NACIONALNI LABORATORIJ ZA
ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO

Genomsko sekvenciranje za rutinsko spremljanje VOB v Sloveniji - projekt SloSeq

Sandra Janežič

Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano (NLZOH), Center za medicinsko mikrobiologijo, Oddelek za mikrobiološke raziskave

Univerza v Mariboru, Medicinska fakulteta, Katedra za mikrobiologijo in imunologijo

Vsebina

- Sekvenciranje bakterijskih genomov s pristopom sekvenciranja naslednje generacije (sekvenciranje kratkih odčitkov):

  od izolata do genomske sekvence

- Pristopi analize genomskih sekvenc

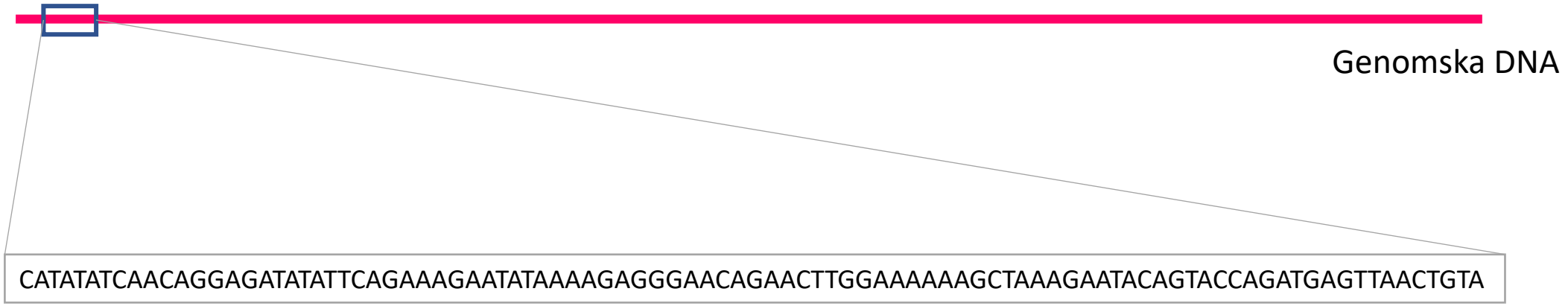
  cg-/wgMLST,

  AMR – rezistom

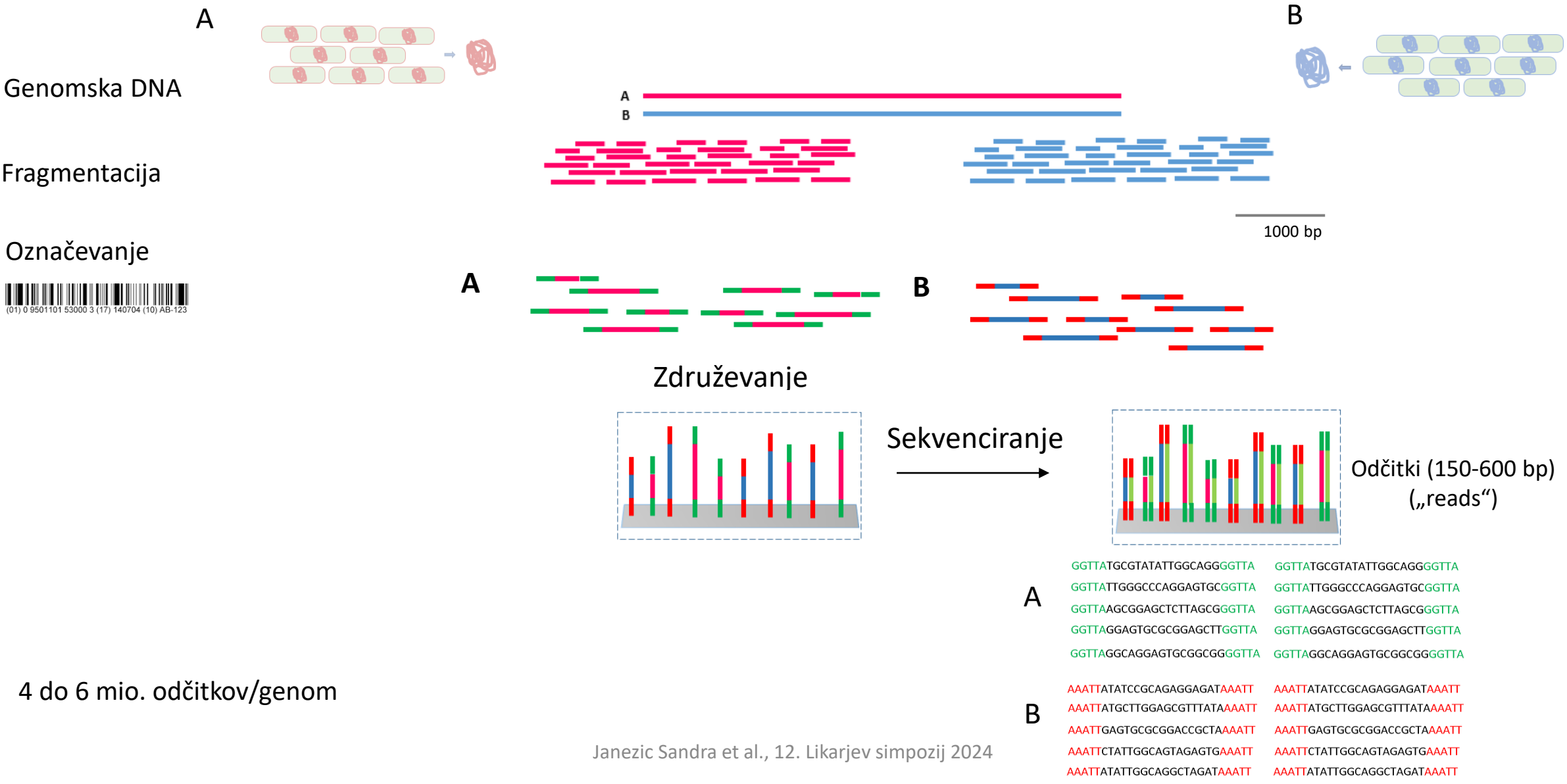
- Projekt SloSeq

  prvi rezultati spremljanja VOB (CR-CP/CP)

