



L'antibioticoresistenza in Regione Emilia-Romagna
Reggio Emilia, Giovedì 11 Ottobre 2018



Approcci (meta)genomici per lo screening della trasmissione dell'antibioticoresistenza in ambito veterinario



Christian Milani, PhD



Laboratory of Probiogenomics, Department of Life Sciences, University of Parma, Italy

La bioinformatica

2001

(Molecular) **bio – informatics**: bioinformatics is conceptualizing biology in terms of molecules (in the sense of physical chemistry) and applying "informatics techniques" (derived from disciplines such as applied math, computer science and statistics) to understand and organize the information associated with these molecules, on a large scale. **In short, bioinformatics is a management information system for molecular biology and has many practical applications.**

Oxford English Dictionary

2015

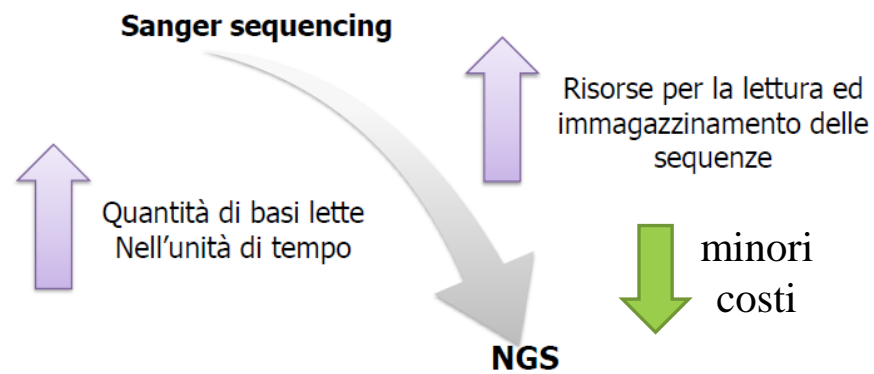
The field of science in which biology, computer science and information technology merge into a single discipline

National Center for Biotechnological Information, NCBI

I sequenziatori di nuova generazione

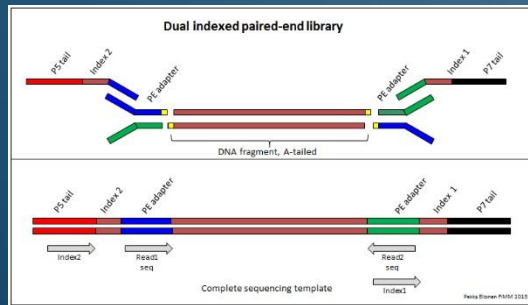
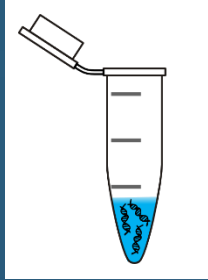
- ✓ Generazione 0: sequenziamento chimico (Maxam & Gilbert)
- ✓ Generazione 1: dye-terminator (Metodo Sanger, 1975)
- ✓ **Generazione 3: NGS con pre-amplificazione (Pyrosequencing 454; Illumina-Solexa)**
- ✓ Generazione 4: Single molecule real time sequencing, SMRT (PacBio)

Incremento della complessità



Technology	Starting Material	Samples per Run	Run Time*	Read Length	Number of Clusters	Output per Run
CE-based Sanger Method	1–3 µg	1-96	0.5 hrs	550 bp [†]	1–96	0.550–52.5 kb
			3 hrs	900 bp [†]	1–96	0.9–86.4 kb
Illumina MiSeq [®] System	50 ng Nextera [®] kit	1 lane flow cell	4 hrs	1 × 36 bp [§]	25 million	15 Gb
	0.1–1 µg TruSeq [®] kit		65 hrs	2 × 300 bp ^{**}		

NGS Pipeline



Estrazione DNA

PCR o Frammentazione

Barcoding e pooling

Preparazione della library

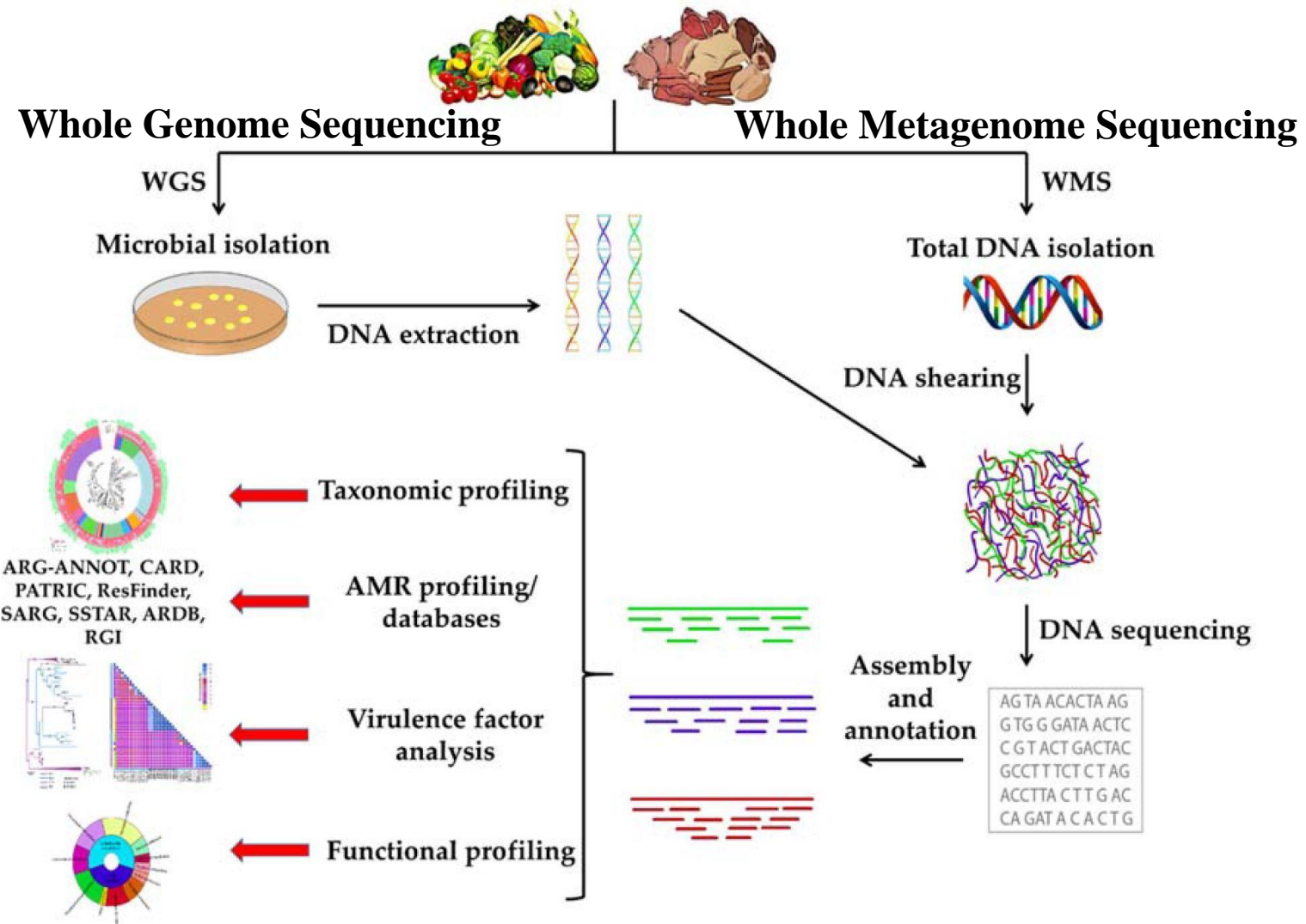
Caricamento Flow Cell

**Sequenziamento mediante
Illumina**

Pool di Reads



Analisi basate su dati NGS



Whole Genome Sequencing (WGS)

Reads assembly

```
AGCTAGGGGATAATCGATGCTCTAAGTA
GCTAGGGGATAATCGATGCTCTAAGTAA
CTAGGGGATAATCGATGCTCTAAGTAAG
TAGGGGATAATCGATGCTCTAAGTAAGC
AGGGGATAATCGATGCTCTAAGTAAGCT
GGGATAATCGATGCTCTAAGTAAGCTT
GGATAATCGATGCTCTAAGTAAGCTTA
GATAATCGATGCTCTAAGTAAGCTTAA
ATAATCGATGCTCTAAGTAAGCTTAAT
TAATCGATGCTCTAAGTAAGCTTAATG
AATCGATGCTCTAAGTAAGCTTAATGC
ATCGATGCTCTAAGTAAGCTTAATGCA
TCGATGCTCTAAGTAAGCTTAATGCAT
CGATGCTCTAAGTAAGCTTAATGCATG
GATGCTCTAAGTAAGCTTAATGCATGG
ATGCTCTAAGTAAGCTTAATGCATGGA
TGCTCTAAGTAAGCTTAATGCATGGAA
AGCTAGGGGATAATCGATGCTCTAAGTAAGCTTAATGCATGGAA
```

