

17.12.2018

Genetic acquisition of *mcr-5* involving an uncommon mechanism

Nicolas Kieffer, Patrice Nordmann, Yves Millemann et Laurent Poirel

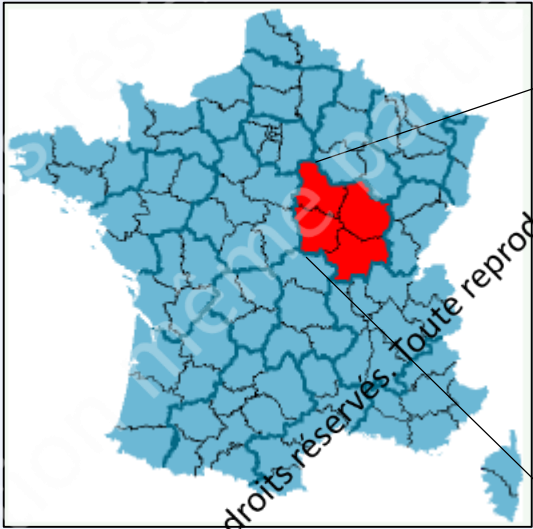


This presentation has been chosen for the RICAI-ASM Prize 2018

*Medical and Molecular Microbiology Unit, Department of Medicine,
University of Fribourg, Switzerland, National Reference Centre for
Emerging Antibiotic Resistance, University of Fribourg, Switzerland,
INSERM European Laboratory (LEA), University of Fribourg,
Switzerland et Ecole Vétérinaire de Maison Alfort*



Presentation of the study:



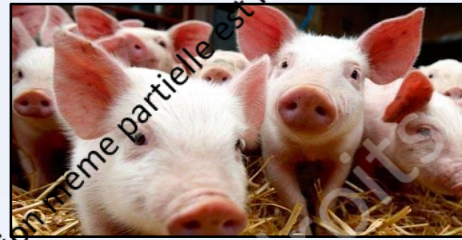
Aim of the study: Determination of the prevalence of colistin resistant strains among **4** different pig farms in France

- Bourgogne area between march and may 2016

- Different kind of samples



Piglets



Weaned pigs



Sow



Litter

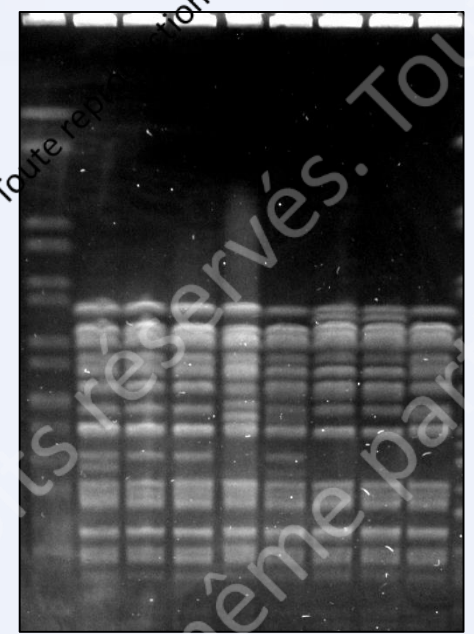
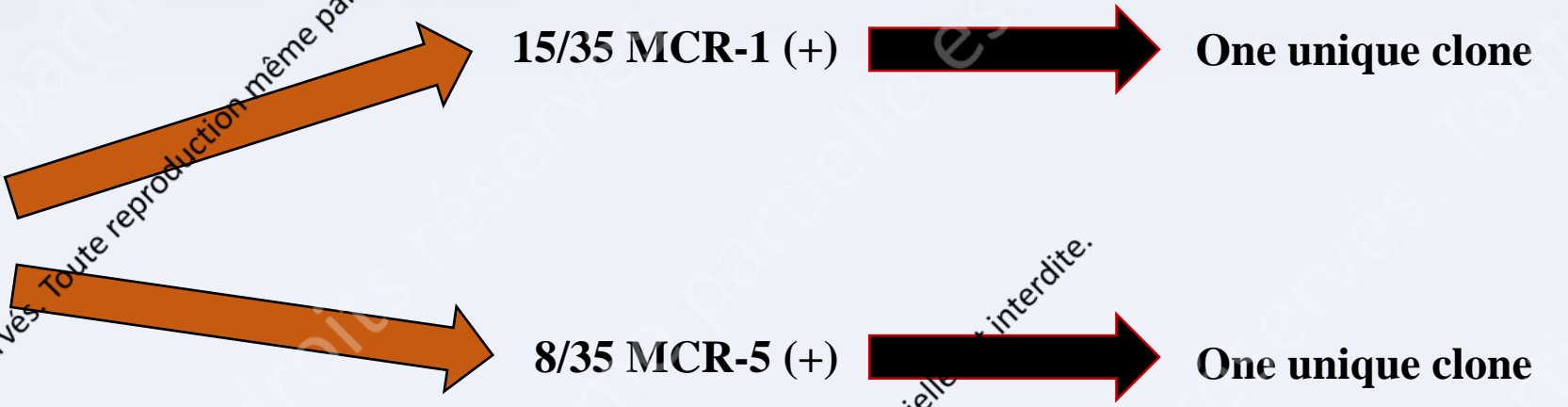
In total: **147 collected samples**

15/35 MCR-1 (+)
8/35 MCR-5 (+)

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Results

35 Col^R strains



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Results

PS1 : MCR-1 (+)

-MIC colistin : 8 µg/ml

-ST5409

-*mcr-1* onto a ca. 200 kb IncHI2 conjugative plasmid

-Co-resistance : sulphonamides
Sulfomethoxazole/Trimethoprim and
amoxicilline

PS8b: MCR-5 (+)

-MIC colistin : 4 µg/ml

-ST5786

-*mcr-5* onto a non-conjugative plasmid
(transferred by Kieser extraction)