Sekvenciranje / določanje nukleotidnega zaporedja



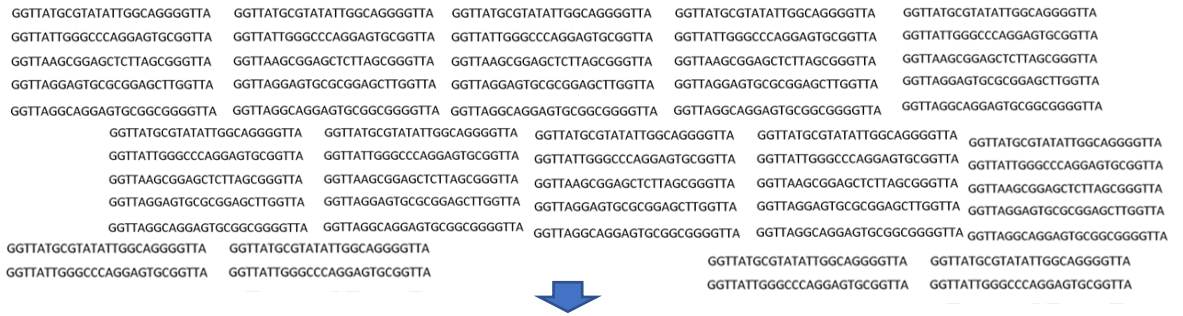
Sekvenciranje bakterijskih genomov



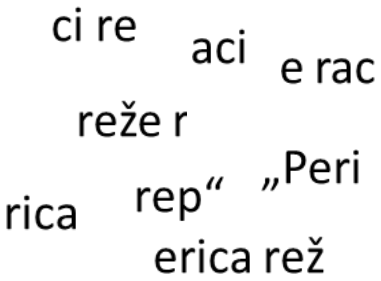
4 do 6 mio. odčitkov/genom

Sestavljanje genomskih sekvenc („assembly“)

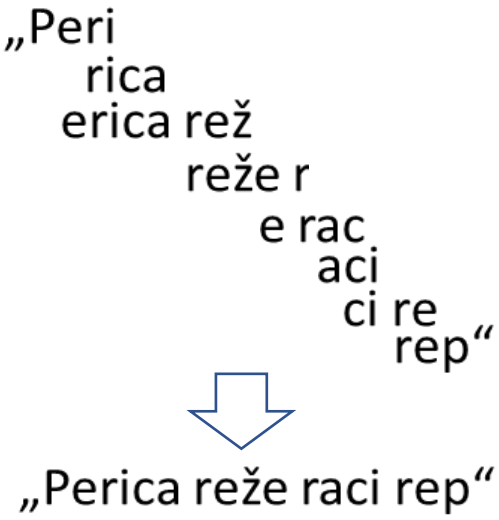
Rekonstrukcija genoma iz več milijonov kratkih odčitkov



Odčitki:



Sestavljanje prekrivajočih se odčitkov




Window position:
0
1e06
2e06
3e06
4e06
0 2001
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260

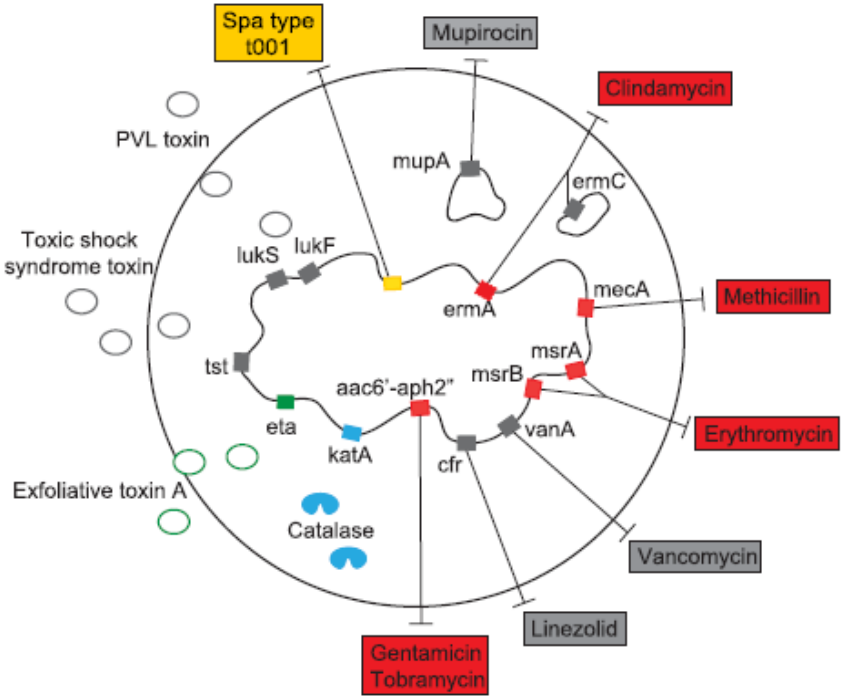
Informacije, ki jih lahko dobimo iz genomskih zaporedij

Analiza genomskih zaporedij nam omogoča:

- identifikacijo izolata,
- odkrivanje genov povezanih z virulenco,
- odkrivanje genov/mutacij povezanih z odpornostjo,
- analizo plazmidov in mobilnih genetskih elementov (MGE)

Določanje sorodnosti:

- *in silico* karakterizacijo (MLST, spa tipizacija…),
- odkrivanje/raziskovanje prenosov in izbruhov, ugotavljanju poti širjenja okužbe, rezervoarjev in virov okužbe