CONSENSUS

Reads assembly

↓
Quality control of contigs

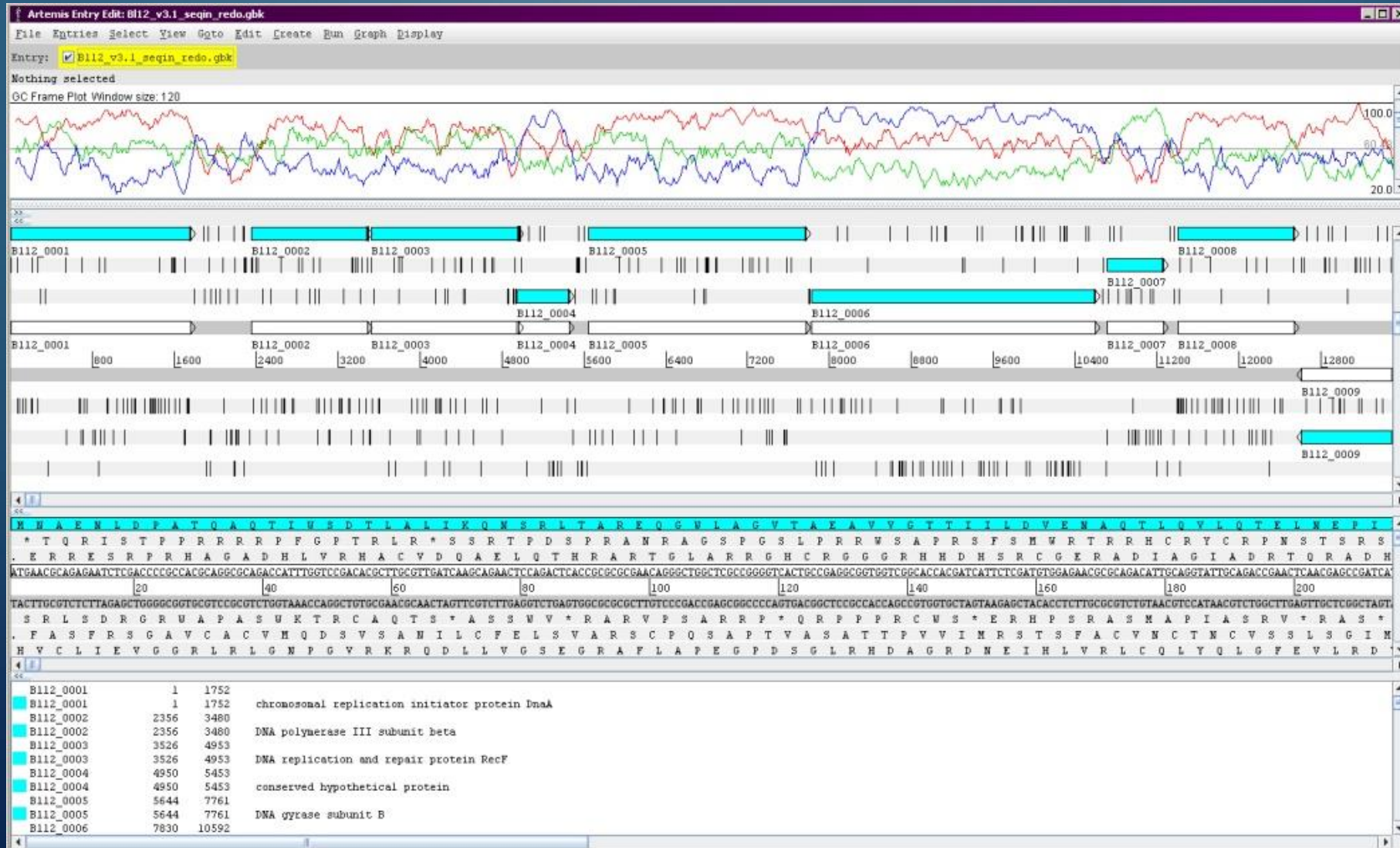
↓
Contigs reordering

↓
ORFs prediction

↓
Automatic annotation

↓
Quality control of annotation

Whole Genome Sequencing (WGS)



Antibiotic Resistance Databases

E' possibile predire quali geni sono coinvolti nell'antibiotico resistenza grazie all'utilizzo di specifici databases.

ARDB - Antibiotic Resistance Genes Database

HOME DOCUMENTATION BLAST ADVANCED SEARCH

Database Resistance Gene Input tetracycline Search Help Tutorial for ARDB

Choose Database Input Keyword

Nucleic Acids Research

Nucleic Acids Res. 2017 Jan 4; 45(Database issue): D566–D573.
Published online 2016 Oct 26. doi: [10.1093/nar/gkw1004](https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004)

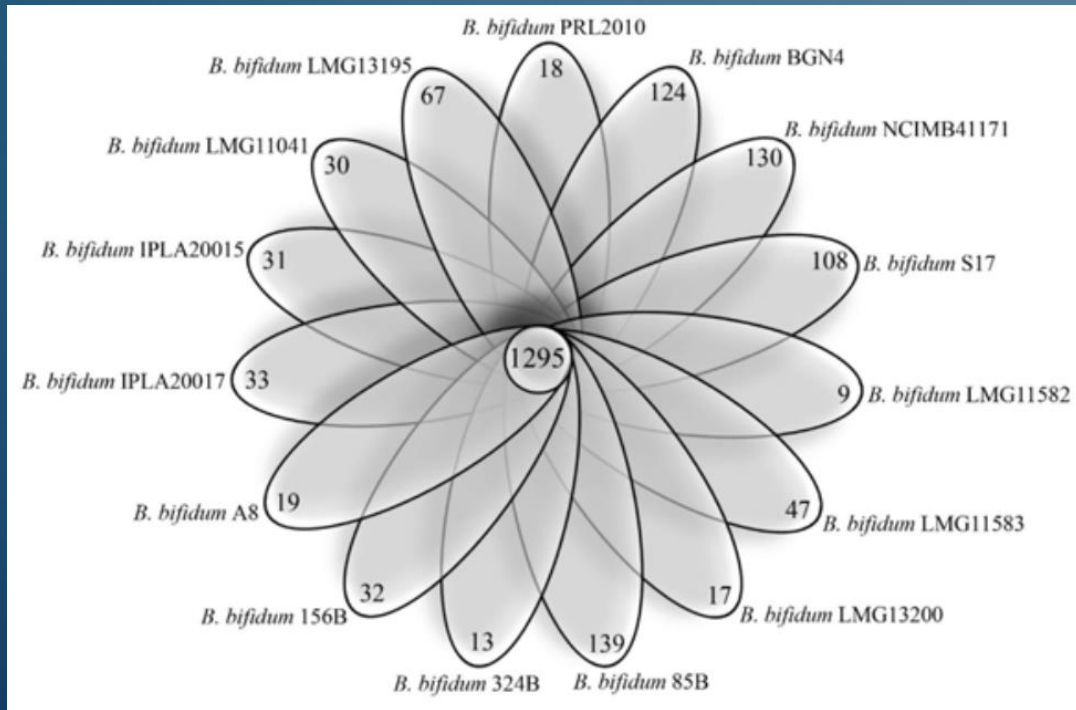
PMCID: PMC5210516
PMID: [27789705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27789705/)

CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database

Baofeng Jia,¹ Amogelang R. Raphenya,¹ Brian Alcock,¹ Nicholas Waglechner,¹ Peiyao Guo,¹ Kara K. Tsang,¹ Briony A. Lago,¹ Biren M. Dave,¹ Sheldon Pereira,¹ Arjun N. Sharma,¹ Sachin Doshi,¹ Mélanie Courtot,² Raymond Lo,² Laura E. Williams,³ Jonathan G. Frye,³ Tariq Elsayegh,⁴ Daim Sardar,¹ Erin L. Westman,¹ Andrew C. Pawlowski,¹ Timothy A. Johnson,¹ Fiona S.L. Brinkman,² Gerard D. Wright,¹ and Andrew G. McArthur^{1,*}

[Author information](#) ▶ [Article notes](#) ▶ [Copyright and License information](#) ▶ [Disclaimer](#)

Comparative Genomics



La Comparative Genomics permette di confrontare il contenuto genico di più isolati.

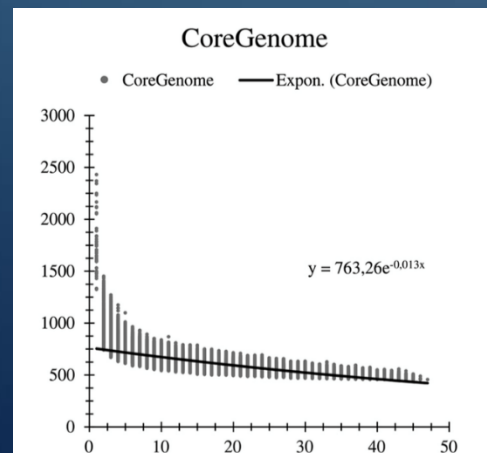
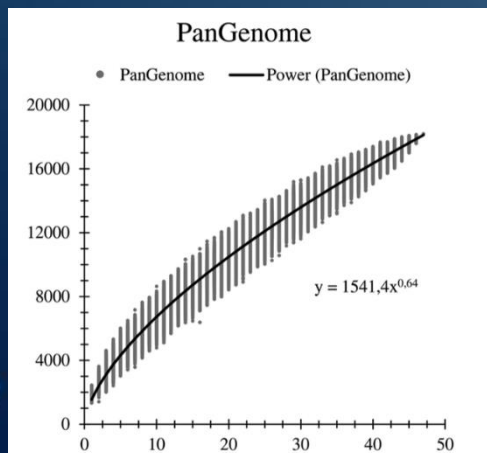
Rilevanti sono l'identificazione di:

- Geni unici dei ceppi analizzati, responsabili delle caratteristiche peculiari dei diversi ceppi.
- Core Genome, ovvero i geni condivisi tra tutti i genomi analizzati.
- SNPs all'interno di geni di interesse (ad esempio coinvolti nell'antibiotico resistenza).

L'allineamento di tutti i geni condivisi permette di costruire un Super Tree, ovvero un albero filogenetico derivato dall'allineamento di tutti i geni del core genoma concatenati.

Il Super Tree è un metodo di indagine filogenetica molto accurato.

Average Nucleotide Identity (ANI) value permette di confrontare genomi con accuratezza di 1 nt.



Applicazioni dell'approccio WGS

- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.

- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a metodiche di typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).