-Co-resistance : sulphonamides
Sulfomethoxazole/Trimethoprim and
amoxicilline

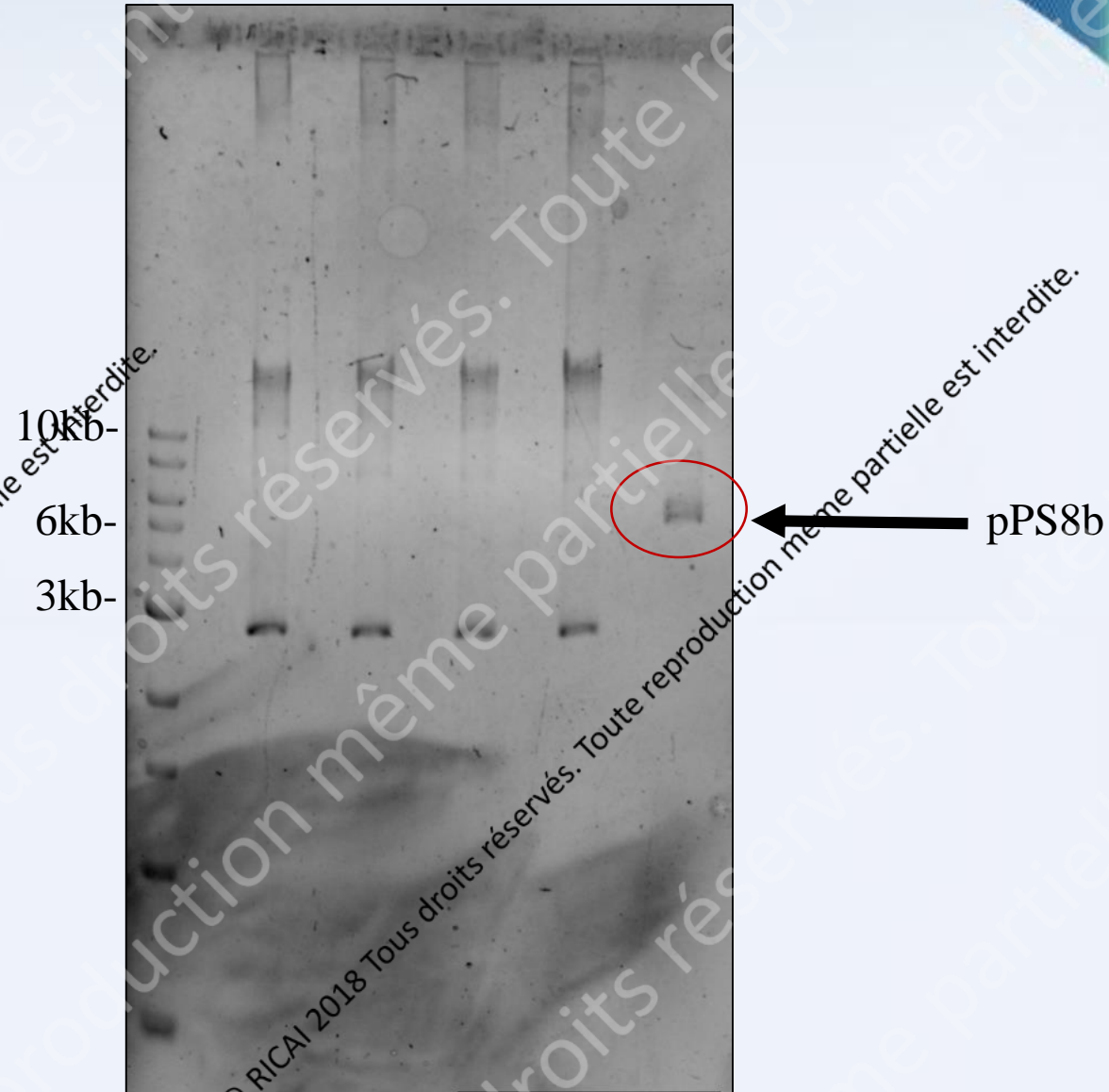
Results: plasmid analysis (*mcr-5*)

-*E. coli*-PS8b France 2016 : small plasmid ca. 6kb

-Sanger sequencing by PCR walking

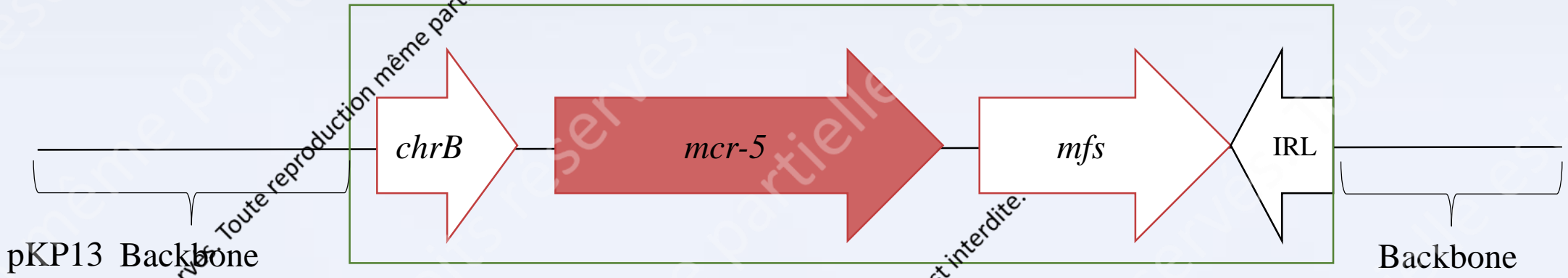
-Insertion of *mcr-5* : pKP13 backbone (2,5 kb)

-Full plasmid : 6268 nt



Results: plasmids analyses

E. coli-PS8b



pKP13 Backbone

Backbone

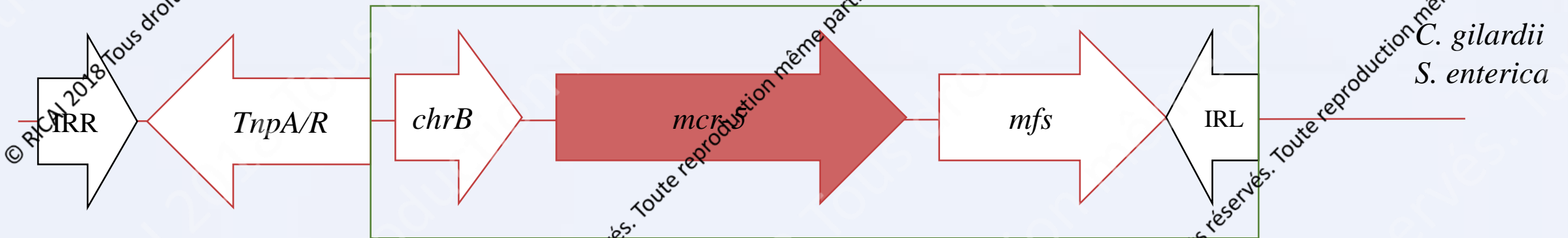
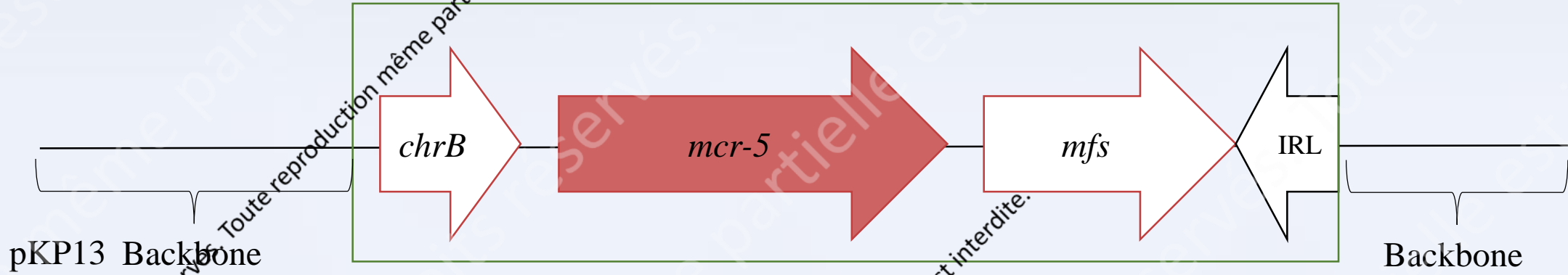
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Results: plasmids analyses

E. coli-PS8b



mcr-5 cassette ?

Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B

Maria Borczyk¹, Jennie Fischer¹, Jens A. Hammerl¹, Rene S. Hendriksen², Istvan Szabo¹ and Burkhard Malorny^{1*}

¹German Federal Institute for Risk Assessment, BfR, Department for Biological Safety, Berlin, Germany; ²National Food Institute, Technical University of Denmark, WHO Collaborating Center for Antimicrobial Resistance in Foodborne Pathogens and European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance, Kgs Lyngby, Denmark

*Corresponding author. Tel: +49-30-18412-2237; E-mail: Burkhard.Malorny@bfr.bund.de

How was the *mcr-5* cassette inserted in the pKP13a plasmid ?

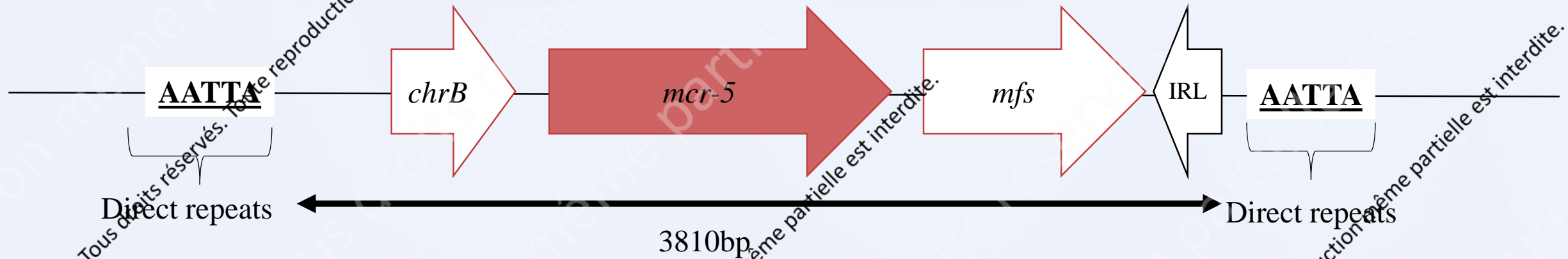
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Results: plasmids analyses

E. coli-PS8b



- Presence of Direct repeats surrounding the *mcr-5* cassette

- Insertion of the cassette in the plasmid backbone pKP13a (accession number NZ_CP003996.1)

- No transposase detected on the plasmid

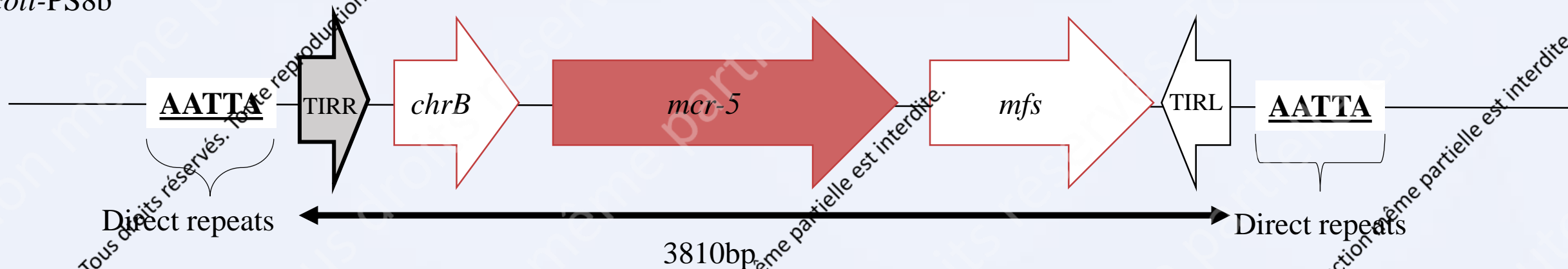
- How this cassette was inserted ? Transposition followed by deletion (*mcr-1*) ? Other mechanism ?

Results: plasmids analyses

E. coli-PS8b

MU: Mobile Unit

MU



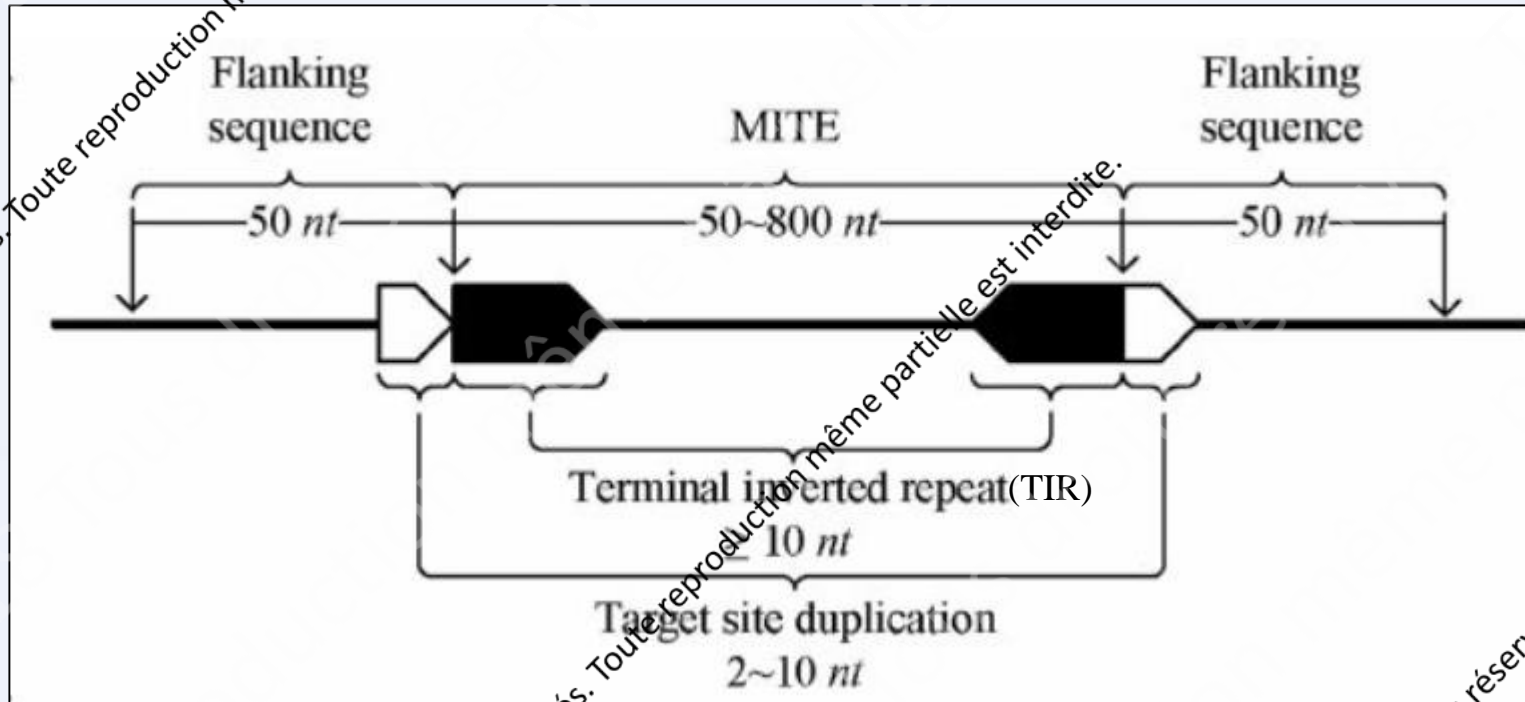
- TIRR identified : not on the backbone nor on the original cassette.
- TIRR involved in the mobilization ?
- MITE-like mechanism ?