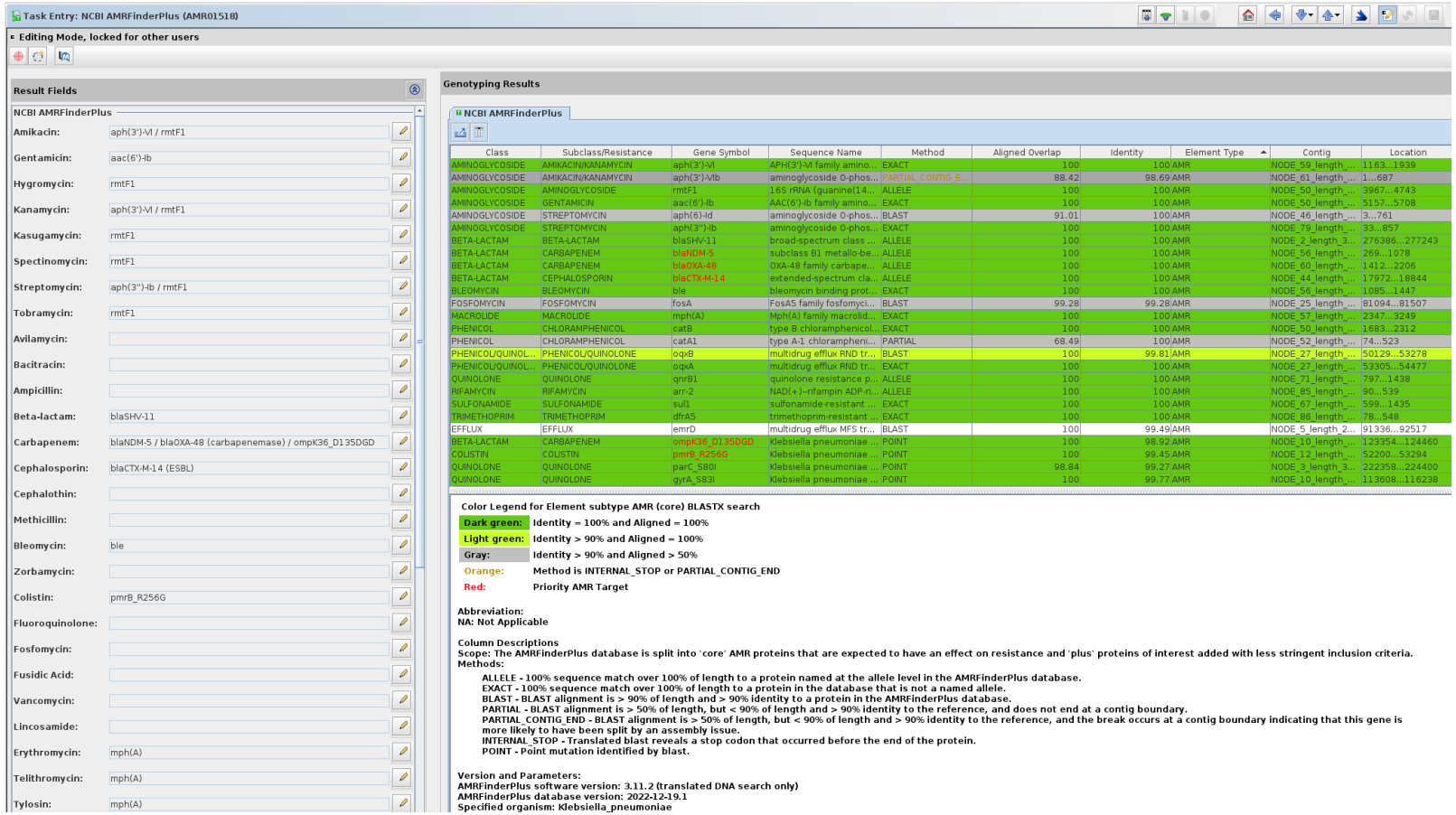


Leopold *et al.*, JCM (2014)

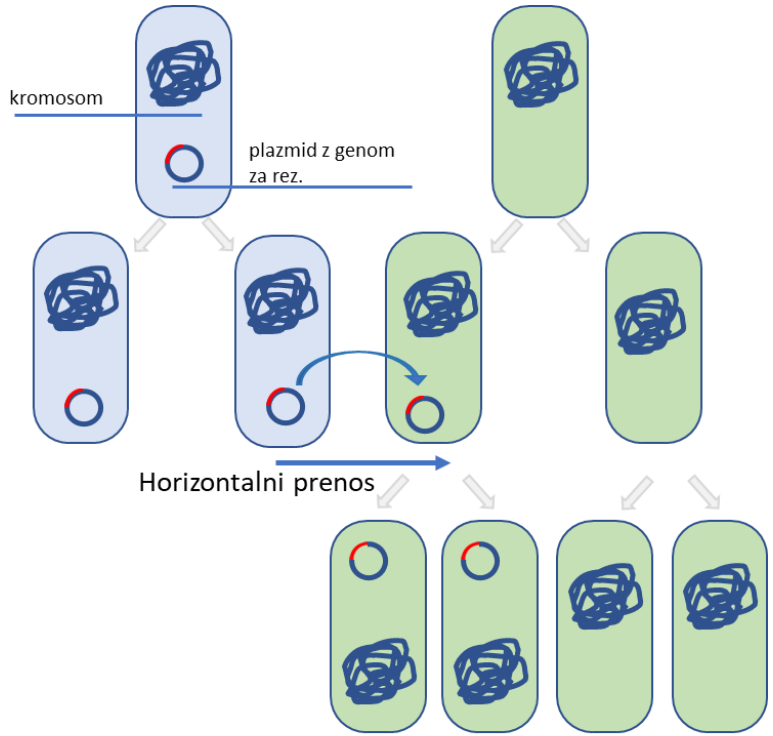
Odkrivanje genov in mutacij za odpornost proti antibiotikom

Za iskanje (znanih) mehanizmov odpornosti so na voljo referenčne podatkovne baze/orodja:

- AMRFinderPlus (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/AMRFinder/)
- ResFinder (http://genepi.food.dtu.dk/resfinder)
- CARD-RGI (https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi)
- ...



Analiza plazmidov in mobilnih genetskih elemenov



Chromosome & Plasmid Overview

Chromosome | Plasmids

Plasmid Name	Nu...	Size	Mash Ne...	Mash Ne...	AMRFinderPlus Targets	Circular	Rep Type(s)	Predicted Mobility	Mash Neighbor Identifi...
p64.5_AMR01482	5	64,450	0.0016	CP019078	Carbapenem: **blaOXA-48 (carbapenemase)** Cephalosporin: **blaCTX-M-14** (ESBL) Streptomycin: aph(3'')-Ib / aph(6)-Id	No	IncL/M	conjugative	Klebsiella pneumoniae
p328.2_AMR01482	22	328,174	0.0022	CP034201	Carbapenem: **blaNDM-5** Cephalosporin: **blaCTX-M-15** (ESBL) Amikacin: aac(6')-Ib / aph(3')-VI Beta-lactam: blaOXA / blaTEM-1 Bleomycin: ble Erythromycin: mph(A) Kanamycin: aac(6')-Ib / aph(3')-VI Quinolone: qnrS1 Streptomycin: aadA1 Sulfonamide: sul1 Telithromycin: mph(A) Tobramycin: aac(6')-Ib Tylosin: mph(A)	No	IncFIB, IncHI1B	conjugative	Klebsiella pneumoniae ...
p153.8_AMR01482	6	153,798	0.0040	CP035907	Amikacin: rmtF1 Chloramphenicol: catB Gentamicin: aac(6')-Ib Gentamycin: rmtF1 Hygromycin: rmtF1 Kanamycin: rmtF1 Kasugamycin: rmtF1 Quinolone: qnrB1 Spectinomycin: rmtF1 Streptomycin: rmtF1 Tobramycin: rmtF1 Trimethoprim: dfrA5	No	IncFIB, IncFII, ...	conjugative	Klebsiella pneumoniae
p113.0_AMR01482	1	113,028	0.0001	CP021940		No	IncFIB	non-mobilizable	Klebsiella pneumoniae

Chromosome & Plasmid Overview

Chromosome | Plasmids

Molecule De...	Cir...	Nu...	Size	GC	AMRFinderPlus Targets	iM...	iM...	VFDB Targets
chromosome	No	203	5,388,139	57.4	Carbapenem: **ompK36_D135DGD** Colistin: **pmrB_R256G** Beta-lactam: blaSHV-11 Phenicol: oqxA / oqxB Quinolone: gyrA_S83I / oqxA / oqxB / parC_S80I Rifamycin: arr-2	n/a	n/a	entA, entB, entC, entE, entF, fepA, fepB, fepC, fepD, fepG, fes...