- Confronto con genomi presenti nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.

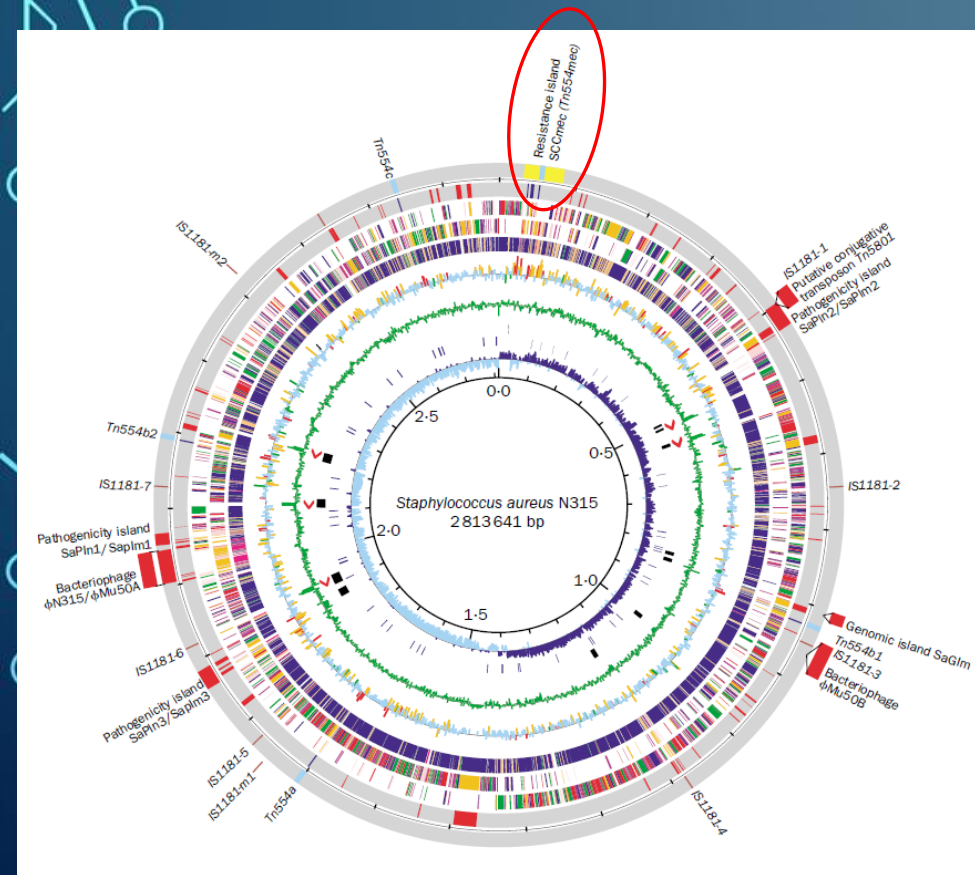
- Predirre l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.

- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili.

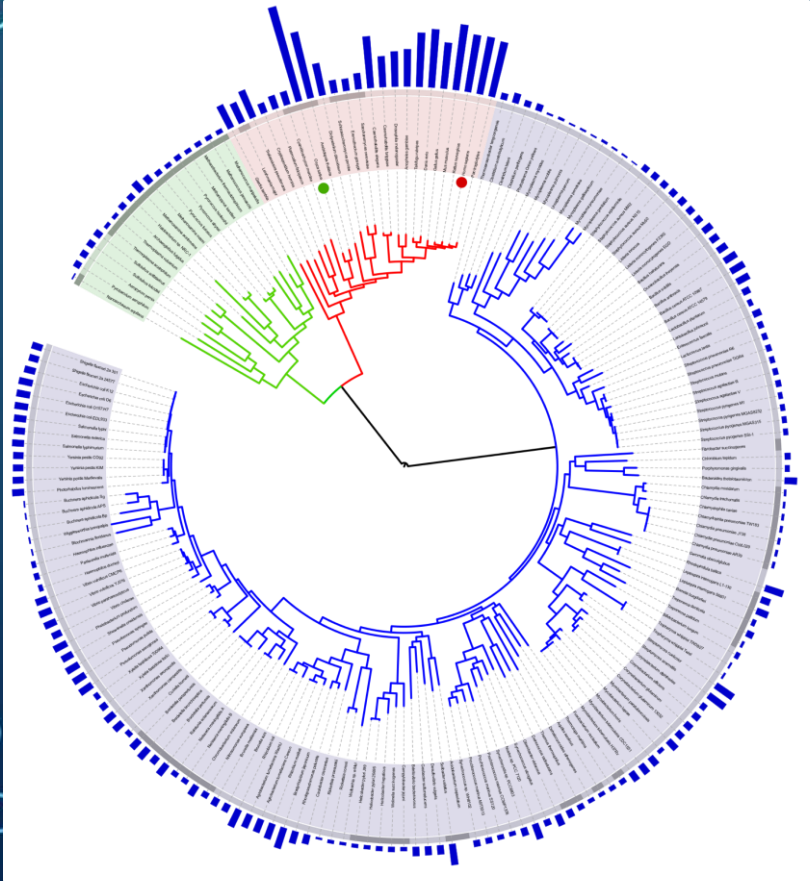
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.

- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.

- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.

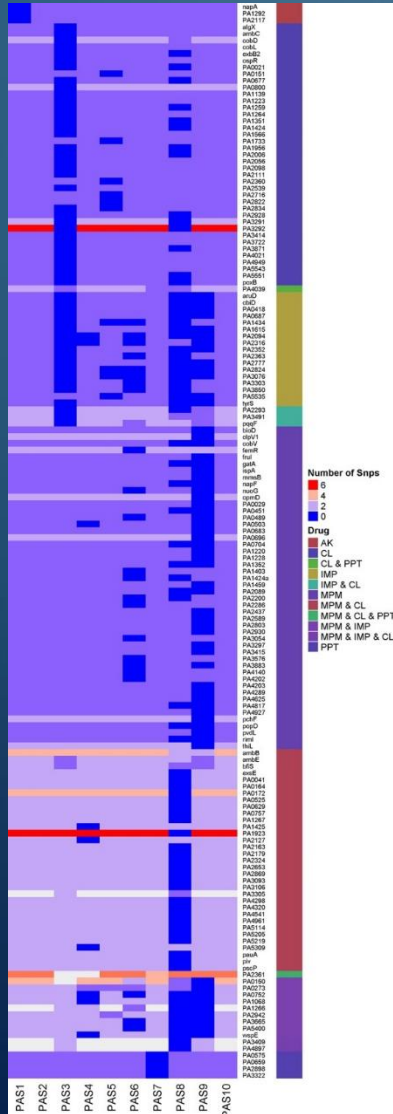


Applicazioni dell'approccio WGS



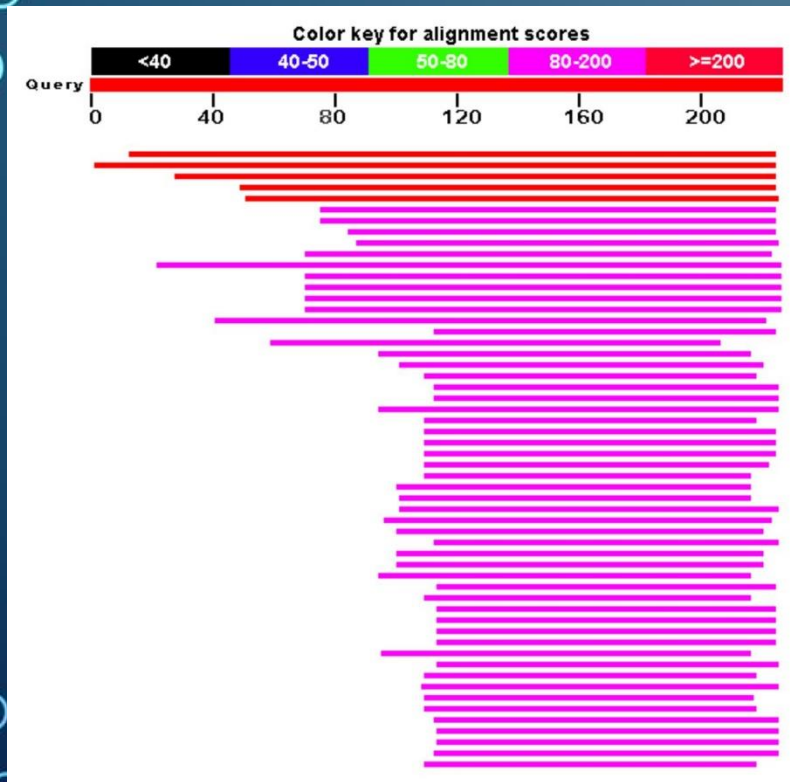
- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- **Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).**
- Confronto con genomi presenti nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.
- Predirre l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.
- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili.
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.
- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.
- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.

Applicazioni dell'approccio WGS



- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).
- **Confronto con genomi nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.**
- Predirre l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.
- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili.
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.
- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.
- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.

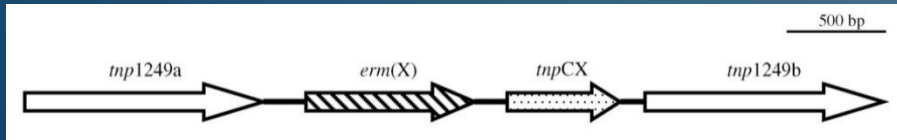
Applicazioni dell'approccio WGS



- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).
- Confronto con genomi nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.
- **Predire l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.**
- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili, quindi a rischio trasferimento orizzontale.
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.
- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.
- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.

