

Konsolidacija in integracija genomskih analiz za rutinsko spremljanje večkratno odpornih bakterij v Sloveniji – prvi rezultati projekta SLOSEQ

Sandra Janežič^{1,2}, Andrej Golle¹, Urška Kramar¹, Maja Rupnik^{1,2}, Helena Ribič¹

¹Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, Prvomajska ulica 1, 2000 Maribor

² Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska ulica 8, 2000 Maribor

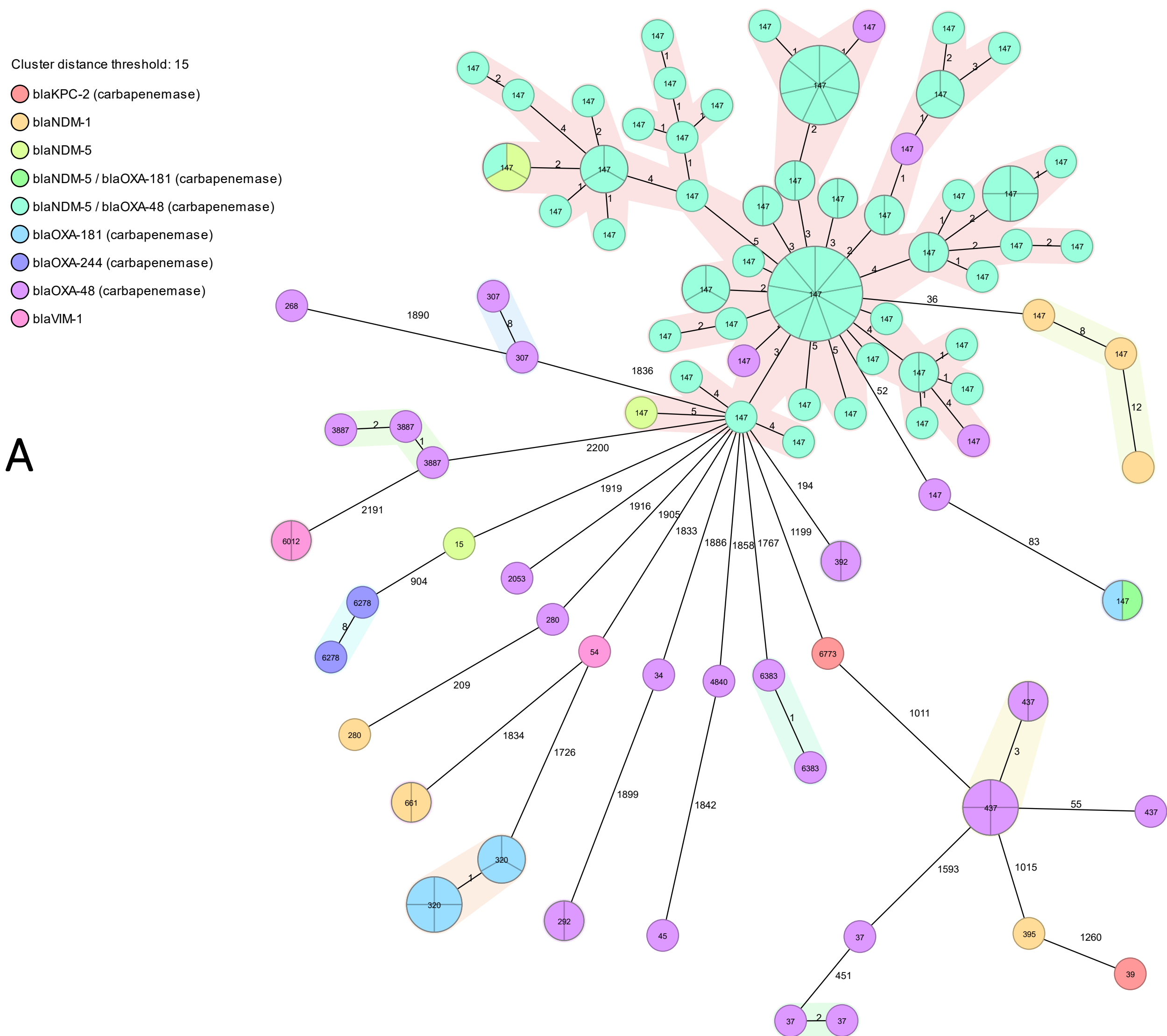
sandra.janezic@nlzoh.si

Uvod

Odpornost bakterij proti antibiotikom ostaja pomemben javnozdravstveni in klinični problem, tako v Sloveniji kot tudi globalno. Ker odpornost mikroorganizmov ni problem samo pri ljudeh, ampak sega tudi na področje veterine in okolja, se morajo ukrepi za zmanjševanje odpornosti mikroorganizmov obravnavati medsektorsko. V Sloveniji je zato bila sprejeta *Državna strategija »eno zdravje« za obvladovanje odpornosti mikrobov (2019-2024) z akcijskim načrtom*, ki obravnava problematiko širjenja večkratno odpornih bakterij (VOB) predvsem na področju humane in veterinarske medicine ter deloma v okolju (1).