Tipizacije bakterij za spremljanje širjenja

- Globalno širjenje (pripadnost določeni filogenetski liniji, klonskemu kompleksu)

- Lokalno širjenje in raziskovanje izbruhov/prenosov (poti prenosa in identifikacija vira okužbe)

Nizka

moč razlikovanja

Visoka

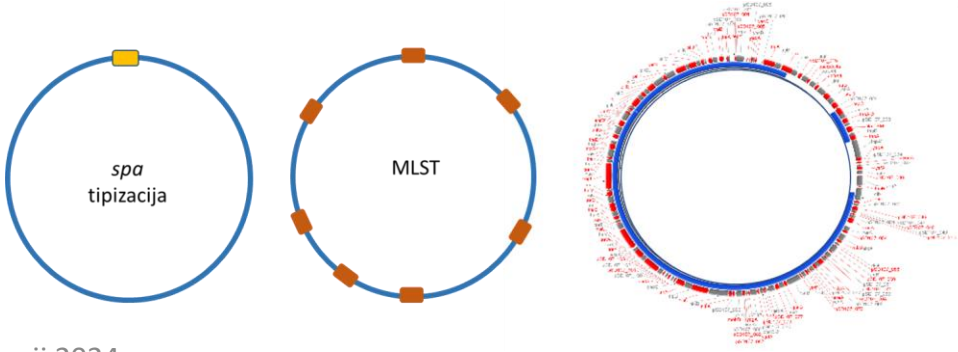
MLST

+ ostale, vrstno specifične, metode (*spa*-tipizacija, PCR-ribotipizacija…)

PFGE, MLVA

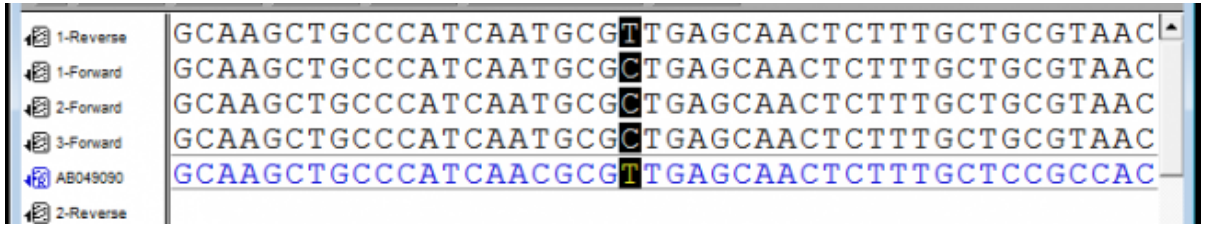
Analize genomov

cgMLST, wgMLST
SNP-analiza
tipizacija *In silico*



Pristopi za primerjavo genomskih zaporedij

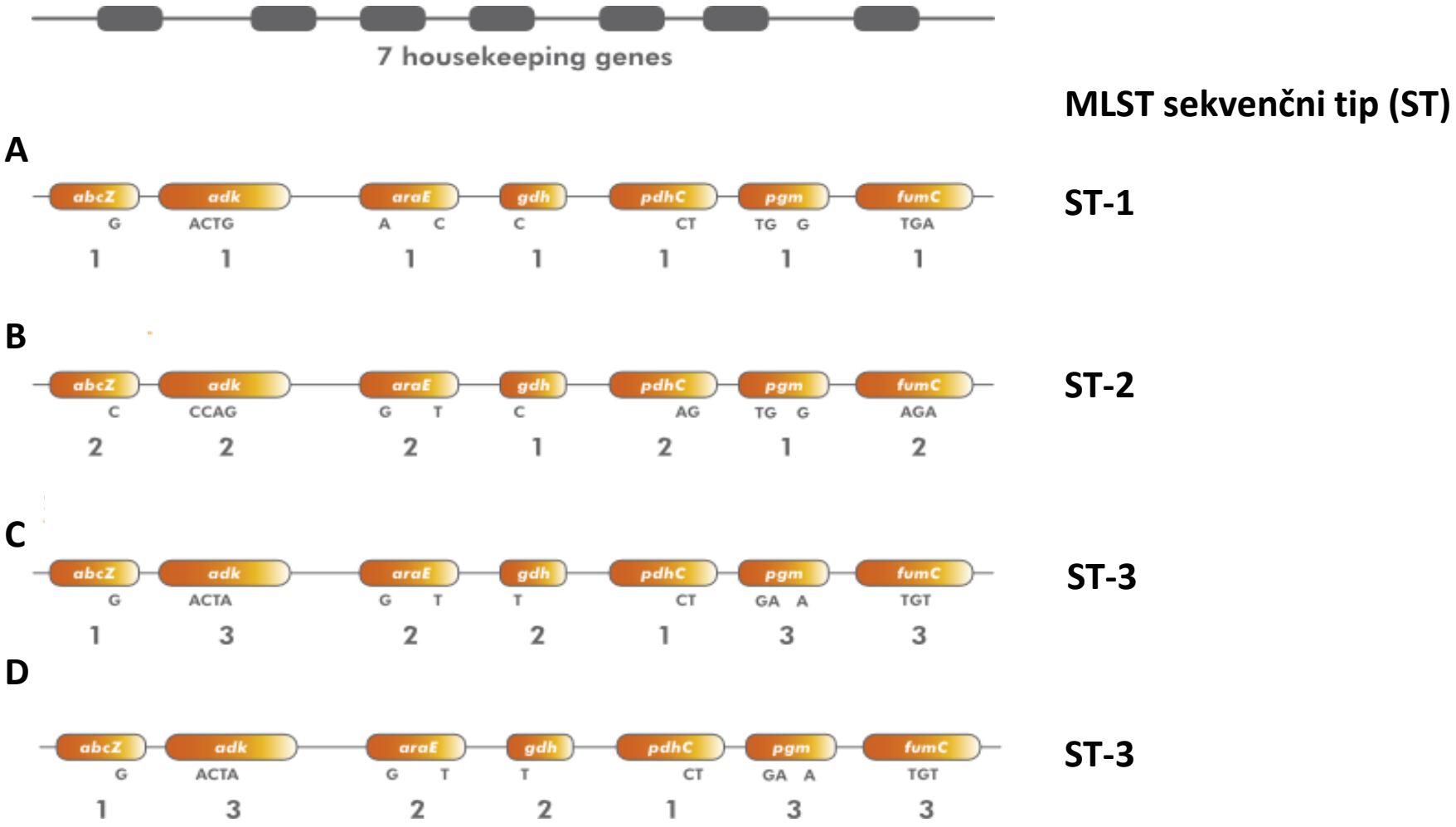
1) Analiza polimorfizmov posameznih nukleotidov (analiza SNV ali SNP, *angl. single nucleotide variant (SNV) ali single nucleotide polymorphism (SNP) analysis*)