TIRR GGGGACGGTAGAGAAAACGGACAAATCGTACGCTAAGCA
 |||||
TIRL GGGGTCGTCTCAGAAAACGGAAAAAATCGTACGCTAAGCA

34/40 bp identical : **85% Id**

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

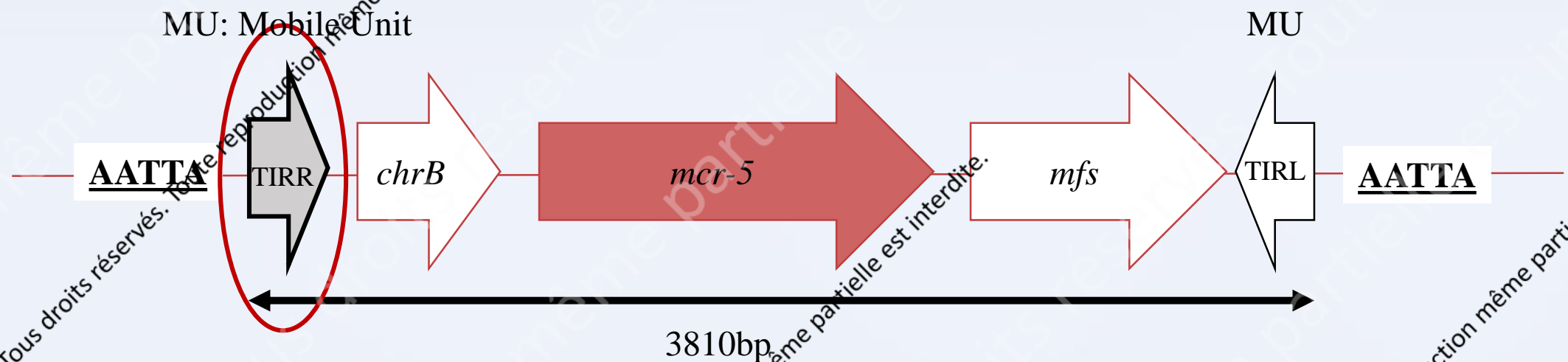
MITE : Miniature Inverted-Repeated Transposable Elements



-Non-autonomous mobile element

-Need the presence of a transposase *in trans* able to recognize both TIRs (TIRR and TIRL)

Results: mobilization mechanism of *mcr-5*



TIRR GGGGACGGTAGAGAAAACGGACAAAATCGTACGCTAAGCA
 TIRL GGGGTCGCTCAGAAAACGGAAAAAATCGTACGCTAAGCA

34/40 bp identical : 85% id

90% of Id with IRL of Tn*AsI*
 100% of Id with IRL of Tn*ShfI*

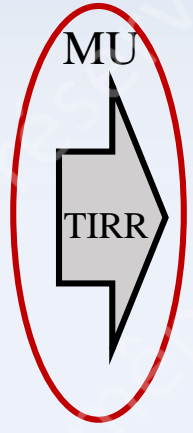
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Results: mobilization mechanism of *mcr-5*



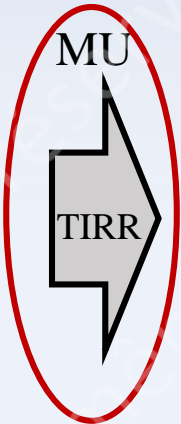
- 148 nucleotides-long genetic structure
- Identified in other similar structures

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

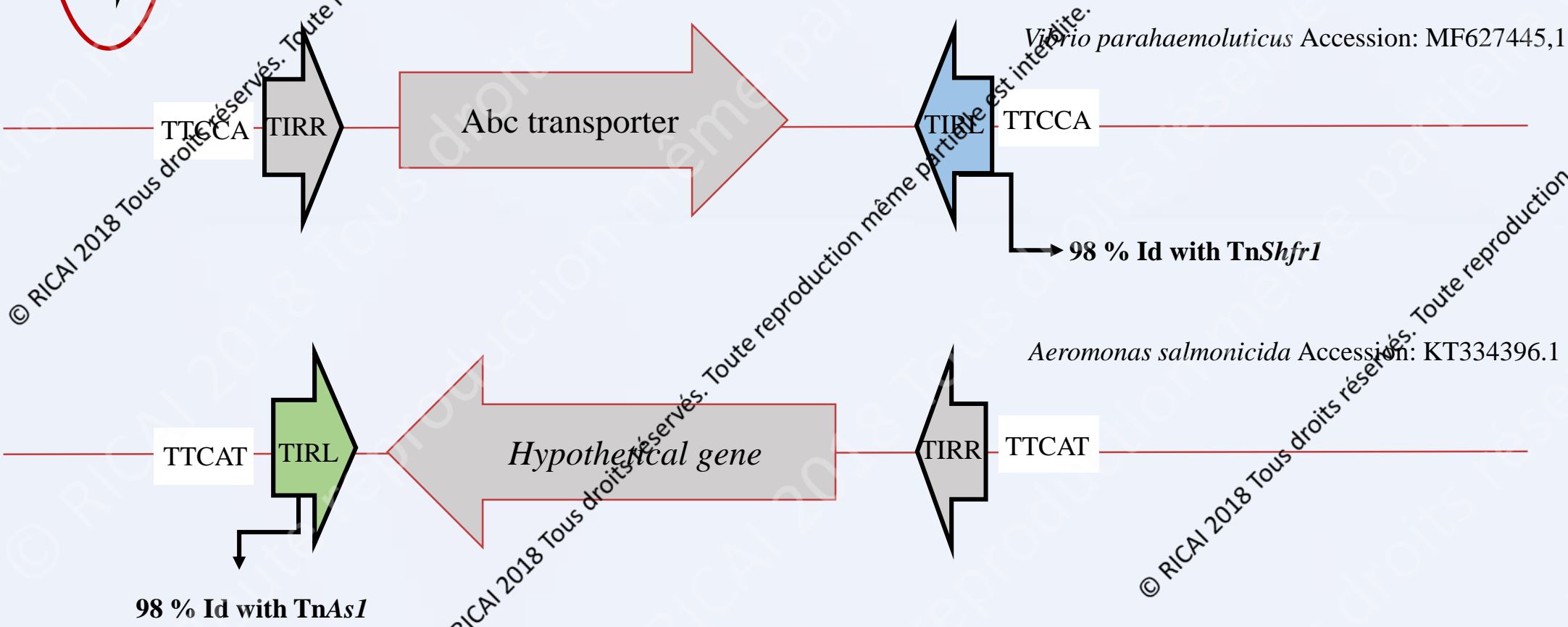
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Results: mobilization mechanism of *mcr-5*