V sinergiji z državno strategijo, v projektu »SLOSEQ – Konsolidacija in integracija sekvenciranja celotnega genoma v rutinski monitoring v Sloveniji«, naslavljamo vprašanja širjenja VOB v humani medicini s pristopi sekvenciranja in analizami genomskih zaporedij (2), pri čemer dajemo prednost VOB v skladu s strateškimi okviri ECDC (3), prednostnim seznamom WHO (4) in nacionalnimi potrebami.

V nadaljevanju predstavljamo prve rezultate genomskih analiz za štiri bakterijske vrste, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa*.

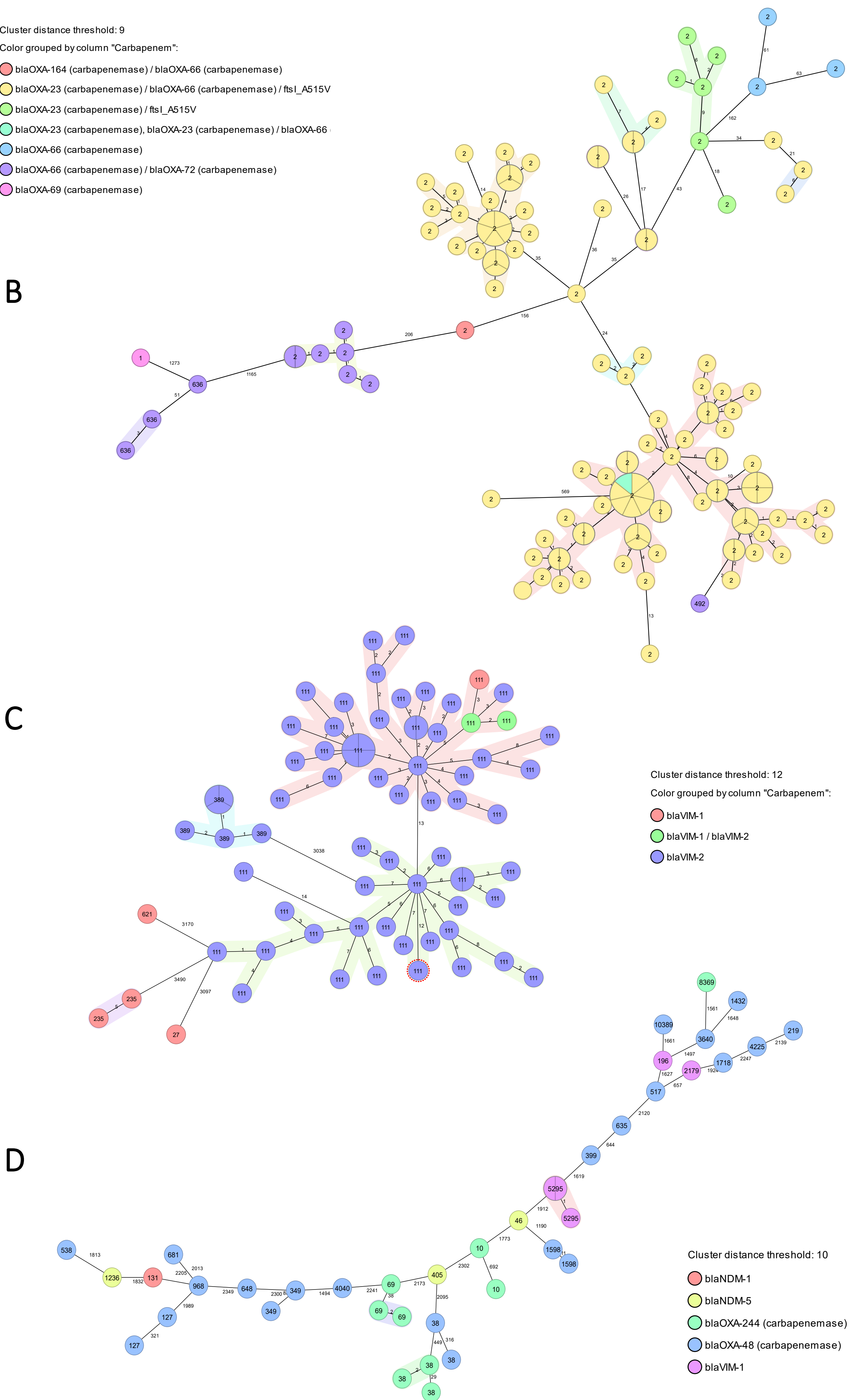


Rezultati in zaključki

Rezultati projekta dajejo prve pomembne vpoglede v razširjenost in mehanizme odpornosti pri izbranih proti karbapenemom odpornih bakterijah, ki izločajo karbapenemaze v Sloveniji.

Pri vseh vrstah (Slika 1-A, B, C), razen *E. coli* (Slika 1-D), je opazno klonalno razširjanje, tako znotraj posameznih regij kot med regijami (ni prikazano).

Med geni, ki posredujejo odpornosti proti karbapenemom, so najpogostejši *bla*NDM-5/*bla*OXA-48 pri *K. pneumoniae*, *bla*OXA-48 pri *E. coli*, *bla*VIM-2 pri *P. aeruginosa* in *bla*OXA-23 pri *A. baumannii* (Slika 1 A-D).



Metode

Izolati	V analizo smo vključili proti karbapenemom odporne izolate <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>A. baumannii</i> in <i>P. aeruginosa</i> , ki izločajo karbapenemaze (CR-CP in CP), iz diagnostičnih laboratorijev Centra za medicinsko mikrobiologijo (Maribor, Celje, Kranj, Koper, Murska Sobota in Novo mesto) v NLZOH. Proti karbapenemom odporne po Gramu negativne bakterije je Svetovna zdravstvena organizacija uvrstila med bakterije s kritično prioriteto.