2) Primerjava alelnega profila genoma (cg-/wgMLST, angl. „core-/whole genome multiple locus sequence typing«)

Primerjava alelnih profilov

MLST

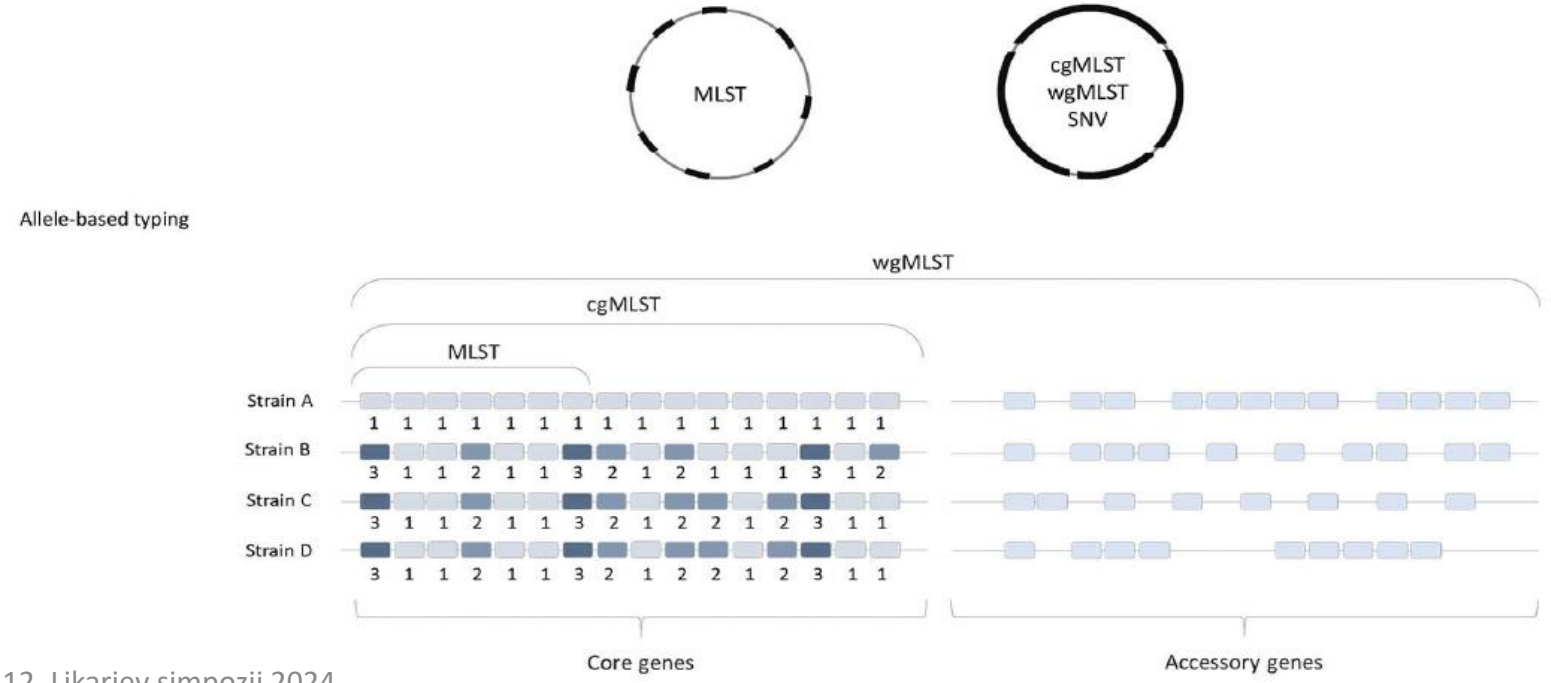


Primerjava alelnih profilov, od MLST do wgMLST

MLST - primerjava alelnega profila (običajno) **7** hišnih („housekeeping“) genov/lokusov (enotna nomenklatura **ST**)

cgMLST – primerjava alelnega profila jedrnega genoma („core genome multiple locus sequence typing“)
= vnaprej izbran set dobro ohranjenih genov/lokusov (>2000), ki predstavljajo jedro genoma (so prisotni pri večini izolatov)

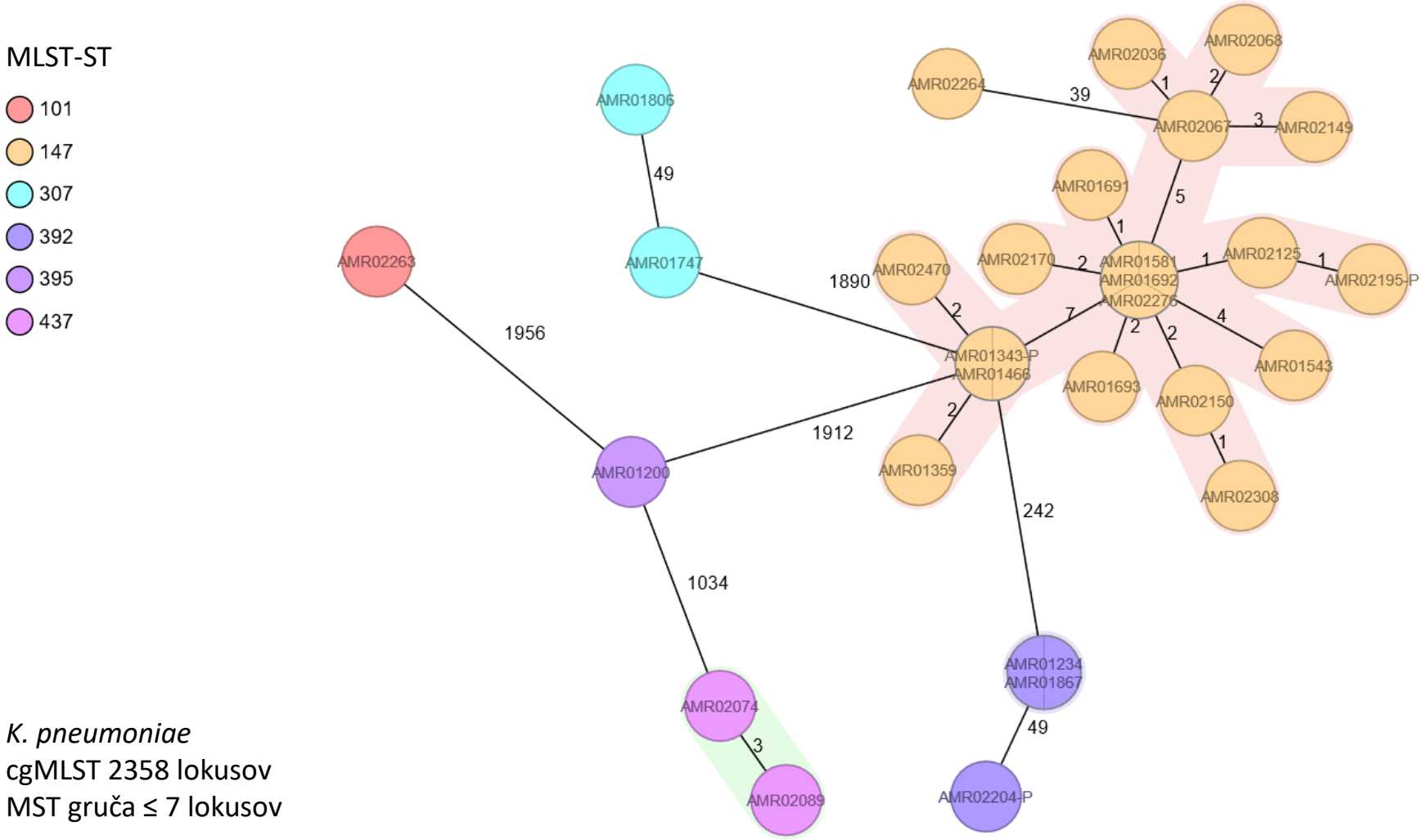
wgMLST – **primerjava alelnega profila celotnega genoma** („whole genome multiple locus sequence typing“)
= jedrni genom in pomožni genom (variabilno prisotni pri izolatih znotraj vrste)



