

GENOMA COMPLETO *CAMPYLOBACTER JEJUNI* CEPA 100

CHRISTIAN DOMINGUES SANCHEZ ^{1*}; FREDERICO SCHMITT KREMER ² ;
SIMONE RAUBER WÜRFEL ³ ; SÉRGIO JORGE ⁴ ; ODIR ANTÔNIO
DELLAGOSTIN ⁵ ; LUCIANO DA SILVA PINTO ⁶

^{1,2,6} *BioPro-Lab - Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas*

^{3,4,5} *Laboratório de Vacinologia - Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas*

**christian.kun@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Campylobacter jejuni* é uma das principais causadoras da diarreia, sendo considerada a causa bacteriana mais comum da gastroenterite humana no mundo e uma das principais responsáveis pela Síndrome de Guillain-Barré. Infecções por *Campylobacter* geralmente são leves, mas podem ser fatais em crianças pequenas, idosos e pessoas imunossuprimidas. Esta bactéria habita normalmente o trato intestinal de animais de sangue quente, como gado e aves e são frequentemente detectados em alimentos derivados desses animais. (WHO, 2017)

A cepa 100 foi isolada em Pelotas (Brasil) a partir de amostras comerciais de carne de frango disponibilizadas ao consumo humano. Essa bactéria apresenta diversos genes associados à virulência e resistência antimicrobiana (ensaios genotípicos), multirresistência a antimicrobianos (ensaios fenotípicos) e presença de plasmídeo, o que a caracteriza como potencialmente virulenta e com capacidade para transmissão horizontal dessas características para outras bactérias. Além disso, pode causar de campilobacteriose de difícil tratamento terapêutico e com grande relevância para saúde pública da região.

Atualmente, 125 genomas finalizados de isolados de *Campylobacter jejuni*, montados e anotados, estão disponíveis no GenBank, e aproximadamente 1380 estão disponibilizados na forma genomas rascunho, ainda não finalizados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Entretanto, estes números, apesar de altos, ainda não representa toda a variedade genética encontrada nesta espécie, visto que também não há nenhum isolado Brasileiro disponível até o presente momento. Desta forma, novos isolados devem ser sequenciados para a análise de suas divergências e regiões conservadas.

O presente trabalho teve como objetivo o sequenciamento, montagem e anotação do genoma de um novo isolado de *Campylobacter jejuni*.

2. METODOLOGIA

A cepa denominada 100, foi isolada de carne de frango (peito) resfriada comercializada em um supermercado da cidade de Pelotas, produzida no dia 18/09/2013 por um abatedouro de frangos situado no Rio Grande do Sul, sob Inspeção Sanitária Federal (distribuição nacional e exportação). (WÜRFEL, S. F. R, 2014)

A extração de DNA genômico do isolado foi realizada a partir do cultivo em Ágar Sangue 2 (Oxoid®), incubado por 24 horas a 42°. A preparação do DNA foi realizada com o kit ilustra bacteria genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare).

O sequenciamento foi realizado com a plataforma IonTorrent PGM, usando biblioteca "fragment" (single-end) de 400 bp. Foram utilizadas as ferramentas "BamToFastq" do pacote Bedtools para converter os arquivos BAM do IonTorrent Server em formato FASTQ.

A montagem *de novo* foi realizada com as ferramentas Newbler (<http://www.roche.com/>), mira (<http://www.chevreux.org/>), SPAdes (BANKEVICH et al., 2012), CLC Genomics (<https://www.qiagenbioinformatics.com>) e Celera (<http://wgs-assembler.sourceforge.net>), posteriormente os resultados destes foram integrados com o programa CISA (LIN; LIAO, 2013) e alinhados com o CAR (<http://genome.cs.nthu.edu.tw/CAR/>) utilizando um genoma de referência, *Campylobacter jejuni* cepa M129, código de acesso do Genbank (CP007749.1). A anotação foi realizada com a *pipeline* de anotação Genix (KREMER, FS, 2016), que integra os programas Prodigal, BLAST, RNAmmer, tRNAscan, Aragorn e INFERNAL. A ferramenta QUAST (quast.bioinf.spbau.ru) foi utilizada para avaliação das estatísticas de montagem dos resultados de cada programa de montagem *de novo*.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento com a plataforma IonTorrent resultou em 65.018.985 bases sequenciadas, também foram obtidos 237.337 *reads* (fragmentos curtos de sequência). O resultado do processo de montagem pelas ferramentas SPAdes, Mira, Newbler, Celera e CLC e da unificação das *contigs* pelo CISA está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação dos resultados obtidos pelos montadores SPAdes, Mira, Newbler, Celera e CLC e pelo integrador de montagens CISA.