Sekvenciranje in analiza genomskih zaporedij	Genome izolatov smo sekvencirali na platformi NextSeq2000 (Illumina). Knjižnice za sekvenciranje smo pripravili s kitom NEBNext Ultra II FS DNA library Prep Kit (NEB). Obojestranske odčitke smo sestavili <i>de novo</i> (po obdelavi s programom Trimmomatic) s SPAdes. Za osnovno statistično analizo sestavljenih genomov smo uporabili program QUAST. Izolatoma smo s tipizacijo MLST določili sekvenčne tipe (MLST-ST), s programom Ridom SeqSphere+, z MLST shemo, ki gostuje na PubMLST (https://pubmlst.org/). Sorodnost izolatov smo določili na osnovi gručenja, s pristopom primerjave alelnega profila jedrnega genoma, cgMLST (»core genome« MLST). Sorodnost izolatov je prikazana v obliki minimalnega vpetega drevesa (MST). Nabor genov in točkovnih mutacij v genomu, ki so povezani z odpornostjo proti različnim skupinam antibiotikov, smo določili s programom AMRFinderPlus (del progama SeqSphere+).

Literatura

- <https://www.gov.si/novice/nov-vlada-sprejela-drzavno-strategijo-eno-zdravje-za-obvladovanje-odpornosti-mikrobov-2019-2024-z-akcijskim-nactrom-za-obdobje-2019-2021/>;
- <https://www.nlzoh.si/programi-in-projekti/sloseq/>
- <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-strategic-framework-integration-molecular-and-genomic-typing-european>;
- <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-EMP-IAU-2017.12>

Slika 1. Minimalna vpeta drevesa, ki prikazujejo gručanje izolatov, A) *K. pneumoniae*, B) *A. baumannii*, C) *P. aeruginosa* in D) *E. coli*, na podlagi primerjave alelnega profila cgMLST. En krogec predstavlja enega ali več izolatov (v istem krogu so navedeni izolati, ki se ne razlikujejo v nobenem alelu, velikost kroga je sorazmerna številu izolatov). Številke znotraj krogecev označujejo MLST-ST. Številke različnih alelov med izolati je prikazano ob črti, ki povezuje izolate. Z barvami so obdane klonalne gručice, v isto klonalno gručo se uvrščajo izolati z manj kot A) 15 aleli razlike pri *K. pneumoniae*, B) 9 aleli razlike pri *A. baumannii*, C) 12 aleli razlike pri *P. aeruginosa* in d) 10 aleli razlike pri *E. coli*. Barva kroga predstavlja tip karbapenemaze (glejte barvne legende ob sliki).