File Edit Data Columns Analysis Tools

#Missir	Perc. K. pnei	Avg. Proce	Apprc Proced	Top S Proced	T Pı	Sample ID Sample	ST K. pneumonia	(E C ((C Z L L	KP1_R K. pneu	KP1_ K. pn	KP1_ K. pne	KP1_ K. pne	KP1_ K. pne	KP1_ K. pn	KP1_N K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_R K. pneu	KP1_ K. pne	KP1 K. pi	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneum	KP1_RS K. pneum	KP1_RS K. pneum	KP1_RS K. pneu	KP1_R K. pneu	KP1_RS K. pneur	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_ K. pn	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_R K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_ K. pn	KP1_RS K. pneu	KP1_R K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneu	KP1_RS K. pneum	KP1_RS K. pneu	KP1_RS0033 K. pneumoniae	KP1_ K. pne
14	99.4	?	5.4	1.00	...	**AMR02089**	437	... ...	4	1	2	2	8	1	8	10	6	7	8	6	2	1	4	5	8	8	8	8	8	1	1	8	7	5	9	7	1	7	8	1	1	2	1	8	8	7	8	7	8
15	99.4	?	5.4	1.00	...	**AMR01905**	437	... ...	4	1	2	2	8	1	8	10	6	7	8	6	2	1	4	5	8	8	8	8	8	1	1	8	7	5	9	7	1	7	8	1	1	2	1	8	8	7	8	7	8
14	99.4	?	5.4	?	?	**AMR01696-PP**	437	... ? ? ? ? ? ? ? ?	4	1	2	2	8	1	8	10	6	7	8	6	2	1	4	5	8	8	8	8	8	1	1	8	7	5	9	7	1	7	8	1	1	2	1	8	8	7	8	7	8
6	99.7	?	5.3	1.00	...	**AMR01624**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01113**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**H-KP-BD416**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	260	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.4	1.00	...	**H-KP-BD498**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01615**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.4	1.00	...	**AMR01750**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
18	99.2	?	5.4	1.00	...	**AMR01707**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
7	99.7	?	5.4	1.00	...	**AMR01023**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
10	99.6	?	5.5	1.00	...	**AMR01475**	14	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	14	17	5	18	1	1	14	17	18	2	18	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	19	7	19
18	99.2	?	5.5	1.00	...	**AMR01341**	6278	?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.4	1.00	...	**AMR01063**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
11	99.5	?	5.5	1.00	...	**AMR01229**	6278	?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.5	1.00	...	**AMR01869**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.4	1.00	...	**AMR01587**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.3	1.00	...	**AMR01619**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.4	1.00	...	**AMR01589**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.5	1.00	...	**AMR02238**	14	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	14	17	5	15	1	1	14	17	18	2	18	18	277	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	19	7	19
6	99.7	?	5.5	1.00	...	**AMR01590**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.3	1.00	...	**AMR01617**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01593**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01595**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01614**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	653	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
6	99.7	?	5.4	1.00	...	**AMR01604**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01742**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.4	1.00	...	**AMR01731**	6278	? ... ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19
5	99.8	?	5.3	1.00	...	**AMR01629**	6278	? ? ?	12	11	14	15	18	1	18	17	54	17	5	18	1	1	14	17	18	2	570	18	18	1	2	17	16	1	19	6	1	17	18	1	1	4	3	18	18	16	127	7	19

Vizualizacija sorodnosti – minimalno vpeto drevo (MST)



K. pneumoniae
cgMLST 2358 lokusov
MST gruča ≤ 7 lokusov

Projekt SloSeq

Sofinancira Evropska unija

SloSeq: „Konsolidacija in integracija sekvenciranja celotnega genoma v rutinski monitoring v Sloveniji“

https://www.nlzoh.si/programi-in-projekti/sloseq/

Sodelujoče inštitucije:

- Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) (vodilna),
- Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ),
- Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo (IMI, UNI LJ)

DS3 - Cilji

- Vzpostavitev, optimizacija in konsolidacija protokolov sekvenciranja genomov in analitičnih pristopov ter poročanja za potrebe spremljanja VOB.

Projekt SloSeq – analize genomov za spremljanje VOB

Na NLZOH v rutinsko sekvenciranje vključujemo:

- Primoizolate pri katerih so potrjene karbapenemaze - **CR-CP in CP** (ne glede na bakterijsko vrsto).
- Primoizolate brez določenega tipa karbapenemaze.