Software	Tamanho total (pb)	Número de Contigs	Conteúdo CG (%)	N50
CISA	1.868.602	12	30.27	238.245
Celera	1.833.603	94	30.18	38.102
Mira	1.881.872	83	30.24	238.218
SPAdes	1.820.011	85	30.27	51.645
Newbler	1.825.180	47	30.24	121.375
CLC	1.769.173	128	30.28	28.677

Como demonstrado na Tabela 1, a comparação dos resultados obtidos pelos montadores com o integrador de montagens CISA expõe uma diminuição expressiva em relação ao número de *contigs*. O montador Newbler, por exemplo, gerou 47 *contigs*, enquanto no processo final com o CISA foi possível chegar ao número de 12 *contigs*, reforçando assim a importância de utilizar o integrador para gerar uma montagem de melhor qualidade. Mesmo o Newbler tendo o melhor desempenho em número de *contigs*, não irá desqualificar as outras montagens de outros montadores, visto que cada um tem sua estratégia de montagem, logo, cada um pode ser melhor em determinada região. Na Figura 1, apresenta-se a relação entre número de *contigs* e o tamanho da montagem, onde o tamanho total da montagem é mantido e a diminuição do número total de *contigs* no processo final com o CISA é bastante expressivo, o que é de grande relevância, pois o genoma está menos fragmentado, o que por sua vez reduz a chance de artefatos durante a anotação decorrentes de genes fragmentos.

