

“Impulsando el interés y desarrollo de la ciencia, tecnología, innovación y calidad en Paraguay”

## FINANCIAMIENTO DE BECAS DE INVESTIGACIÓN (SEGUNDA CONVOCATORIA)

Caracterización genotípica de aislamientos de *Vibrio cholerae* provenientes de brotes de diarrea y muestras de agua de zonas aledañas al brote en el Chaco Paraguayo, mediante técnicas de secuenciación masiva

Centro Nacional de Genómica y Bioinformática del ANLIS – “Dr. Carlos G. Malbrán”, Argentina

Laboratorio Central de Salud Pública, Paraguay

Gladys Melisa Florentin Candia– meliflorent92@gmail.com

## RESUMEN

Los brotes de cólera, asociados tanto a cepas de linaje pandémico como no pandémico del *Vibrio cholerae*, suelen ocurrir de manera esporádica en zonas con dificultades en el saneamiento, en comunidades hacinadas que carecen de acceso adecuado a agua potable, alcantarillado o higiene (1). A pesar de que en Paraguay no se han presentado casos de cólera desde el año 2009, existe el riesgo latente de reintroducción del cólera epidémico debido al intenso flujo de viajeros, especialmente de aquellos procedentes de países endémicos o con brotes activos en la región, dado que el patógeno es capaz de transmitirse de persona a persona (2). Por lo tanto, es de vital importancia reconocer la presencia de clones locales que podrían estar causando casos o brotes, definir su rol en el ambiente y su capacidad de diseminación, a fin de estar preparados para identificar rápidamente los casos y establecer medidas de control. Actualmente la falta de conocimiento de las características genéticas de *Vibrio cholerae*, tanto en muestras ambientales como en casos clínicos, así como de la determinación de los linajes circulantes, los factores de virulencia, los mecanismos de resistencia acompañantes, así como la relación genética de estos aislamientos, constituyen la principal problemática del tema. Por esta razón, es sumamente importante el fortalecimiento contante de las capacidades de los profesionales a cargo de la vigilancia de *Vibrio cholerae* en nuestro país, mediante el intercambio de conocimientos con Instituciones de Referencia en Genómica, como ser el ANLIS-Malbrán. Que ayuden a la implementación de técnicas altamente especializadas de secuenciación genética, con el fin de definir el flujo de trabajo de la vigilancia genética de este microorganismo en Instituciones de referencia, como el Laboratorio Central de Salud Pública. De este modo hacer frente a esta amenaza de salud pública.

### OBJETIVOS

#### Objetivos principales

Caracterizar genotípicamente aislamientos de *Vibrio cholerae* provenientes de brotes de diarrea y muestras de agua de zonas aledañas al brote en el Chaco Paraguayo, mediante técnicas de secuenciación masiva.

#### Objetivos específicos

- Secuenciar aislados de *Vibrio cholerae* provenientes de brotes de diarrea y muestras de agua de zonas aledañas al brote en el Chaco Paraguayo, mediante técnicas de NGS.
- Caracterizar los aislados de *Vibrio cholerae* por linajes pandémicos o no pandémicos, mediante análisis filogenéticos y comparación con la base de datos regionales.
- Generar el flujo de trabajo de análisis genómico para conocer los linajes y potencial patogénico del *V. cholerae* provenientes de Paraguay, a través del intercambio de conocimiento adquirido en la capacitación del personal en la Institución de referencia, como ser el Centro de Genómica y Bioinformática del ANLIS-Malbrán
- Mejorar las estrategias de vigilancia genómica de cepas de *V. cholerae* en Paraguay, mediante entrenamiento del profesional del LCSP en el centro de referencia en Genómica del Instituto Malbrán.

### ACTIVIDADES REALIZADAS

- Entrenamiento en técnicas de secuenciación NGS para análisis de aislados de *Vibrio cholerae*
- Extracción de ADN del 100% aislados de *Vibrio cholerae* y Preparación de las librerías de cada muestra de ADN para su secuenciación en NGS.
- Secuenciación del 100% de las muestras en NGS.
- Análisis bioinformático de los datos de secuenciación de *Vibrio cholerae*
- Se recopiló información genómica de más de 300 aislados de *Vibrio cholerae* de diferentes regiones para la preparación de una base de datos.
- Se realizó el análisis filogenético del 100% los aislados y se clasificó los aislados en linajes pandémicos o no pandémicos, mediante la comparación de los mismos con la base de datos, mediante el empleo de los métodos bioinformáticos aprendidos durante la capacitación.
- Determinación de factores de virulencia y resistencia
- Establecimiento de un flujo de trabajo para el análisis genómico de futuras muestras de *V. cholerae* en Paraguay.