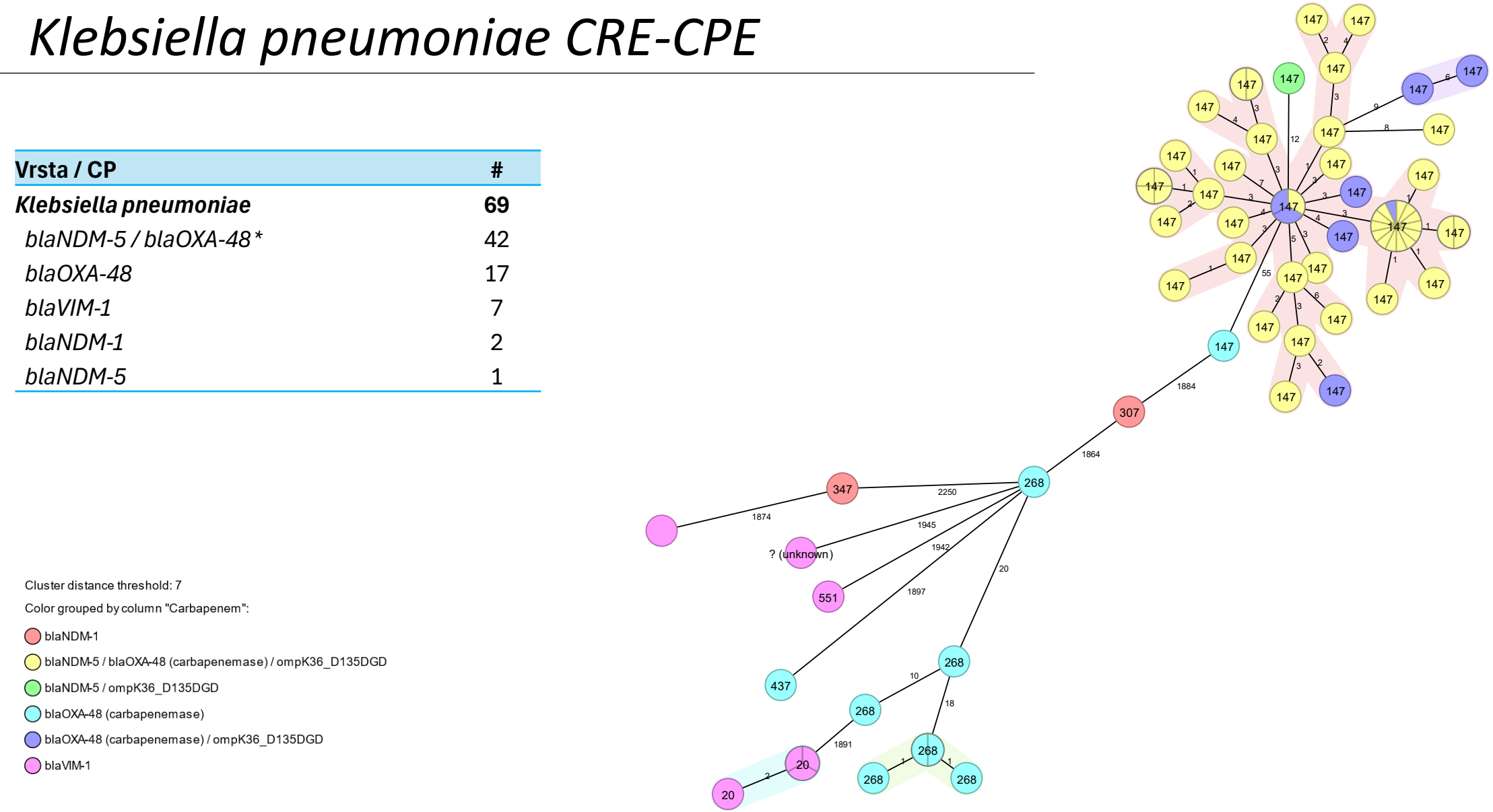
Analiza:

- *cgMLST in*
- *AMR (tip karbapenemaze)*

- Začetek: 1. 1. 2024

Klebsiella pneumoniae CRE-CPE

Vrsta / CP	#
Klebsiella pneumoniae	**69**
*blaNDM-5 / blaOXA-48 **	42
blaOXA-48	17
blaVIM-1	7
blaNDM-1	2
blaNDM-5	1



Janezic Sandra et al., 12. Likarjev simpozij 2024

cgMLST 2358 lokusov
MST gruča ≤ 7 lokusov (0.003x število lokusov)

