTx	Ensamblados, CLC	99,2%			Zhao et al., 2016
<i>C. coli</i>	82								
<i>S. enterica</i>	104	CMI	14	ResFinder/ ARG-ANNOT/ CARD / BLAST	Ensamblados, CLC	99,0%	99,2%	99,3%	McDermott et al., 2016
	536						97,6%	98,0%	
<i>E. coli</i>	31	CMI	4	Base de datos personalizada basada en alelos de betalactamasas / CARD / ARDB			87%	98%	Shelburne et al., 2017
<i>K. pneumoniae</i>	24								
<i>P. aeruginosa</i>	22								
<i>E. cloacae</i>	13								
<i>S. enterica</i>	50	CMI	4	ResFinder/PointFinder	Ensamblados, SPAdes	98,4%			Zankari et al., 2017
<i>E. coli</i>	50		6						
<i>C. jejuni</i>	50		4						
<i>E. faecalis</i>	97	CMI	11	ResFinder / NCBI Pathogen DB / BLAST	Ensamblados, CLC	96,5%			Tyson et al., 2018
<i>E. faecium</i>	100								
<i>S. aureus</i>	501	DD / CMI	12	GeneFinder/ Mykrobe/ Typewriter	fastq / ensamblados, BLAST	98,3%			Mason et al., 2018
	491								
	397								
<i>M. tuberculosis</i>	10.209	MGIT 960	Isoniacida Rifampin Etambutol Piracinamida	Cortex	Ensamblados	89,5%			Walker et al., 2018
<i>H. pylori</i>	140	CMI (prueba E)	5	ARIBA	fastq	99%			Lauener et al., 2019

- ❖ Alta concordancia (> 96%) entre los genes/mutaciones de resistencia adquirida y la concentración inhibitoria mínima (CMI)
- ❖ Se han observado altos niveles de sensibilidad (>87%) y especificidad (>97%) en función de la especie analizada

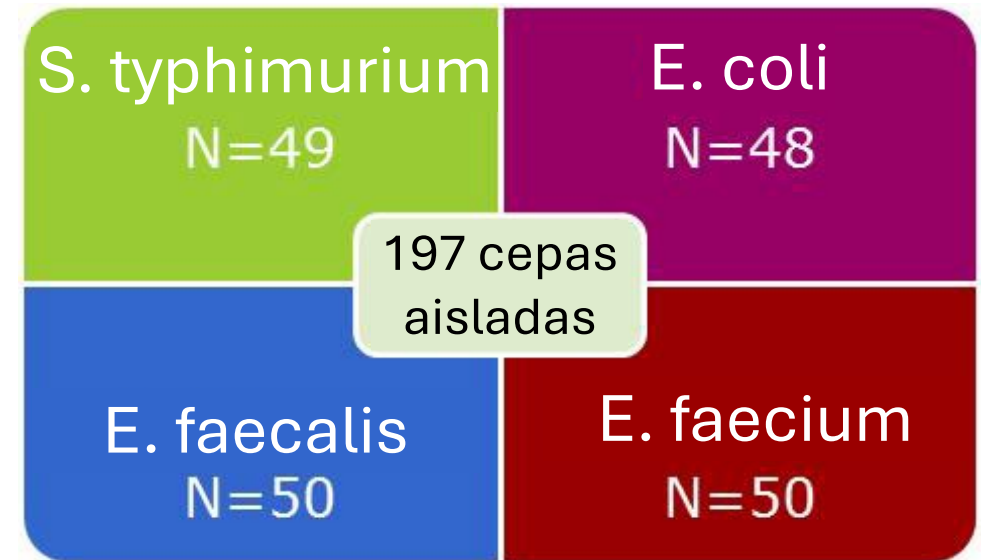
Estudio de viabilidad del seguimiento genotípico DANMAP II

- ❖ Objetivo: utilizar la secuenciación de nueva generación para la vigilancia de la RAM y compararla con los procedimientos fenotípicos actuales (CMI)



Estudio de viabilidad del seguimiento genotípico DANMAP II

- ❖ Se utilizó la herramienta ResFinder para detectar los genes de resistencia
- ❖ Se determinó un fenotipo de resistencia predicho a partir de los genes de resistencia detectados
- ❖ El fenotipo de resistencia predicho se comparó con el perfil de resistencia fenotípica original (CMI)