Applicazioni dell'approccio WGS

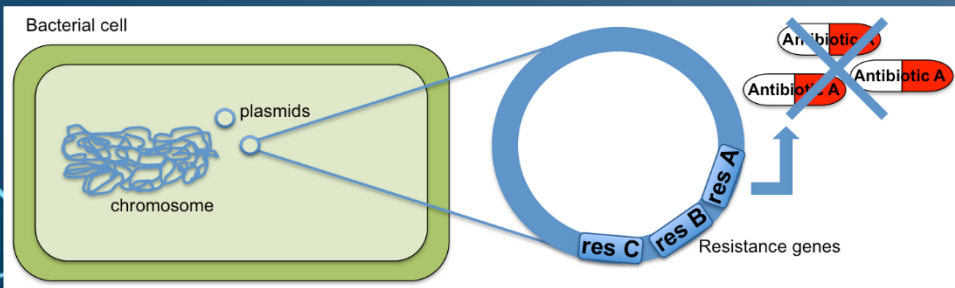
- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).



- Confronto con genomi nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.
- Predirre l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.
- **Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili, quindi a rischio trasferimento orizzontale.**
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.
- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.
- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.

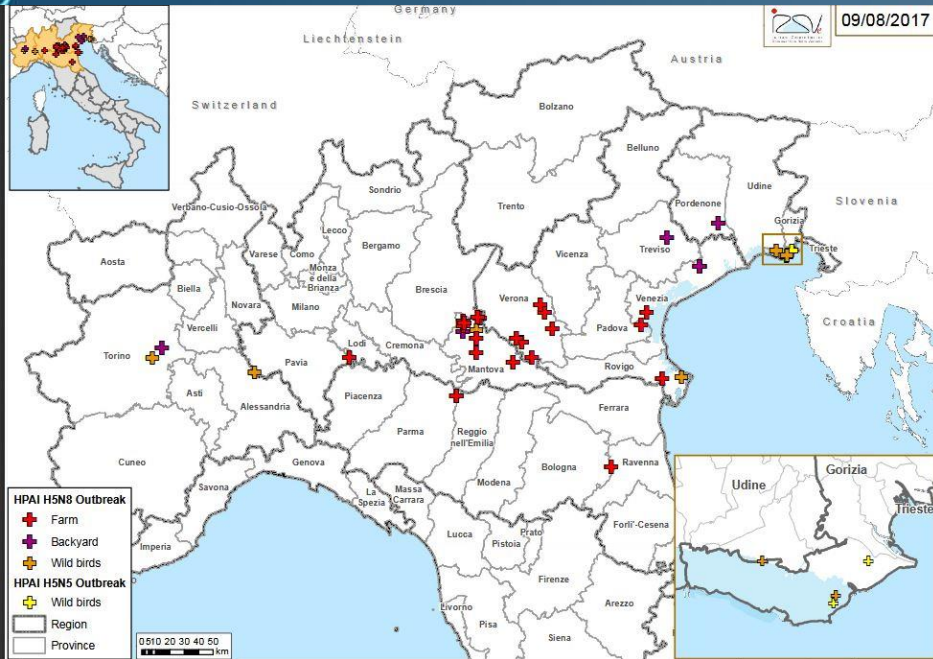
Applicazioni dell'approccio WGS

- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).
- Confronto con genomi nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.
- Predirre l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.
- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili, quindi a rischio trasferimento orizzontale.
- **Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.**
- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.
- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.



Applicazioni dell'approccio WGS

- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).
- Confronto con genomi nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.
- Predire l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.
- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili, quindi a rischio trasferimento orizzontale.
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.
- **Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.**
- Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.



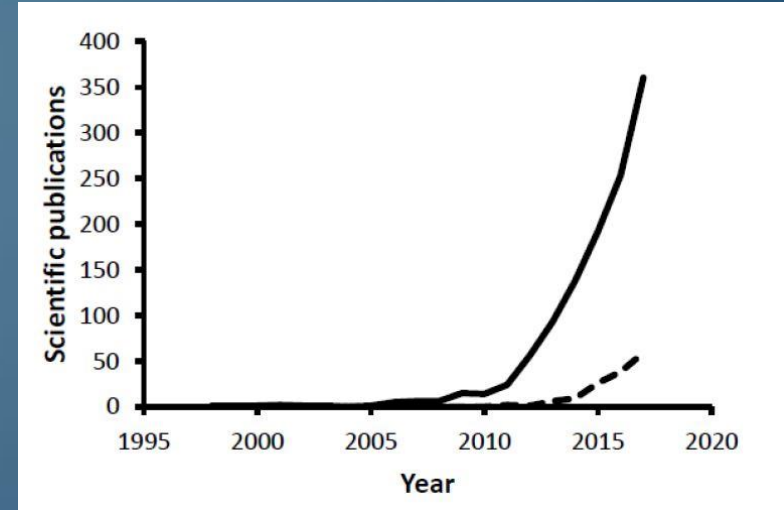
Applicazioni dell'approccio WGS



- Identificazione dei geni responsabili dell'antibiotico resistenza nel ceppo analizzato.
- Possibilità di tracciare il ceppo in esame con maggiore accuratezza rispetto a typing tradizionali come multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA), pulsed field gel electrophoresis (PFGE), random amplified polymorphic DNA (RAPD), multiple-locus variable number tandem repeat (VNTR) and multilocus sequence typing (MLST).
- Confronto con genomi nei database per identificare nuove varianti di geni dell'antibiotico resistenza, correlabili con fenotipi di interesse.
- Predirre l'origine tassonomica di geni dell'antibiotico resistenza, mediante confronti con DB.
- Identificazione di geni responsabili di antibiotico resistenza nei pressi di elementi mobili, quindi a rischio trasferimento orizzontale.
- Identificazione di Plasmidi codificanti antibiotico resistenza.
- Valutazione della distribuzione territoriale di un ceppo in esame, se disponibili isolati da siti diversi.
- **Valutazione dell'origine e diffusione di ceppi responsabili di outbreak/epidemie, se disponibili isolati da siti diversi a tempi diversi.**

Applicazioni dell'approccio WGS

Il numero di pubblicazioni che fanno uso di WGS per l'analisi dell'antibiotico resistenza sono in forte aumento.



NARMS
National Antimicrobial Resistance Monitoring System

Si focalizza su quattro foodborne bacteria: *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, and *Enterococcus*.

NARMS is a collaborative program of state and local public health departments and universities, the FDA, the Centers for Disease Control and Prevention ([CDC](#)), and the U.S. Department of Agriculture ([USDA](#)). This national public health surveillance system tracks changes in the antimicrobial susceptibility of enteric (intestinal) bacteria found in ill people (CDC), retail meats (FDA), and food animals (USDA) in the United States.

Corrispondenza tra dati *in silico* e *in vitro*

Geni e mutazioni cromosomali responsabili per resistenza fenotipica sono stati ricercati in dati WGS di **3,491 non-typhoidal *Salmonella enterica*** ricevuti dal Public Health England's Gastrointestinal Bacteria Reference Unit tra Aprile 2014 e Marzo 2015.

La predizione bioinformatica è stata confrontata con i dati fenotipici ottenuti in laboratorio.

Discrepanze nella predizione di resistenza ad uno o più antibiotici è stata osservata solo in 76 isolati (2.18%).

Antimicrobial	Phenotype: susceptible		Phenotype: resistant		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Genotype: resistant	Genotype: susceptible	Genotype: resistant	Genotype: susceptible		
Ampicillin	1	2742	747	1	99.87	99.96
Temocillin	0	3490	0	1	0	100
Cefoxitin	0	3471	19	1	95.0	100
Cefotaxime	0	3434	57	0	100	100
Ceftazidime	0	3444	47	0	100	100
Cefpirome	0	3444	47	0	100	100
Ertapenem	0	3481	10	0	100	100
Chloramphenicol	4	3284	201	2	99.01	99.88
Gentamicin	1	3351	138	1	99.28	99.97
Streptomycin	51	2821	613	8	98.71	98.22
Tobramycin	2	3392	97	0	100	99.94
Sulphonamides	2	2661	828	0	100	99.92
Tetracycline	6	2568	917	0	100	99.77
Trimethoprim	1	3185	301	4	98.69	99.97
Ciprofloxacin	1	3352	137	1	99.28	99.97

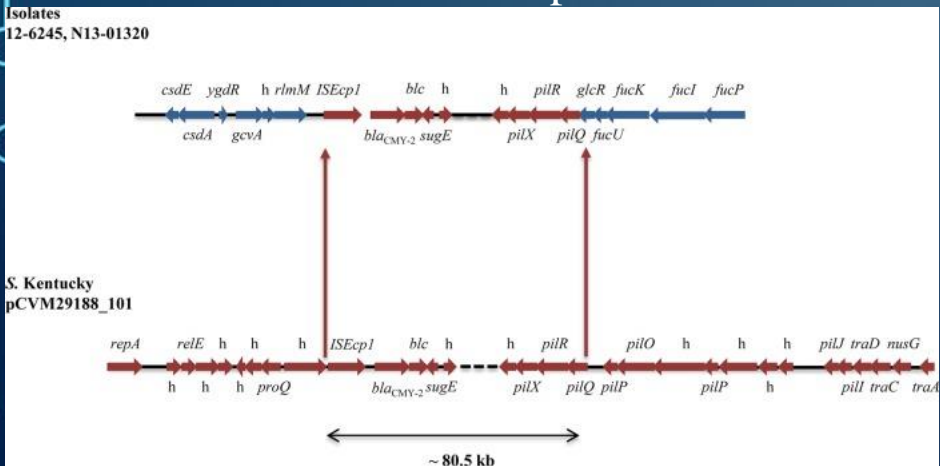
Neuert et al., Front Microbiol., 2018

Genotypic relatedness and antimicrobial resistance of *Salmonella* Heidelberg isolated from chickens and turkeys in the midwestern United States.