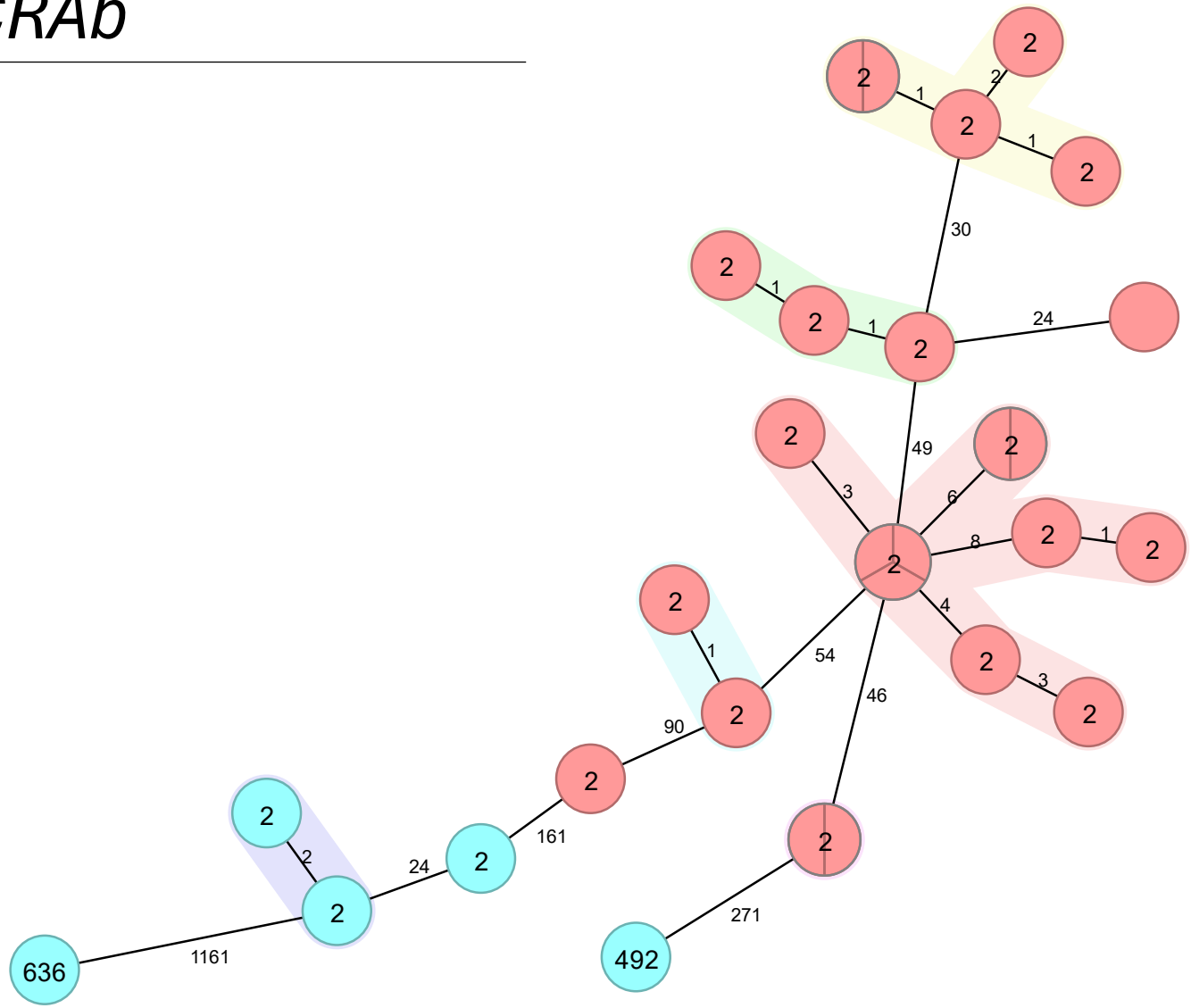
Acinetobacter baumannii - CRAb

Vrsta/CP	#
Acinetobacter baumannii	**29**
blaOXA-23 / blaOXA-66	*24*
blaOXA-66 / blaOXA-72	*5*

Cluster distance threshold: 9

Color grouped by column "Carbapenem":

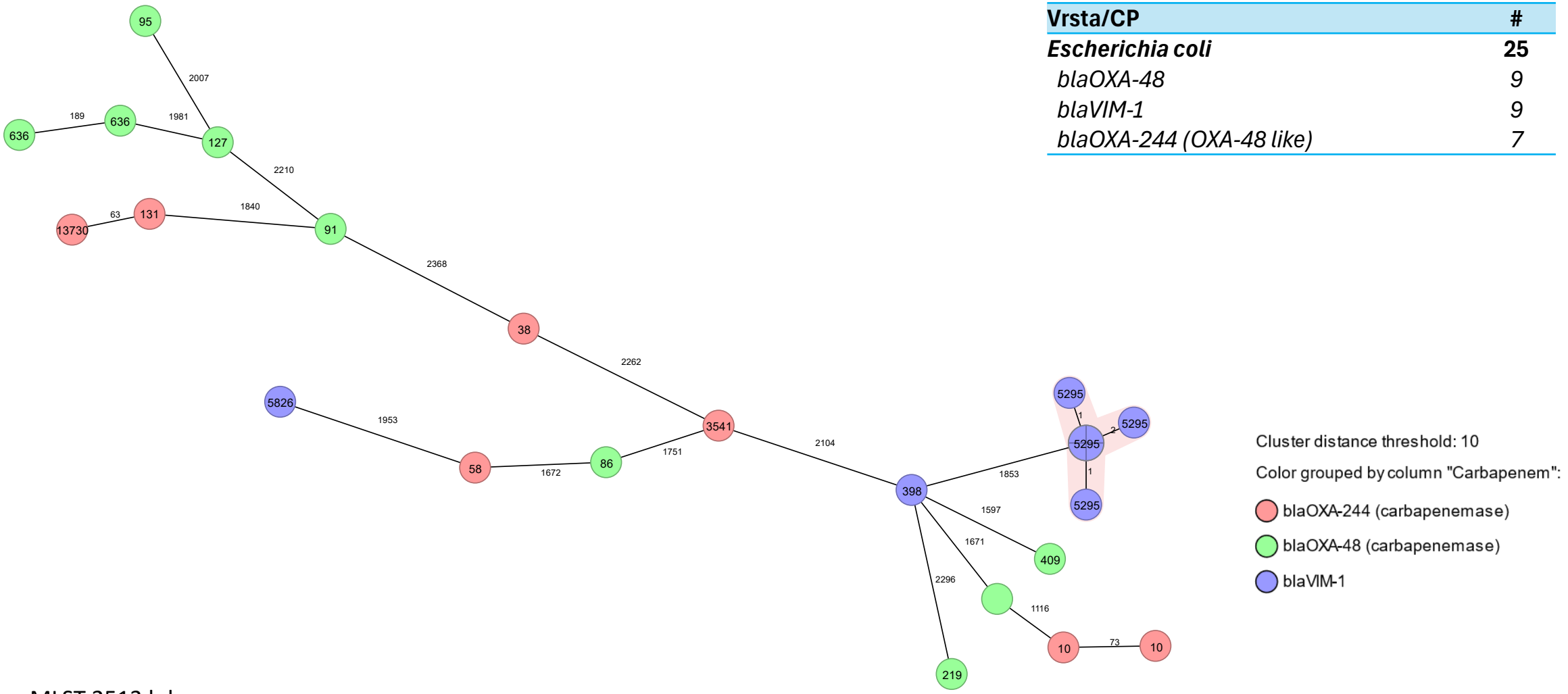
- blaOXA-23 (carbapenemase) / blaOXA-66 (carbapenemase) / ftsI_A515V
- blaOXA-66 (carbapenemase) / blaOXA-72 (carbapenemase)



cgMLST 2390 lokusov
MST gruča ≤ 9 lokusov

Escherichia coli – CRE-CPE

Vrsta/CP	#
Escherichia coli	**25**
blaOXA-48	*9*
blaVIM-1	*9*
blaOXA-244 (OXA-48 like)	*7*



cgMLST 2513 lokusov
MST gruča ≤ 10 lokusov

Zaključek

Analiza genomskih zaporedij je metoda izbora za spremljanje širjenja povzročiteljev okužb (WHO, ECDC…).

- **Določanje sorodnosti** – primerjava genomskih sekvenc ima neprimerljivo večjo moč razlikovanja od predhodnih metod. V kombinaciji z epidemiološkimi podatki nam omogoča zanesljivo spremljanje širjenja povzročiteljev okužb (na nacionalni in globalni ravni), ter raziskovanje prenosov/izbruhov.

- **Ena preiskava –> veliko informacij** (določanje sorodnosti, odkrivanje genov za virulenco, mehanizmov odpornosti, plazmidov in MGE…).

Zahvala

Sodelavcem oddelkov Centra za medicinsko mikrobiologijo

OMM Maribor
OMM Celje
OMM Murska Sobota
OMM Kranj
OMM Koper
OMM Novo Mesto
OMM Nova Gorica

Oddelek za mikrobiološke raziskave (OMR)
Oddelek za javnozdravstveno mikrobiologijo (OJM)

NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO

Projekt: SLOSEQ (# 101112671)

Naslov: Konsolidacija in integracija sekvenciranja celotnega genoma v rutinski monitoring v Sloveniji

SLOSEQ je projekt Evropske unije, ki ga sofinancira Evropska izvajalska agencija za zdravje in digitalno tehnologijo – HaDEA.

Sofinancira Evropska unija