### RESULTADOS OBTENIDOS

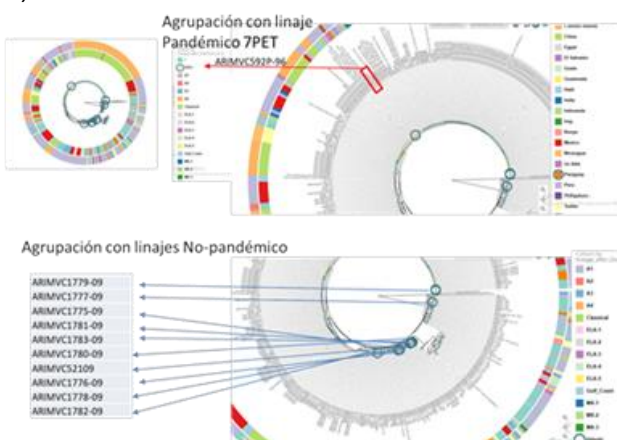
En la **tabla1**, se detallan los códigos ID, de las 11 muestras de *Vibrio cholerae* analizadas, con los datos de calidad de la secuenciación (total de lectura, profundidad, contenido en porcentaje de GC, total de bases) y los datos de calidad del genoma ensamblado realizado por Quast. Los resultados fueron óptimos según los estándares de calidad.

Tabla 1. Datos obtenidos después del análisis bioinformático de las secuencias de las muestras de *Vibrio cholerae*.

ID	secuencias crudas				secuencias trimasadas						
	Total length	Profundidad	%GC	Total Bases	Total length	Profundidad	%GC	Total Bases			
ARIMVC592P-96_1	421055	53	47	35.4	45.1	421050	53	47	34.9	44.05	
ARIMVC592P-96_2	421055	53	47	35.4	45.1	421050	53	47	34.9	44.05	
ARIMVC1775-09_1	552434	64	47	113.5	45.75	519205	64	47	102.9	45.4	
ARIMVC1775-09_2	552434	64	47	113.5	45.75	519205	64	47	102.9	45.4	
ARIMVC1775-09_3	118317	139	47	235.8	50.15	1102978	139	47	234.5	50.375	
ARIMVC1775-09_4	118317	139	47	235.8	50.15	1102978	139	47	234.5	50.375	
ARIMVC1775-09_5	419288	60	47	105.1	44.2	475279	59	47	104.5	43.825	
ARIMVC1775-09_6	419288	60	47	105.1	44.2	475279	59	47	104.5	43.825	
ARIMVC1775-09_7	419288	60	47	105.1	44.2	475279	59	47	104.5	43.825	
ARIMVC1775-09_8	554205	63	46	110.4	50.5	552324	63	46	107.6	50.025	
ARIMVC1775-09_9	554205	63	46	110.4	50.5	552324	63	46	107.6	50.025	
ARIMVC1775-09_10	652031	87	47	141.8	60.3	630225	86	46	140.8	60.3	
ARIMVC1775-09_11	652031	87	46	141.8	60.3	630225	86	46	140.4	60.3	
ARIMVC1780-09_1	546526	68	46	117.2	43.725	544334	68	46	116.3	43.225	
ARIMVC1780-09_2	546526	68	46	117.2	43.725	544334	68	46	116.3	43.225	
ARIMVC1780-09_3	803129	100	47	166.8	72.125	800459	100	47	165.7	71.475	
ARIMVC1780-09_4	803129	100	46	127.7	72.125	800459	100	46	126.2	71.475	
ARIMVC1780-09_5	459163	57	46	88.2	43.775	455329	57	47	86.1	43.35	
ARIMVC1780-09_6	459163	57	46	88.2	43.775	455329	57	46	87.3	43.35	
ARIMVC1780-09_7	143190	18	47	33.3	52.775	142270	17	78.375	47	33	52.6
ARIMVC1780-09_8	143190	18	46	17.8	52.775	142270	17	78.375	46	17.4	52.6
ARIMVC1780-09_9	295817	36	47	67	27.325	294890	35	58.625	47	66.6	27.1
ARIMVC1780-09_10	295817	36	47	67	27.325	294890	35	58.625	47	66.6	27.1

Genome Name	Genome Length	No. Contigs	Smallest Contig	Largest Contig	Average Contig Len (bp)	Non-ATGC	%GC Content	
ARIMVC1775-09	75	379	78484	32687	32835	339	47.3	
ARIMVC1775-09	113	506	418277	3682	15839	306	47.4	
ARIMVC1775-09	409175	103	512	63824	4091	14800	399	47.4
ARIMVC1775-09	378782	96	328	17838	4786	14933	407	47.4
ARIMVC1780-09	347421	102	576	43973	3332	1583	249	47.5
ARIMVC1780-09	403496	119	507	38793	3412	10781	399	47.5
ARIMVC1780-09	378782	96	507	32879	4913	21482	407	47.4
ARIMVC1780-09	398726	92	510	43854	4339	20373	136	47.5
ARIMVC1780-09	398726	74	501	28489	3187	14274	112	47.5
ARIMVC1780-09	408820	122	344	67333	3194	14346	307	47.5
ARIMVC592P-96	401055	67	505	73778	5953	35628	344	47.5

De las 11 muestras analizadas, 1 muestra (ARIMVC592P-96) resultó clasificada como pandémica, linaje 7PET. Las demás fueron clasificadas como No-pandémicas, sin embargo, dos de ellas fueron cepas toxigénicas, clasificadas como linajes MX-2, que poseen factores de virulencia que representan alto riesgo para la población. (Imagen 1)



La muestra ARIMVC592P-96 resultó clasificada como como sub-linaje LAT-1, de Serogrupo O1 (Imagen 2).