Caratterizzazione fenotipica ed analisi genomica di **113 isolati di *S. enterica* serovar Heidelberg resistenti e non a cefoxitina** ottenuti in Québec nel 2012 da carne di pollame in commercio (44), pollame ucciso al mattatoio (18) e persone (51). Questi isolate sono stati raccolti come parte del **Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS)**.

Isolati con 0-4 SNPs

Plasmide coinvolto in Ampicillin resistance



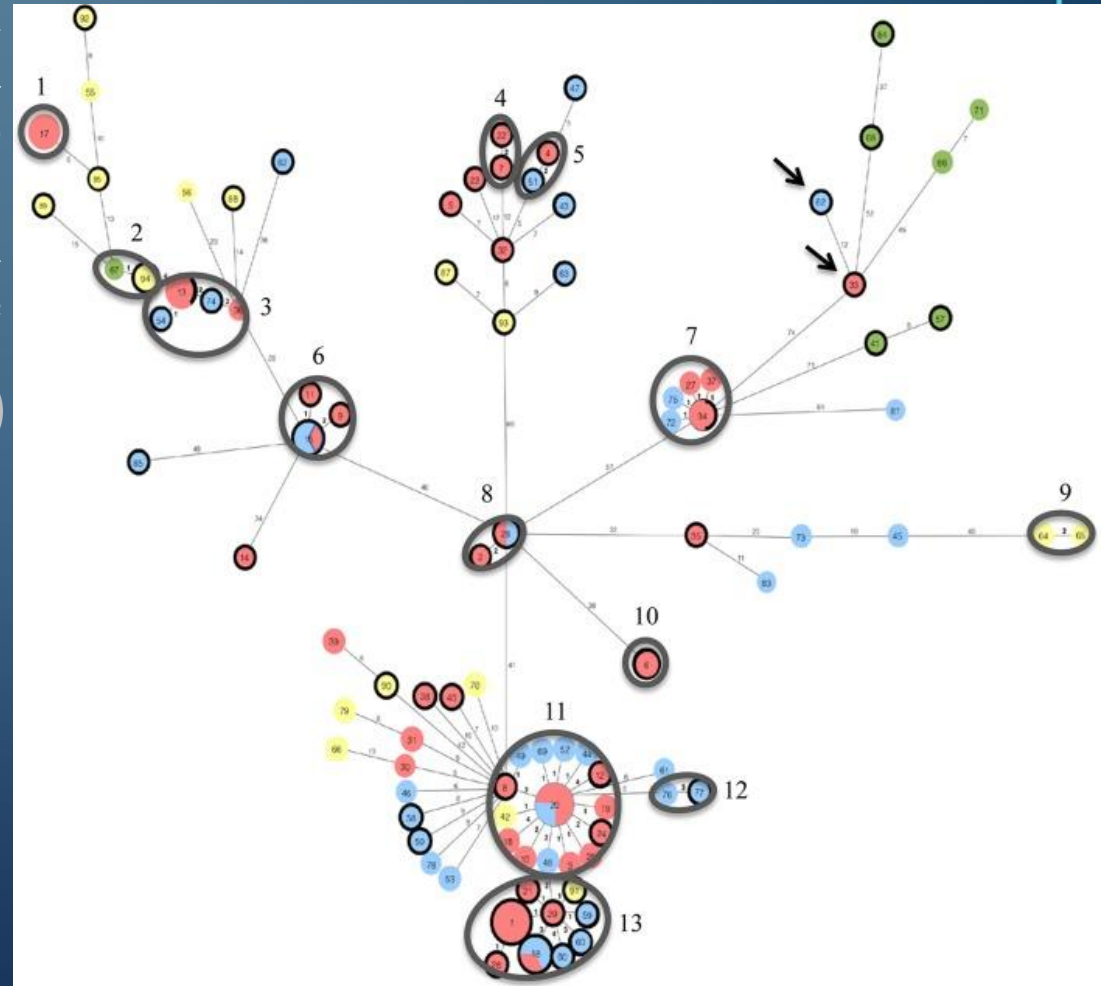
Carne di tacchino

Carne di pollo

Human

Polli al mattatoio

Core-genome phylogenetic tree

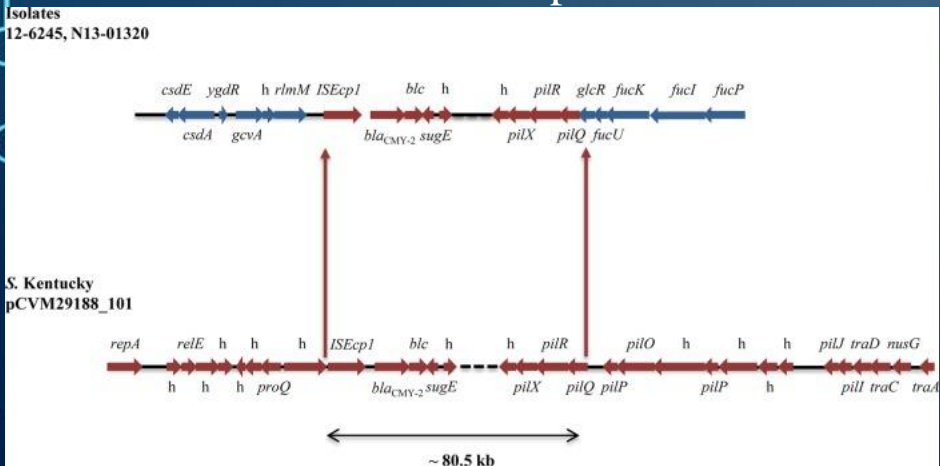


Esempio 2: Edirmanasinghe et al., Antimicrob Agents Chemother. 2017

Caratterizzazione fenotipica ed analisi genomica di **113 isolati di *S. enterica* serovar Heidelberg** resistenti e non a cefoxitina ottenuti in Québec nel 2012 da carne di pollame in commercio (44), pollame ucciso al mattatoio (18) e persone (51). Questi isolate sono stati raccolti come parte del **Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS)**.