Estudio de viabilidad del seguimiento genotípico DANMAP II

Genotípico	Fenotípico	
	Resistentes	Sensibles
Predichos resistentes	475	7
Predichos sensibles	16	2553

99,2% de concordancia



Nuevo análisis

Genotípico	Fenotípico	
	Resistentes	Sensibles
Resistentes	475	7
Sensibles	0	2569

99,8% de concordancia

Espectinomicina en *E. coli*

Correlación entre el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos y el genotipo en *E. coli*

- ❖ Estudio de la FDA estadounidense
- ❖ Tamaño de la muestra: 76 aislados
- ❖ Fuente: muestras fecales de ganado en 2011
- ❖ Las 76 eran multirresistentes, resistentes al menos a cuatro antimicrobianos, tres grupos

Tyson *et al.*, *J Antimicrob Chemother.* Octubre de 2015; 70(10):2763-9.

Correlación entre el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos y el genotipo en *E. coli*

Antibiótico	Fenotipo: resistente		Fenotipo: sensible		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
	Genotipo: resistente	Genotipo: sensible	Genotipo: resistente	Genotipo: sensible		
GEN	3	0	0	73	100	100
KAN	10	0	0	66	100	100
STR	52	0	12	12	100	50
AMC	26	0	0	50	100	100
AXO	23	1	0	52	95,8	100
FOX	24	0	2	50	100	96,2
TIO	22	1	1	52	95,7	98,1
COT	13	0	0	63	100	100
FIS	68	0	0	8	100	100
AZI	1	0	0	75	100	100
AMP	55	0	0	21	100	100
CHL	55	0	0	21	100	100
PIC	6	0	0	70	100	100
NAL	21	0	0	55	100	100
TET	67	0	0	9	100	100
Total	446	2	15	677	99,6	97,8

Correlación entre el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos y el genotipo en salmonela

- ❖ Estudio de la FDA estadounidense
- ❖ Tamaño de la muestra: 285 aislados
- ❖ Fuente: Carne para venta minorista (n=181) y humanos (n=104)
- ❖ Combinaciones únicas representativas del serotipo, la fuente y las características de resistencia de 2011 a 2012

Correlación entre el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos y el genotipo en salmonela

Antimicrobianos	Fenotipo: Resistentes		Fenotipo: sensible		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
	Genotipo: resistente	Genotipo: sensible	Genotipo: resistente	Genotipo: sensible		
Gentamicina	60	3	3	219	95,2	98,6
Kanamicina	43	2	0	240	95,6	100,0
Estreptomycin	135	3	21	126	97,8	85,7
Amoxicilina-ácido clavulánico	61	2	0	222	96,8	100,0
Cefoxitina	46	1	15	223	97,9	93,7
Ceftiofur	61	0	2	222	100,0	99,1
Ceftriaxona	62	0	1	222	100,0	99,6
Ampicilina	135	1	0	149	99,3	100,0
Sulfisoxazol	133	0	0	152	100,0	100,0
Trimetoprim-Sulfametoxazol	20	1	0	264	95,2	100,0
Azitromicina	1	0	0	284	100,0	100,0
Cloranfenicol	28	0	0	257	100,0	100,0
Ciprofloxacino	3	1	0	281	75,0	100,0
Ácido nalidíxico	14	0	0	271	100,0	100,0
Tetraciclina	164	0	1	120	100,0	99,2
Total	966	14	43	3252	98,6	98,7

Estudio de viabilidad del seguimiento genotípico

1. Zankari, E., *et al.* "Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing". *J Antimicrob Chemother.* 2013. 68(4):771-7.
2. Gordon, N. C. *et al.*, "Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing". *J Clin Microbiol.* 2014. 52(4):1182-91.
3. Stoesser, N., *et al.*, "Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data". *J Antimicrob Chemother.* 2013. 68(10):2234-44.
4. Chakravorty, S. *et al.* "Genotypic susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* for amikacin and kanamycin resistance using a rapid Sloppy Molecular Beacon based assay identifies more cases of low level drug resistance than phenotypic Lowenstein-Jensen testing". *J Clin Microbiol.* 2015 53:43-51.
5. Tyson, G. H. *et al.* "Whole-genome sequencing accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*". *J Antimicrob Chemother.* Octubre de 2015; 70(10):2763-9.
6. Zhao, S., *et al.* "Whole genome sequencing analysis accurately predicts antimicrobial resistance phenotypes in *Campylobacter*". *Appl Environ Microbiol.* 30 de octubre de 2015; 82(2)
7. Tyson, G. H. *et al.* "Using genotypic methods to determine streptomycin resistance breakpoints for *Salmonella* and *Escherichia coli*". *FEMS Microbiol Lett.* Febrero de 2016; 363(4).