-148 nucleotides-long genetic structure

-Identified in other similar structures



Vibrio parahaemolyticus Accession: MF627445,1

98 % Id with *TnShfr1*

Aeromonas salmonicida Accession: KT334396.1

98 % Id with *TnAs1*

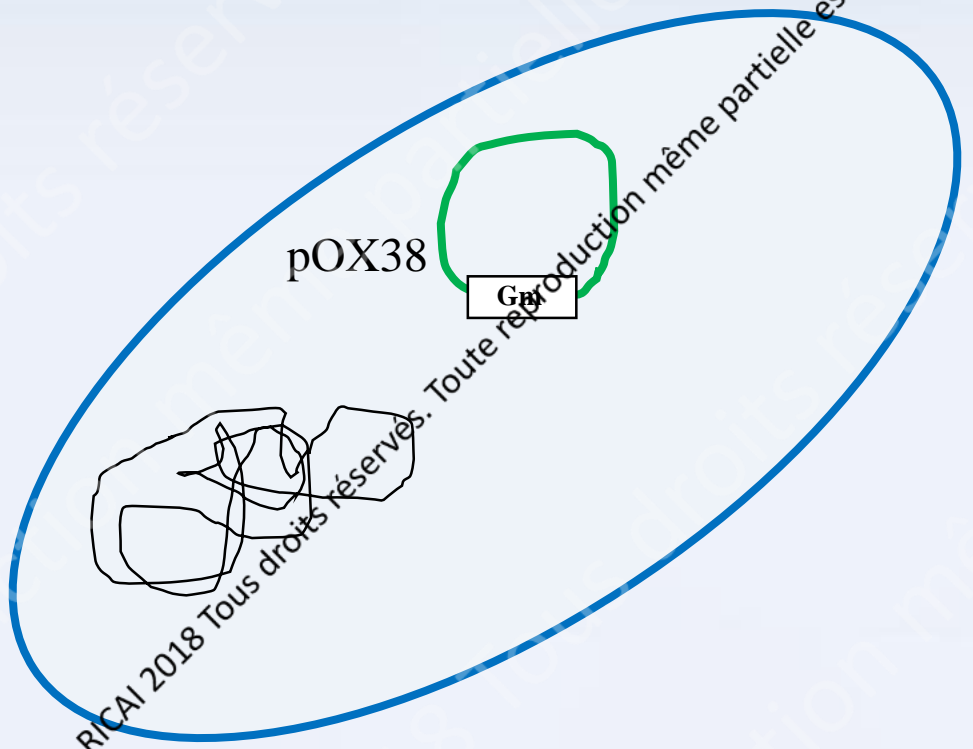
How to reproduce the mobilization ?

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

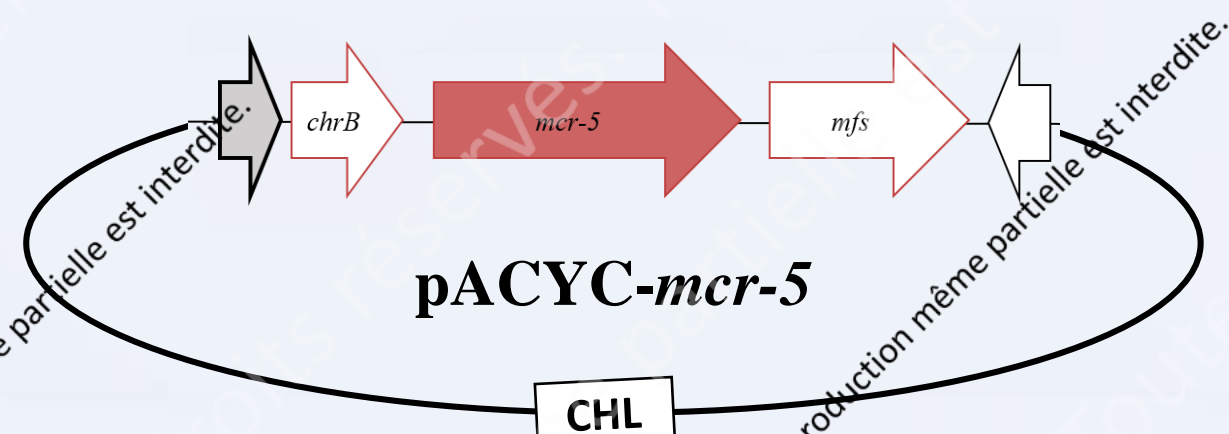
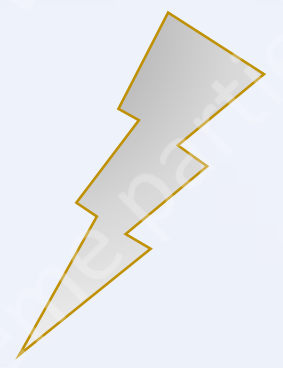
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

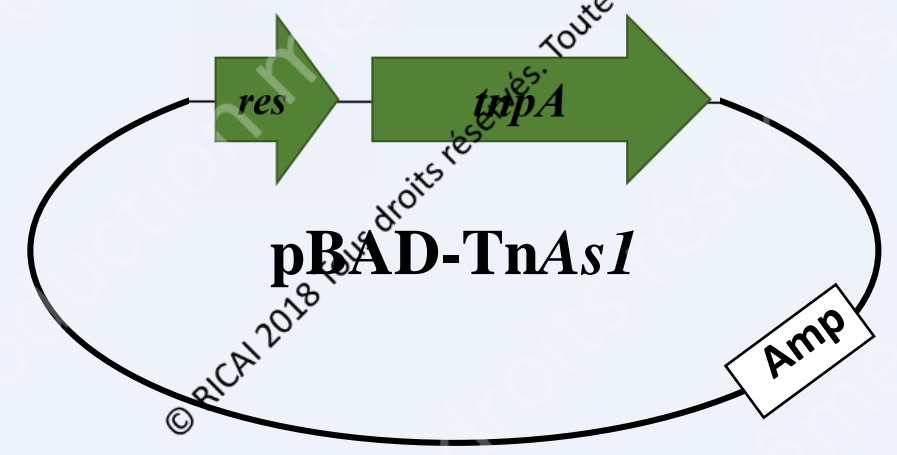
Procedure:



RZ211: Gm^R



pACYC-mcr-5



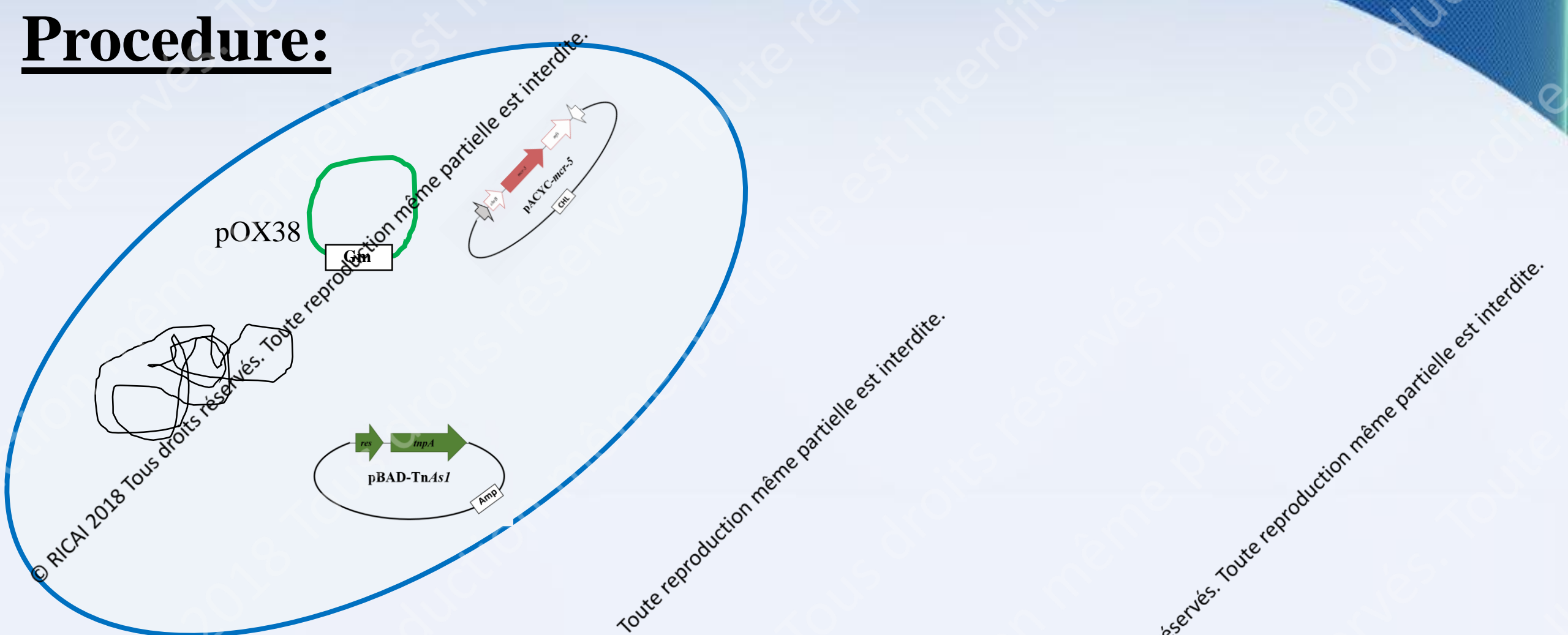
pBAD-TnAs1

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Procedure:

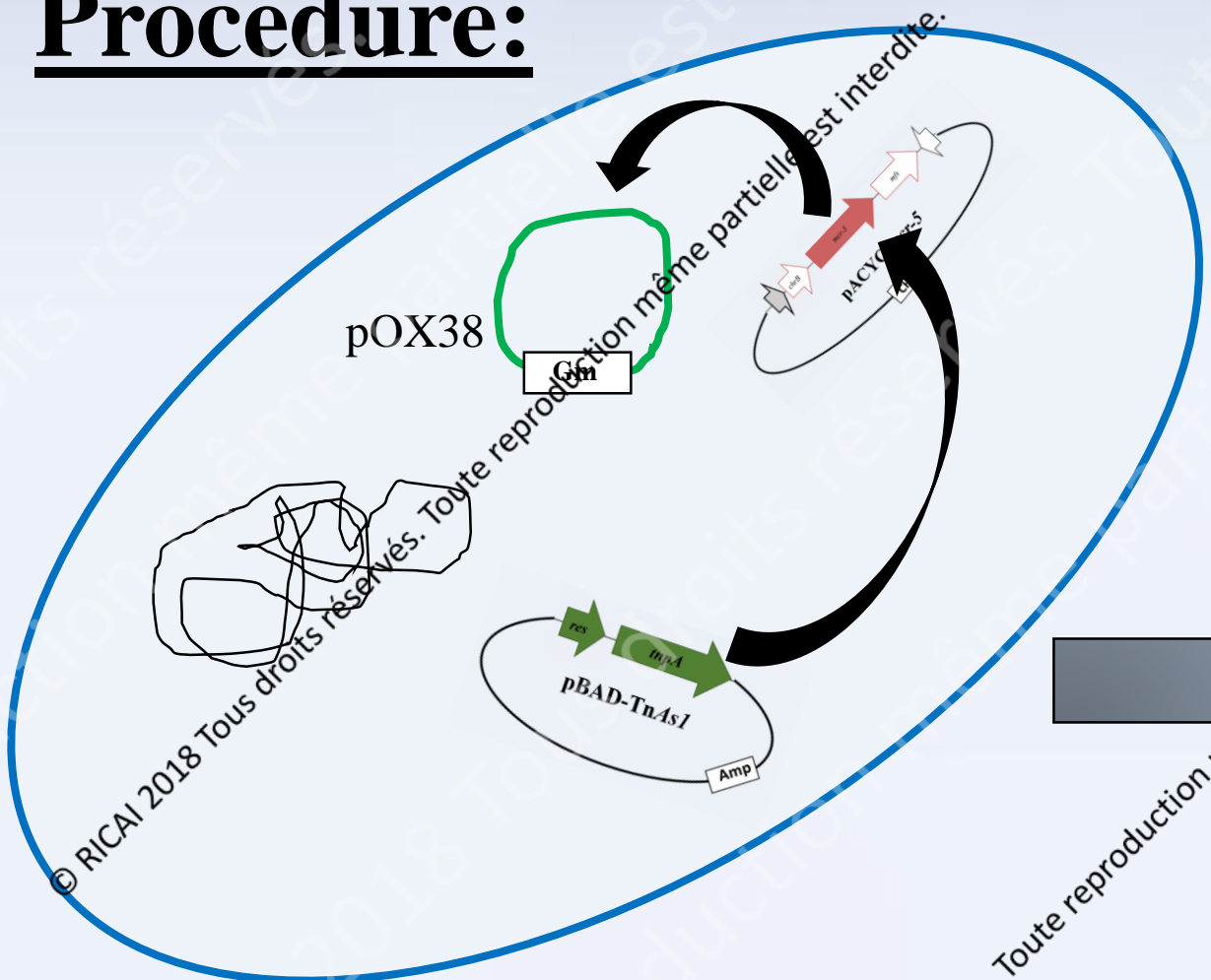


RZ211 : Gm^R + COL^R + CHL^R + AMP^R

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

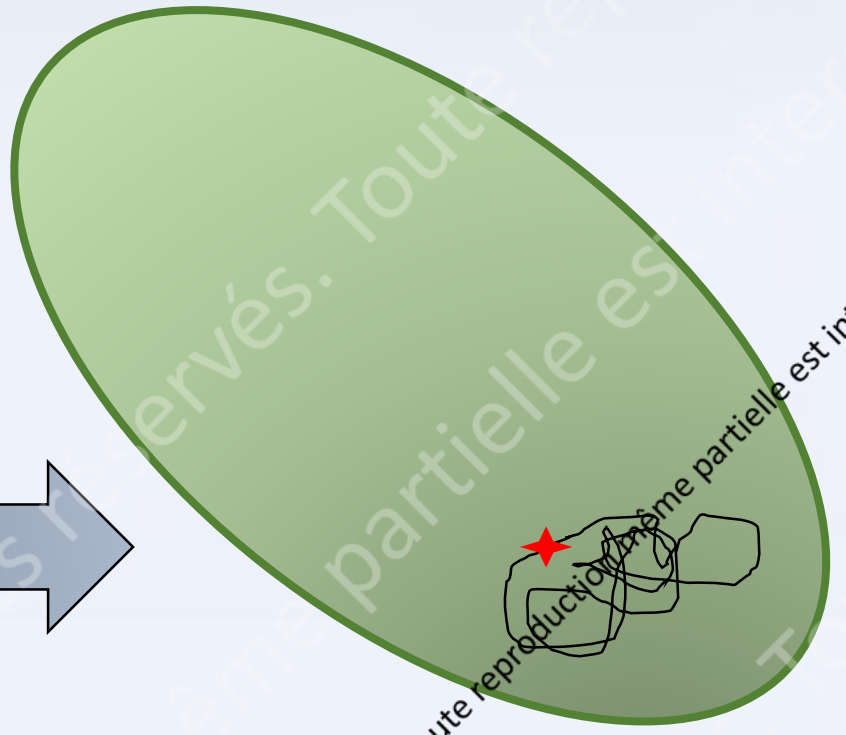
© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

Procedure:



RZ211 : Gm^R + COL^R + CHL^R + AMP^R

MATING-OUT



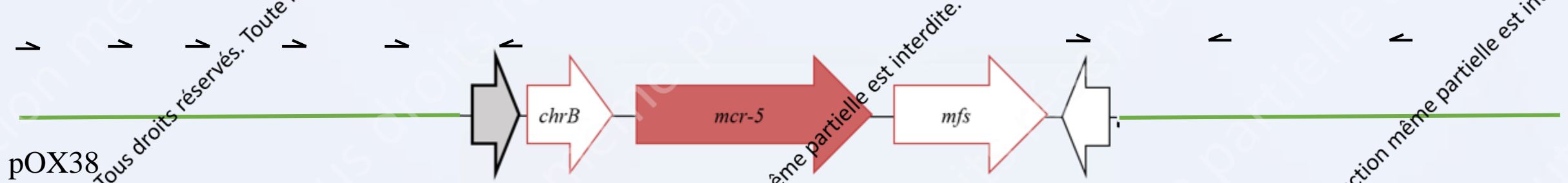
J53: Azide^R

Selection on COL (1 µg/ml) Azide (100 µg/ml) and Gm (8 µg/ml)

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

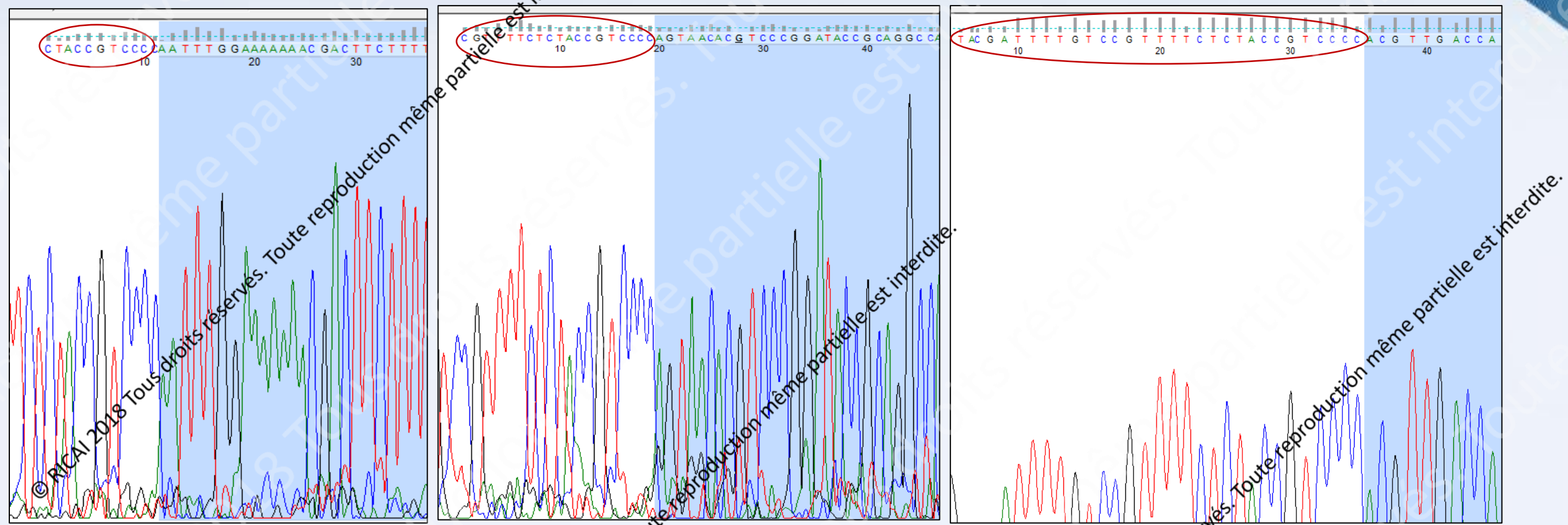
Procedure: Verification of the transposants