Isolati con 0-4 SNPs

Plasmide coinvolto in Ampicillin resistance



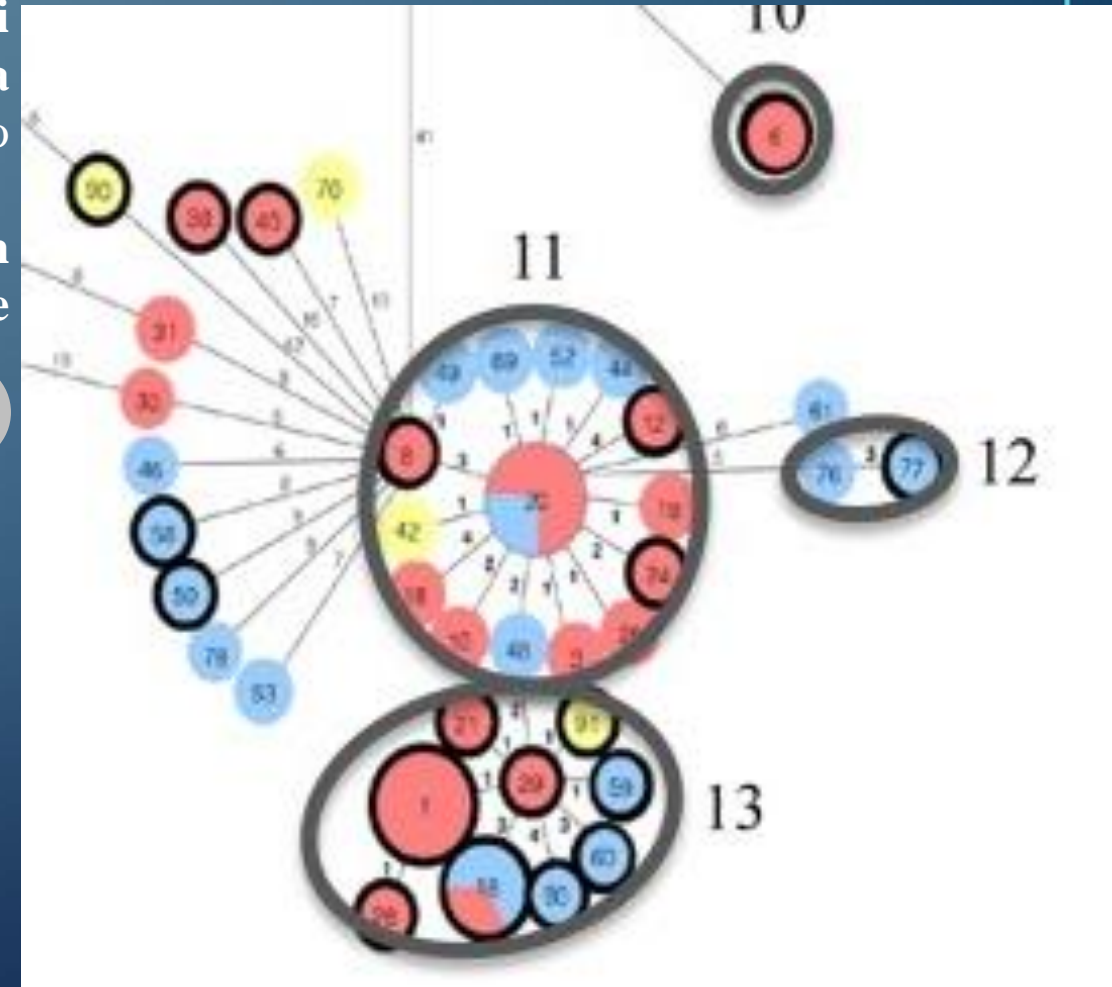
Carne di tacchino

Carne di pollo

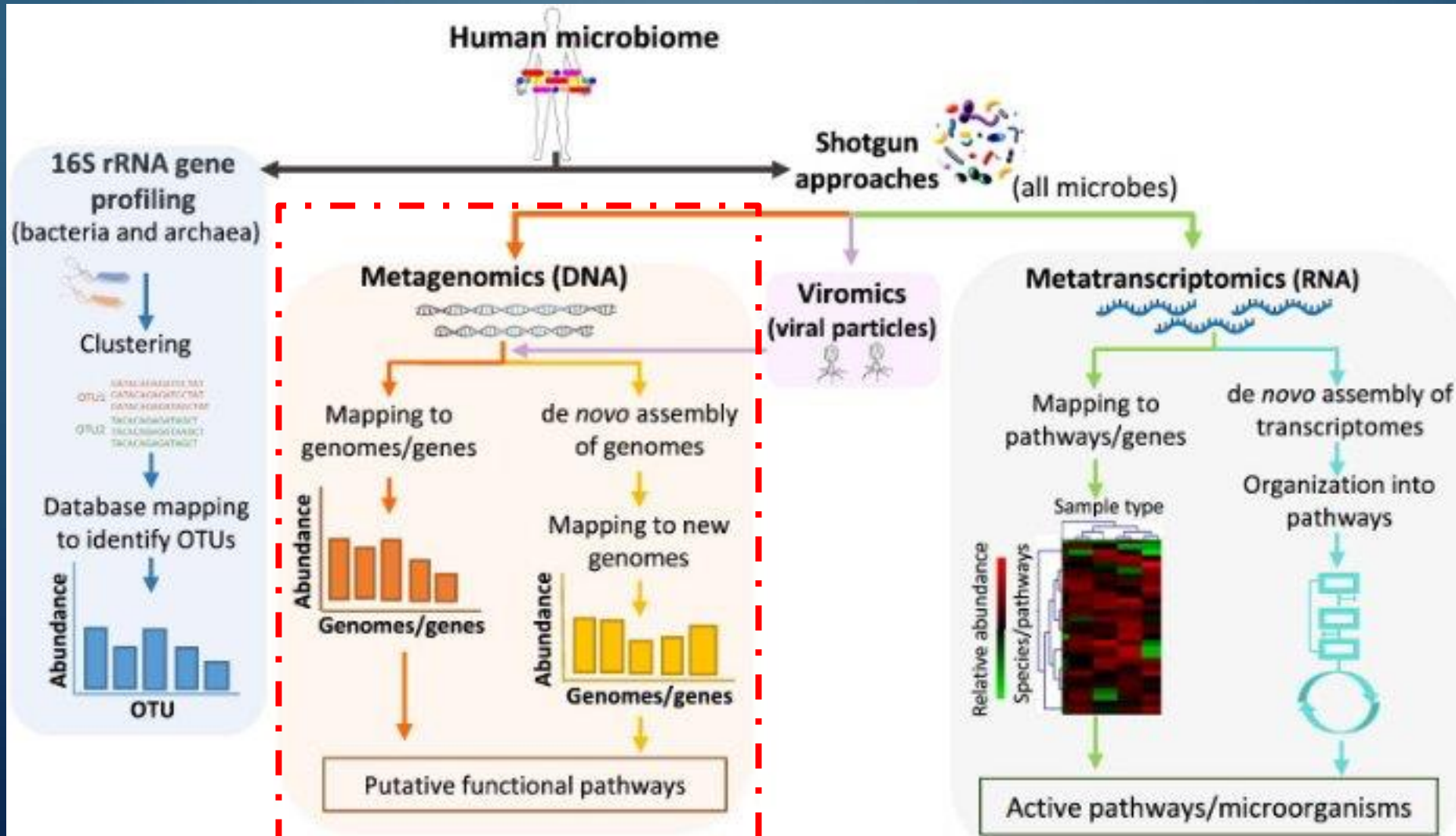
Human

Polli al mattatoio

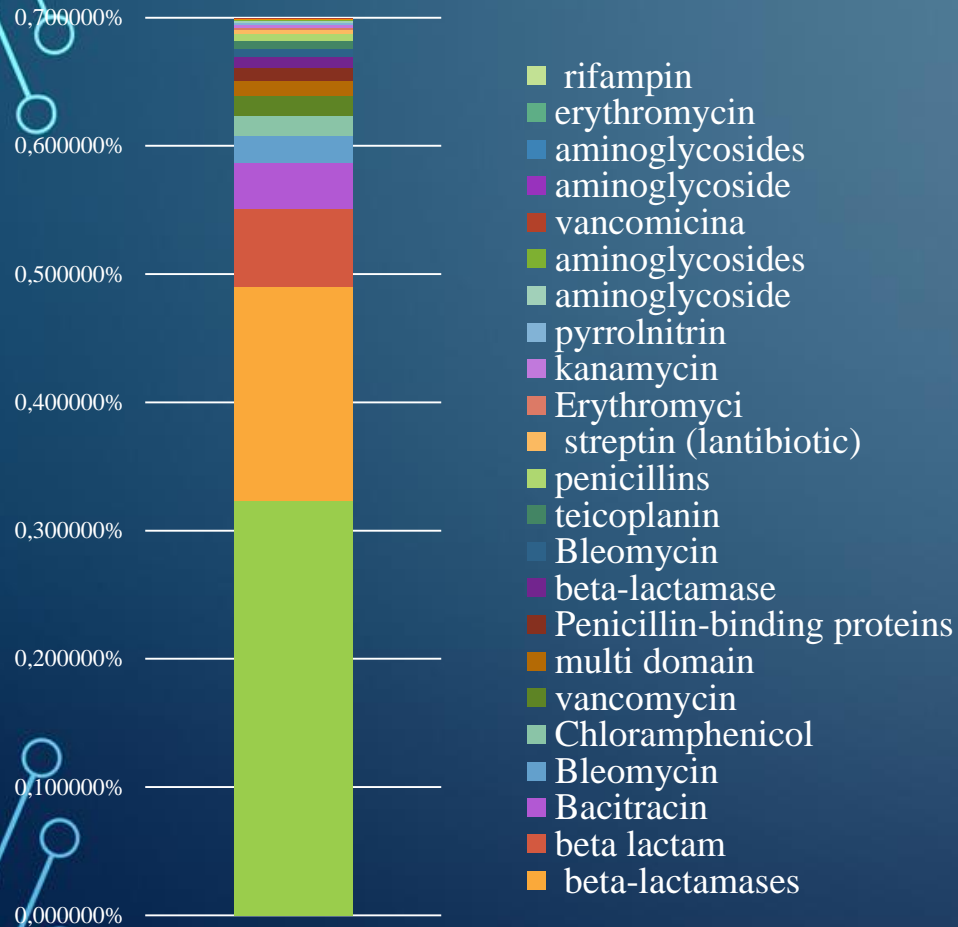
Core-genome phylogenetic tree



WMS: Whole Metagenomic Sequencing



Applicazioni dell'approccio WMS



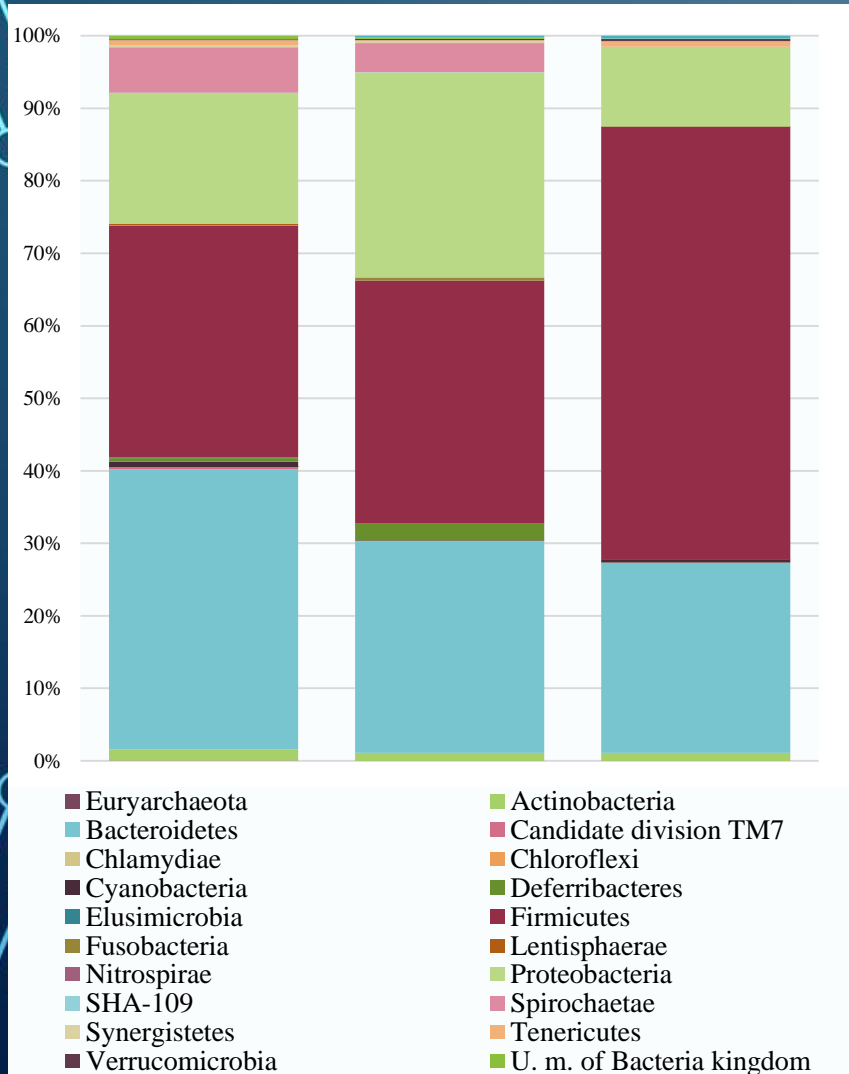
-Effettuare una valutazione qualitativa e quantitativa di tutti i geni coinvolti in antibiotico resistenza costutuenti il microbioma analizzato.