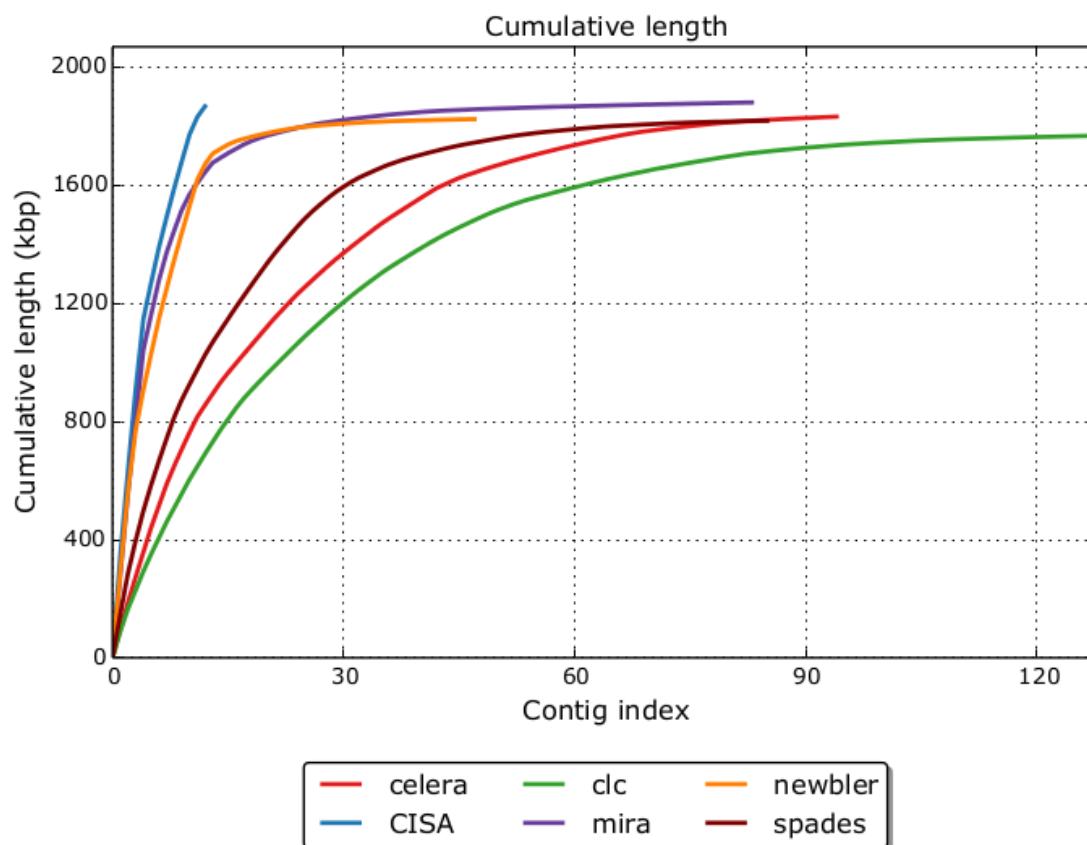


Figura 1. Representação da análise comparativa gerado pelo programa QUAST do *cumulative length* (tamanho cumulativo) dos diferentes montadores usados.

Tabela 2. Número de ocorrências das diferentes regiões funcionais encontradas no genoma (Cromossomo) e o Plasmídeo da cepa 100 de *Campylobacter jejuni*.

Região funcional	Cromossomo	Plasmídeo
CDS	1763	104
tRNA	42	-
tmRNA	1	-
ncRNA	2	-
Riboswitches	2	-

A partir da anotação, foi possível identificar várias regiões funcionais no genoma da cepa 100. Foram identificados 1763 genes codificantes de proteínas (CDS), dos quais 2 proteínas são reguladas por Riboswitches, os Riboswitches são pequenas regiões localizadas normalmente na porção 5' dos mRNA e que servem como elementos regulatórios de expressão gênica. Podem ser ativados / inibidos por metabólitos (ex: cobalamina). As proteínas reguladas pelos Riboswitches são a Fosfo-metil-pirimidina Sintase e a Fosfo-ribosil-amina-glicina Ligase, que estão ligadas com a regulação energética e biossíntese de nucleotídeos. Além das regiões codificantes, também foram identificadas *features* não codificantes, como tRNAs, rRNAs, tmRNAs, ncRNAs. Os ncRNAs identificados no genoma codificam para uma Ribozima, que são enzimas não proteicas e outro para 3-Isopropilmalato-desidrogenase que é homóloga a Aconitase. Os tmRNAs são RNAs transpor-

tadores que também codificam para um pequeno peptídeo, que atua na regulação da síntese de algumas proteínas. Foram encontrados genes de resistência antimicrobiana através da ferramenta de análise ResFinder (ZANKARI et al., 2012) que possibilitou identificar mutações no gene *gyrA*, dando altos níveis de resistência aos antibióticos Ácido nalidíxico e Ciprofloxacina. O que reforça ainda mais a importância dessa cepa, já que ela faz transferência horizontal com outras bactérias através dos plasmídios e pili, outras alterações nos genes L22 e 23S foram identificadas com múltiplos Polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs).

4. CONCLUSÕES

Com a metodologia empregada, foi possível realizar a montagem e anotação do genoma do isolado 100 de *Campylobacter jejuni*. O genoma já foi submetido para o GenBank e será de livre acesso.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. **Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology**, v. 19, n. 5, p. 455–77, maio 2012.

ZANKARI E, HASMAN H, COSENTINO S, VESTERGAARD M, RASMUSSEN S, LUND O, AARESTRUP FM, LARSEN MV. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**. 2012 Jul 10.

KREMER, FS; Eslabão, MR; Dellagostin, OA; Pinto, LS. *Genix: A New Online Automated Pipeline for Bacterial Genome Annotation*. **FEMS Microbiology Letters**, V. ? N. ?, 2016.

LIN, S.-H.; LIAO, Y.-C. CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e60843, 2013.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION), 2011. **Campylobacter** - Fact sheet N° 255. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/>>. Acesso em: 27 set. 2017.

WÜRFEL, S. F. R. **Campylobacter termófilos em frangos resfriados: isolamento, identificação e resistência a antimicrobianos**. 2014. 123p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas, 2014.