Determinación de Sub-linaje de la muestra de *V. cholerae*: ARIMVC592P-96 que ha resultado como cepa pandémica, linaje 7PET

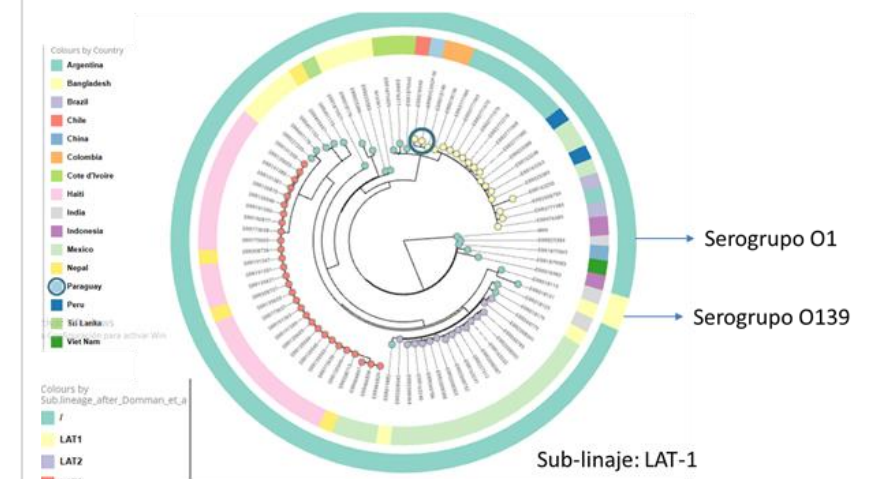


Tabla 2. Datos generados del análisis bioinformático, donde puede distinguirse algunas características de los aislados no pandémicos y pandémico.

ID	ID Paraguay	origen de la muestra	Date	Krahen	serogrupo	Identificación serotipo	Linaje (ref. Domman 2010)	Sublinaje	MLST PubMLST	MLST Pathogen Watch	Linaje	CTX sub tipo	No-pandémico		Toxigénicos		
													MLST	Linaje	MLST	Linaje	
ARIMVC1775-09	863	Ambiental	30/4/2009	Vibrio cholerae	O1	7PET	NA	NA	170	170	9	1081					
ARIMVC1775-09	787	Ambiental	21/4/2009	Vibrio cholerae	O83	NA	NA	NA	high level	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC1780-09	788	Ambiental	20/4/2009	Vibrio cholerae	O140	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC1780-09	868	Ambiental	2/5/2009	Vibrio cholerae	O18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC1780-09	870	Ambiental	3/5/2009	Vibrio cholerae	O109	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC1780-09	867	Ambiental	2/5/2009	Vibrio cholerae	O81	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC592P-96	450	Humano	30/4/2009	Vibrio cholerae	O1	7PET	NA	NA	170	170	9	1081					
ARIMVC1780-09	796	Ambiental	21/4/2009	Vibrio cholerae	O18	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC1775-09	861	Ambiental	30/4/2009	Vibrio cholerae	O109	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC1780-09	869	Ambiental	3/5/2009	Vibrio cholerae	O109	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ARIMVC592P-96	869	Humano	1996	Vibrio cholerae	O1	7PET	LAT-1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

### CONCLUSIÓN

Mediante la estancia se pudo generar nuevos conocimientos, fortaleciendo las existentes en relación al *V. cholerae* circulantes en el país, mediante la incorporación de técnicas genómicas. Esta experiencia ayudó a fortalecer la capacidad del Laboratorio de referencia nacional en la detección temprana de brotes de cólera, permitiendo una vigilancia oportuna y contribuyendo de manera significativa a la toma de decisiones en materia de Salud Pública. Estos nuevos hallazgos serán clave en la lucha contra el cólera, al permitir que los esfuerzos de intervención se enfoquen en las cepas más peligrosas.

### VISIÓN Y PLANES FUTUROS

- Implementar la vigilancia genómica de *V. cholerae* en el LCSP.
- Instalar dicha capacidad en diferentes puntos del país
- Realizar nuevo muestreo ambientales en búsqueda de *V. cholerae* toxigénico

### REFERENCIAS

1. Domman, D. et al. Vista integrada de *Vibrio cholerae* en las Américas. Science 358, 789–793 (2017)10.1126/science
2. Weill, F.-X. et al. Historia genómica de la séptima pandemia de cólera en África. Science 358, 785–789 (2017)10.1126/science

“Esta estancia de investigación fue cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con recursos del FEEI”