-Ricostruire il profilo tassonomico dei batteri codificanti uno o piu geni di interesse responsabili di resistenza rispetto ad una classe di antibiotici di interesse.

-Effettuare studi epidemiologici, ad esempio monitorare nel tempo l'impatto dell'uso di antibiotici sia sul profilo tassonomico del microbiota che sul profilo funzionale relativo ai geni coinvolti nell'antibiotico resistenza.

-Tracciare la presenza di specifici ceppi batterici di interesse.

Applicazioni dell'approccio WMS



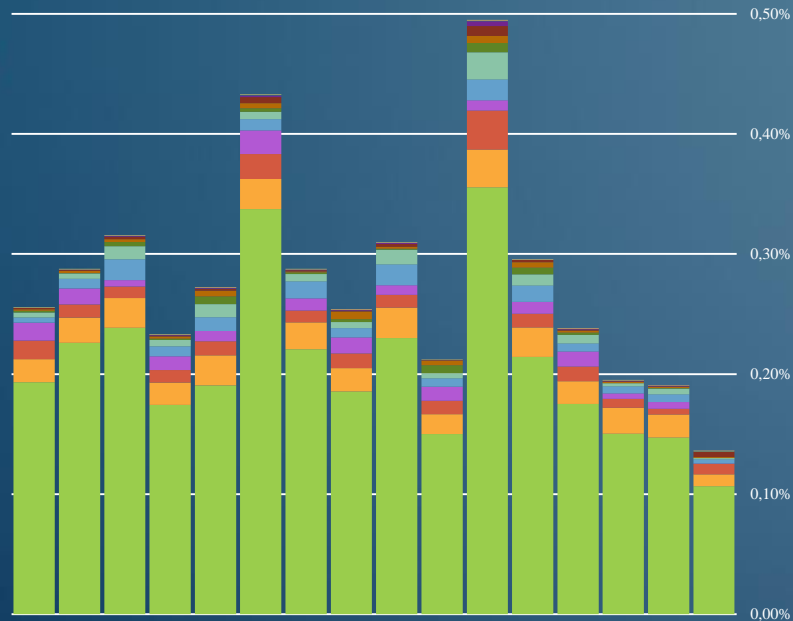
-Effettuare una valutazione qualitativa e quantitativa di tutti i geni coinvolti in antibiotico resistenza costutuenti il microbioma analizzato.

-Ricostruire il profilo tassonomico dei batteri codificanti uno o piu geni di interesse responsabili di resistenza rispetto ad una classe di antibiotici di interesse.

-Effettuare studi epidemiologici, ad esempio monitorare nel tempo l'impatto dell'uso di antibiotici sia sul profilo tassonomico del microbiota che sul profilo funzionale relativo ai geni coinvolti nell'antibiotico resistenza.

-Tracciare la presenza di specifici ceppi batterici di interesse.

Applicazioni dell'approccio WMS



- Bacteriocin resistance protein
- Rifampin resistance protein
- Pyrrolnitrin resistance protein
- Acetyltransferase resistance protein
- Small Multidrug Resistance
- Lantibiotic resistance protein
- Peptide antibiotics resistance protein
- Aminoglycosides resistance protein
- Erythromycin resistance protein
- Teicoplanin resistance protein
- Vancomycin resistance protein
- Chloramphenicol acetyltransferase
- Bleomycin resistance protein
- Bacitracin resistance protein
- Beta-lactamases

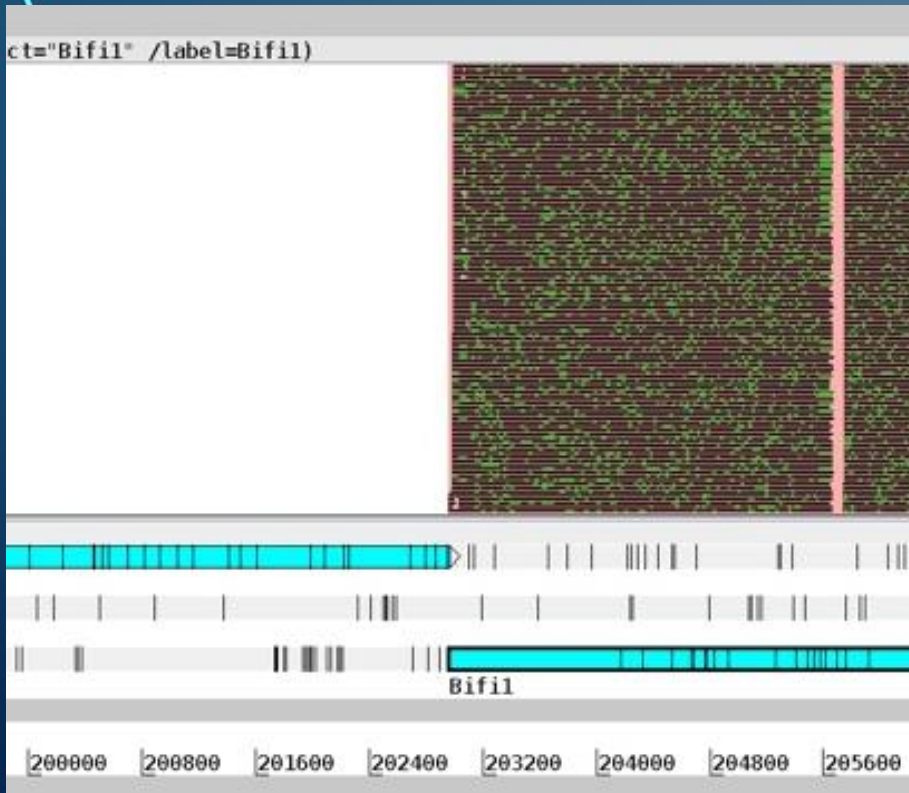
-Effettuare una valutazione qualitativa e quantitativa di tutti i geni coinvolti in antibiotico resistenza costutuenti il microbioma analizzato.

-Ricostruire il profilo tassonomico dei batteri codificanti uno o piu geni di interesse responsabili di resistenza rispetto ad una classe di antibiotici di interesse.

-Effettuare studi epidemiologici, ad esempio monitorare nel tempo l'impatto dell'uso di antibiotici sia sul profilo tassonomico del microbiota che sul profilo funzionale relativo ai geni coinvolti nell'antibiotico resistenza.

-Tracciare la presenza di specifici ceppi batterici di interesse.

Applicazioni dell'approccio WMS



-Effettuare una valutazione qualitativa e quantitativa di tutti i geni coinvolti in antibiotico resistenza costutuenti il microbioma analizzato.

-Ricostruire il profilo tassonomico dei batteri codificanti uno o piu geni di interesse responsabili di resistenza rispetto ad una classe di antibiotici di interesse.

-Effettuare studi epidemiologici, ad esempio monitorare nel tempo l'impatto dell'uso di antibiotici sia sul profilo tassonomico del microbiota che sul profilo funzionale relativo ai geni coinvolti nell'antibiotico resistenza.

-Tracciare la presenza di specifici ceppi batterici di interesse.

Ricostruzione del microbioma del pollo: caratterizzazione funzionale e resistoma



**Broiler chicken
(BC)**

N° sample: **49**

Feeding: cereals (wheat, corn), protein flour (soy, sunflower), vegetable oils (soy), mineral