...Y habrá muchos otros

Predicción de la RAM de ResFinder 4.1

ResFinder 4.1

ResFinder detecta genes adquiridos o encuentra mutaciones cromosómicas que intervienen en la resistencia a los antimicrobianos en la secuencia total o parcial del ADN de las bacterias.

La base de datos está gestionada por: **Frank Møller Aarestrup** (haga clic para ponerse en contacto)

Actualizaciones

Escherichia coli		Completo		
Antimicrobiano	Grupo	Fenotipo previsto mediante la secuenciación del genoma completo	Antecedentes genéticos	
Amikacina	Aminoglucósido	Sin resistencia		
Tigeciclina	Tetraciclina	Sin resistencia		
Tobramicina	Aminoglucósido	Sin resistencia		
Cefepime	Betalactama	Resistente	blaOXA-162 (blaOXA-162_GU197550)	
Cloranfenicol	Fenicol	Resistente	floR (floR_AF118107)	
Piperacilina+tazobactam	Betalactama	Resistente	blaOXA-162 (blaOXA-162_GU197550)	
Cefoxitina	Betalactama	Sin resistencia		
Ampicilina	Betalactama	Resistente	blaOXA-162 (blaOXA-162_GU197550), blaTEM-1B (blaTEM-1B_AY458016)	
Ampicilina+ácido clavulánico	Betalactama	Sin resistencia		
Cefotaxima	Betalactama	Sin resistencia		
Ciprofloxacino	Fluoroquinolona	Resistente	gyrA (p.S83L)	
Colistina	Polimixina	Resistente	mcr-1.1 (mcr-1.1_KP347127)	
Sulfametoxazol	Antagonista de la vía del folato	Resistente	sul2 (sul2_HQ840942)	
Imipenem	Betalactama	Resistente	blaOXA-162 (blaOXA-162_GU197550)	

Predicción de la RAM de ResFinder 4.1

Gen de resistencia a los antimicrobianos adquirida y mutación puntual cromosómica: resultados

Fluoroquinolona									
Gen de resistencia	Identidad	Longitud del alineamiento / Longitud del gen	Posición en la referencia	Cóntigo	Posición en el cóntigo	Fenotipo	PMID	N.º de acceso	Notas
Mutación	Cambio de nucleótidos		Cambio de aminoácidos		Fenotipo	PMID	Notas		
gyrAp.T86I	-		t ->i		Ácido nalidíxico, ciprofloxacino	11266291, Sin publicar, 8384814, 16713726			
gyrA:p.P104S	-		p ->s		Ácido nalidíxico, ciprofloxacino	16713726	Fenotipo descrito solo en asociación con otras mutaciones (R285), fenotipo desconocido si la presente mutación se produce sola		

Polimixina									
Gen de Resistencia	Identidad	Longitud del alineamiento / Longitud del gen	Posición en la referencia	Cóntigo o profundidad	Posición en el cóntigo	Fenotipo	PMID	N.º de acceso	Notas
mcr-1.1	100.0	1626/1626	1..1626	NODE_69_longitud 2860 cov 27 418222	923.2548	Colistina	26603172	KP347127	

Fenicol									
Gen de resistencia	Identidad	Longitud del alineamiento / Longitud del gen	Posición en la referencia	Cóntigo o profundidad	Posición en el cóntigo	Fenotipo	PMID	N.º de acceso	Notas
floR	98.1878088962	1214/1215	1..1214	NODE_49_longitud _10893_cov_20 280698	2998...4211	Cloranfenicol, florfenicol	10339826	AF118107	Transportador MFS

Umbral %ID seleccionado: 90%

Interpretación de la combinación de colores

Color verde oscuro

- ❖ Indica una coincidencia perfecta de un gen determinado. El porcentaje de identidad es el 100% y la secuencia en el genoma abarca toda la longitud del gen de resistencia en la base de datos.