- Putative transposant should be: CHL^S , AMP^S , Az^R , Col^R and Gm^R
- PCR on colonie was performed and 18 different candidates were found *mcr-5* positive



- PCR reactions using external primers were performed in order to amplify the insertion sites and primers on the pOX38 plasmid

Results



To date : 5 different insertion sites identified (still ongoing)

```

TIRR GGGGACGGTAGAGAAAACGGACAAAATCGTACGCTAAGCA
        | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
TIRL GGGGTCGTCTCAGAAAACGGA AAAAATCGTACGCTAAGCA

```

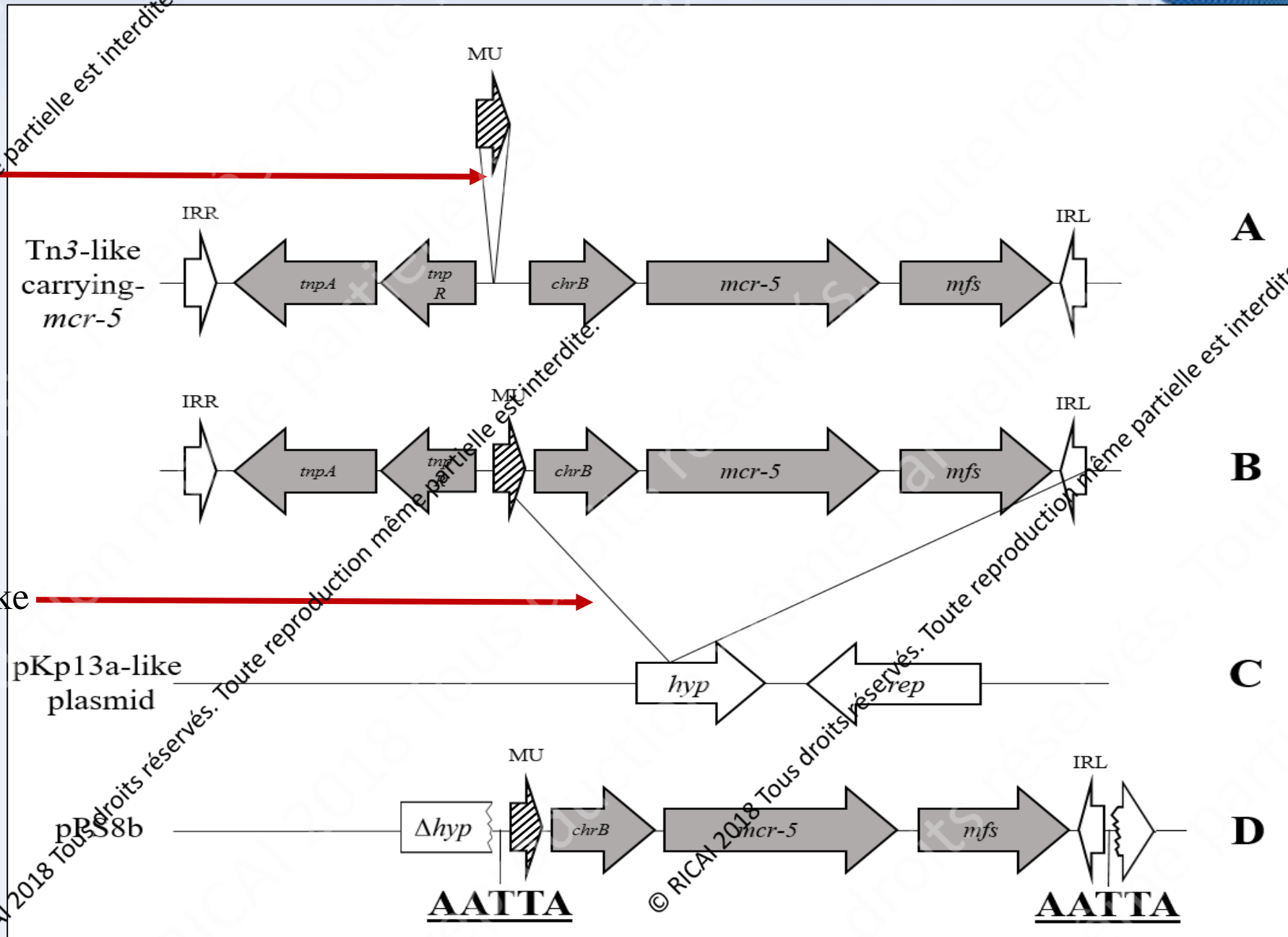
(Note: The insertion site 'GGGGACGGTAGAGAAAACGGAC' in the TIRR sequence is circled in red in the original image.)

Summary

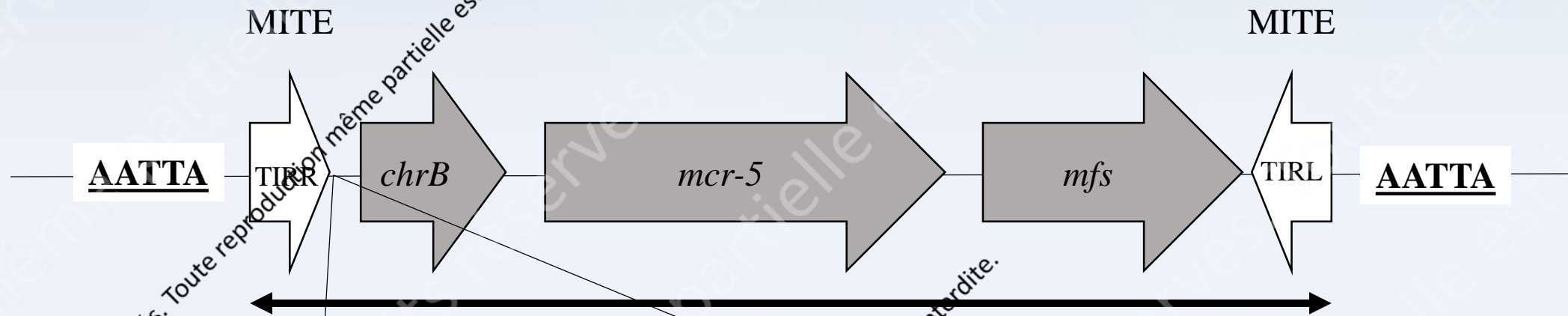
Recombination ?

Action of a Tn3-like
transposase

***Transposition did not
work with the *tnpA* of the
original transposon***



© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.



3810bp

GACTGACGCCAGTTGAXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
GGTTGACGCCAAGTTAGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

GACTGACGCCAGTTGA
GGTTGACGCCAAGTTAG

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.

© RICAI 2018 Tous droits réservés. Toute reproduction même partielle est interdite.