Antibiotics: amoxicillin, colistin

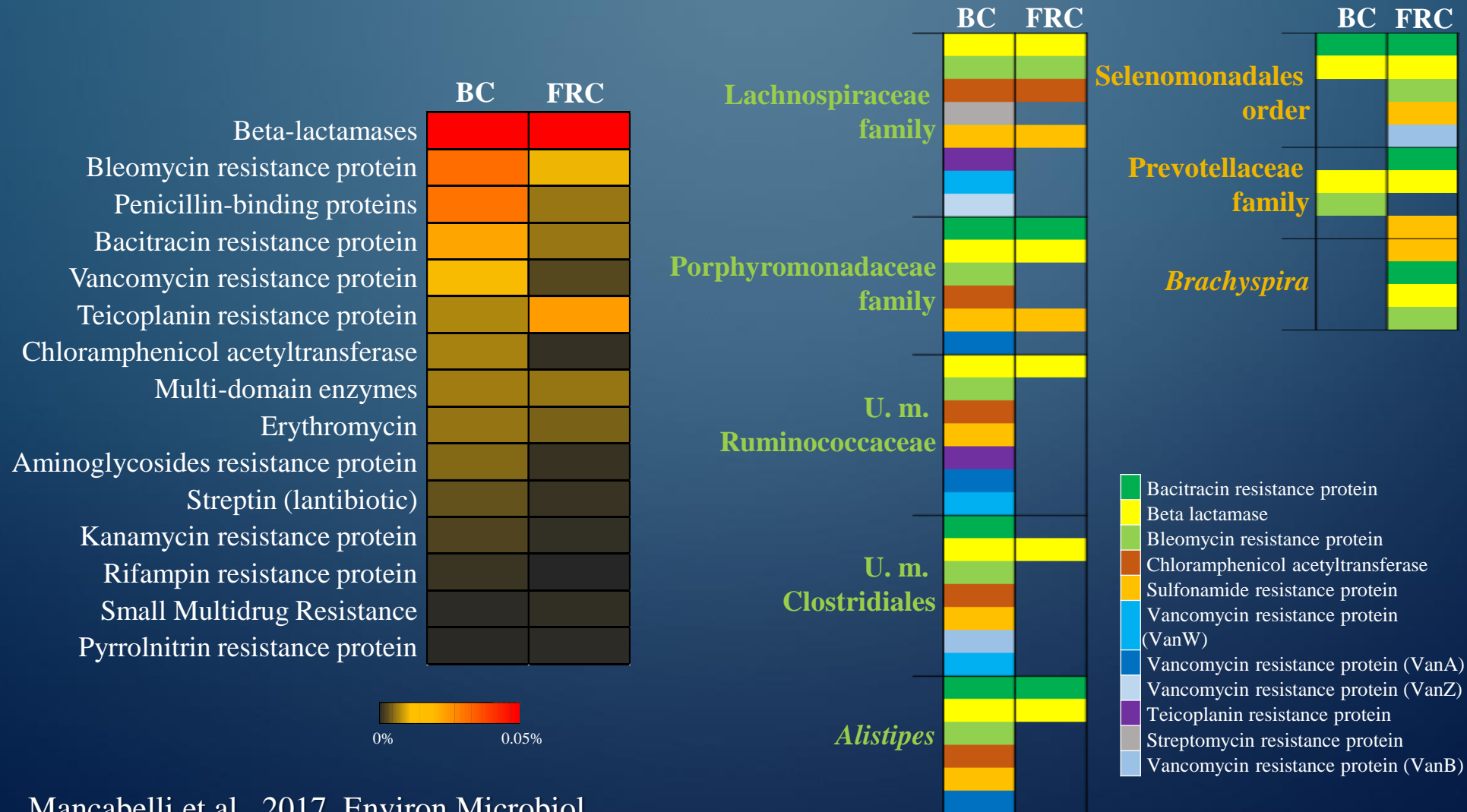
**Free-Range chicken
(FRC)**

N° sample: **35**

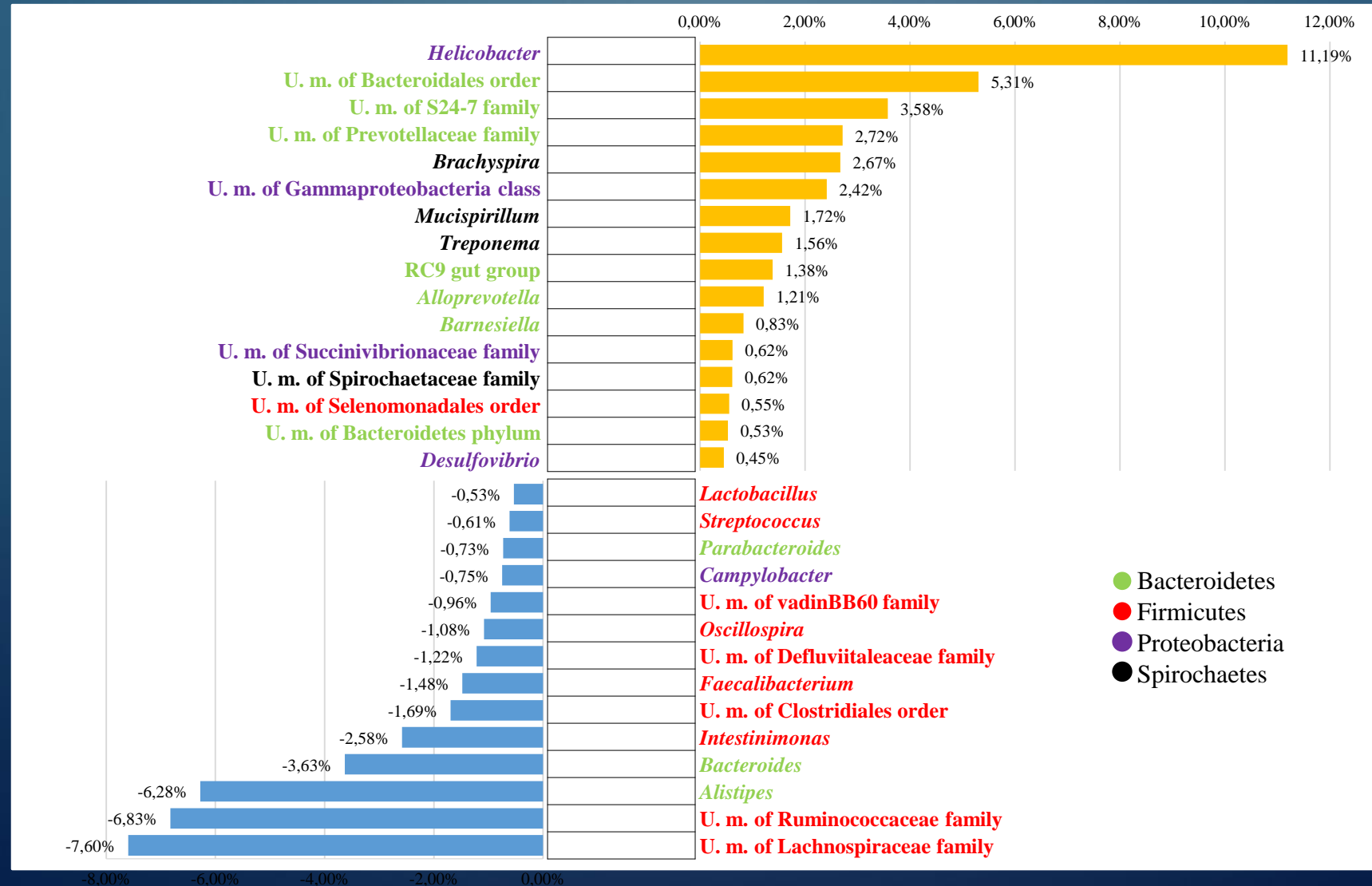
Feeding: barley, wheat, wheat crushed and wet waste



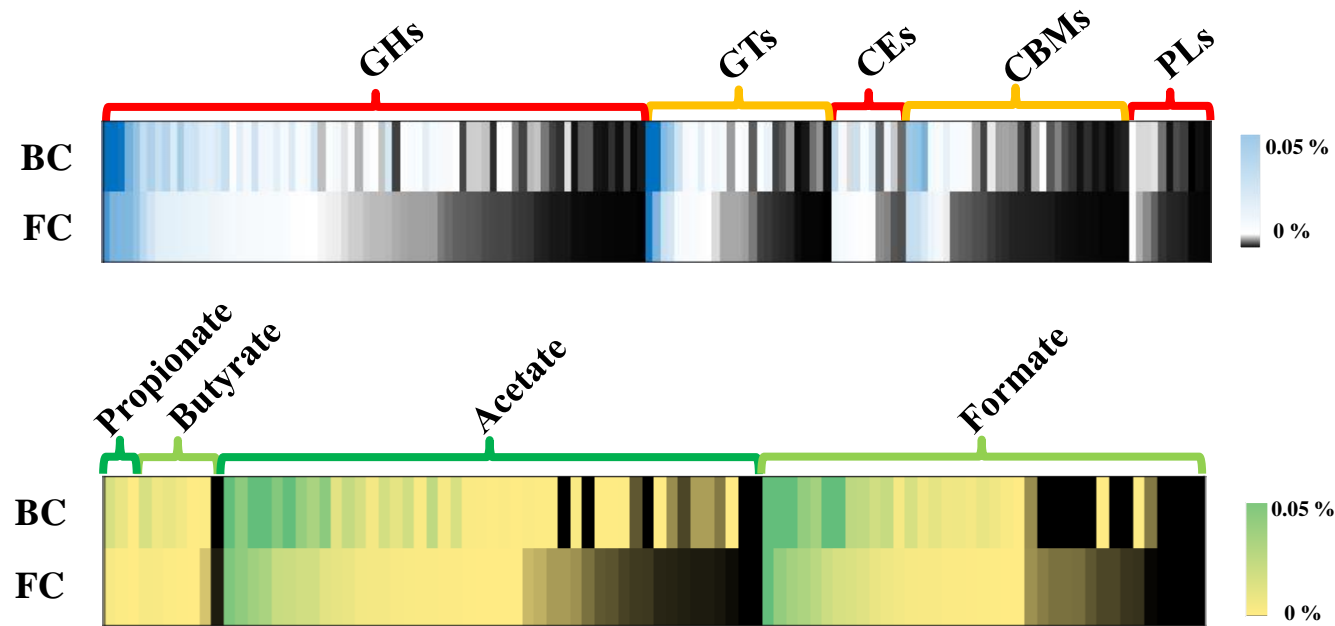
Ricostruzione del microbioma del pollo: caratterizzazione funzionale e resistoma



Ricostruzione del microbioma del pollo: caratterizzazione funzionale e resistoma



Ricostruzione del microbioma del pollo: caratterizzazione funzionale e resistoma



Conclusioni

- L'utilizzo di approcci bioinformatici per lo studio dell'antibiotico resistenza è sempre più diffuso in ambito veterinario
- Le analisi genomiche di dati ottenuti mediante WGS permettono di ottenere numerose informazioni riguardanti i geni coinvolti in antibiotico resistenza e il rischio di un loro trasferimento.
- La genomica comparativa permette di effettuare typing più accurati rispetto alle metodiche classiche e di valutare la diffusione sul territorio e l'evoluzione nel tempo (SNPs) di geni coinvolti nell'antibiotico resistenza.
- La metagenomica rende possibile una valutazione completa del patrimonio genetico di una intera popolazione batterica (microbioma), permettendo di valutare l'abbondanza di geni per l'antibiotico resistenza e risalire a quali taxa batterici codificano specifici geni di interesse.
- I costi sempre minori dei sequenziamenti WGS e WMS rendono quindi questi approcci di grande interesse per lo screening dell'antibiotico resistenza in ambito veterinario.



Thanks



Prof. Rodolphe Barrangou



Prof. D. Van Sinderen



Dott. A. Margolles



Dott. M. Gueimonde