Color gris

- ❖ Indica un aviso debido a una coincidencia no perfecta: la longitud del alineamiento es menor que la del gen de resistencia de la base de datos, % ID < 100%.

Color verde claro

- ❖ Indica un aviso debido a una coincidencia no perfecta, % ID < 100%,
- ❖ una o varias variaciones con respecto a las bases del gen de la base de datos

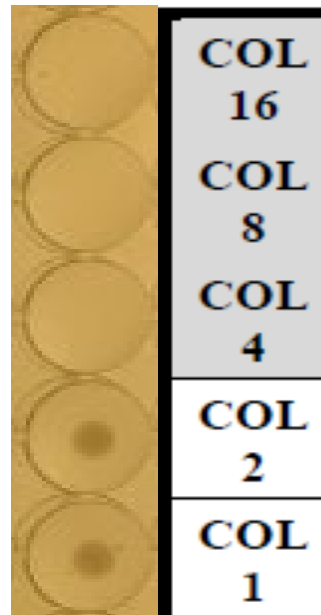
Resistente

Resistente

Resistente

Si no hay gen, tampoco hay resistencia: ¿es así?

- ❖ *E. coli*: no se ha encontrado ningún mecanismo de resistencia a la colistina (mutaciones cromosómicas, p. ej., *pmrA* y *pmrB*, *mcr-1* a *-5*)



CMI = 4 mg/l

Umbral epidémico = 2 mg/l

¿Limitación del método CMI?

¿Un nuevo mecanismo de resistencia a la colistina?

La calidad del resultado dependerá siempre de la base de datos en que se sustente

Si hay gen, también hay resistencia: ¿es así?

Gen de resistencia	Identidad	Longitud del alineamiento / Longitud del gen
floR	98.1878088962	1214/1215

- ¿Nueva variante?
- ¿Gen truncado?

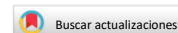
- Puede que los genes sean crípticos o no se expresen.

Epidemiología y vigilancia

El gen *mcr-9* de *Salmonella* y *Escherichia coli* no está asociado con la resistencia a la colistina en los Estados Unidos

Gregory H. Tyson, Cong Li, Chih-Hao Hsu, Sherry Ayers, Stacey Borenstein, Sampa Mukherjee, Thu-Thuy Tran, Patrick F. McDermott, Shaohua Zhao

DOI: 10.1128/AAC.00573-20



Buscar actualizaciones

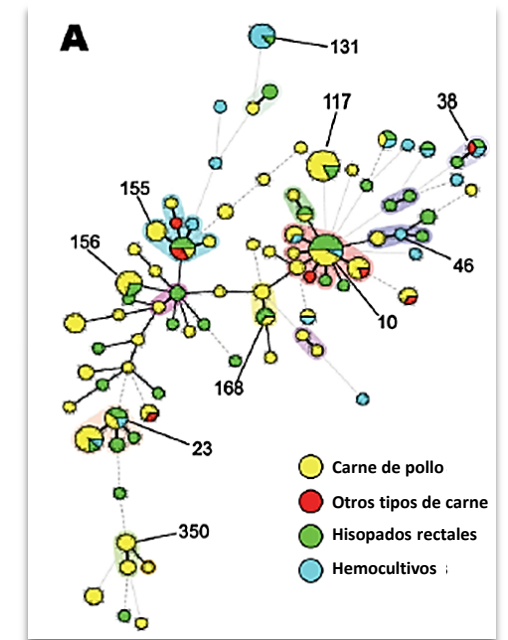
Limitaciones de la predicción de la RAM mediante la secuenciación del genoma completo

- ❖ Se detecta la presencia o ausencia de factores determinantes de la resistencia
 - No hay medición cuantitativa del grado de resistencia

- ❖ Los resultados dependen de las bases de datos en que se sustentan
 - No se detectan mecanismos de resistencia nuevos o desconocidos

Ventajas de la predicción de la RAM mediante la secuenciación del genoma completo

- ❖ Se obtiene mucha más información además de la relativa a la resistencia
- ❖ Pueden detectarse clones de resistencia de reciente aparición (nuevos)
- ❖ Las secuencias pueden almacenarse y volverse a analizar
- ❖ Los métodos fenotípicos a los que recurrimos no siempre son muy perfectos





Facultad de Administración
y Economía
de Zaragoza

RESUMEN
EVALUACIÓN

iGracias!

