

Jana Kozáková, Zuzana Okonji, Jana Zavadilová, Ludmila Nováková, Michal Honskus, Sandra Vohrnová, Martin Musílek, Pavla Křížová

Oddělení bakteriálních vzdušných nákaz, Státní zdravotní ústav, Praha

Více informací na: jana.kozakova@szu.cz



ÚVOD

Projekt HERA2CZ je pokračovatelem předešlého projektu HERA. Zkušenosti z nedávné pandemie způsobené onemocněním covid-19 potvrdily důležitost genomické surveillance infekčních chorob pro ochranu veřejného zdraví. V současné době nejpřesnějším a celosvětově nejvíce využívaným přístupem je metoda celogenomového sekvenování (WGS), která stanovuje kompletní DNA sekvenci genomu cílového organismu, což napomáhá rychlé identifikaci ohniska výskytu nákaz a umožňuje lepší porozumění způsobu šíření infekčních chorob. To poskytuje orgánům ochrany veřejného zdraví možnost rychlejší reakce na výskyt nákazy a případný monitoring dalšího šíření. Cílem WP4 (VACPREV) projektu HERA2CZ je zavedení metody WGS do rutinní praxe v Národních referenčních laboratořích (NRL), které jsou zodpovědné za surveillance onemocnění způsobených meningokoky, pneumokoky, hemofilu a *B. pertussis*. WGS data rovněž umožňují účast na nových mezinárodních projektech např.: genomická surveillance invazivních meningokokových onemocnění v EU/EHP, IRIS (Invasive Respiratory Infection Surveillance) a EMERT II (European Meningococcal Epidemiology in Real Time), které navazují na strategický dokument ECDC o evropské implementaci genomické surveillance infekčních onemocnění. Zavedení WGS a sdílení získaných dat na národní i mezinárodní úrovni přispěje k rychlejšímu sdílení údajů a většímu propojení mezi evropskými státy. Projekt HERA2CZ se dále zabývá zpřesněním metod založených na WGS datech a začlenění těchto metod do rutinního genomického dohledu nad vybranými infekčními nemocemi. Tento poster prezentuje dílčí výsledky WP4 projektu HERA2CZ.

VÝSLEDKY

Neisseria meningitidis

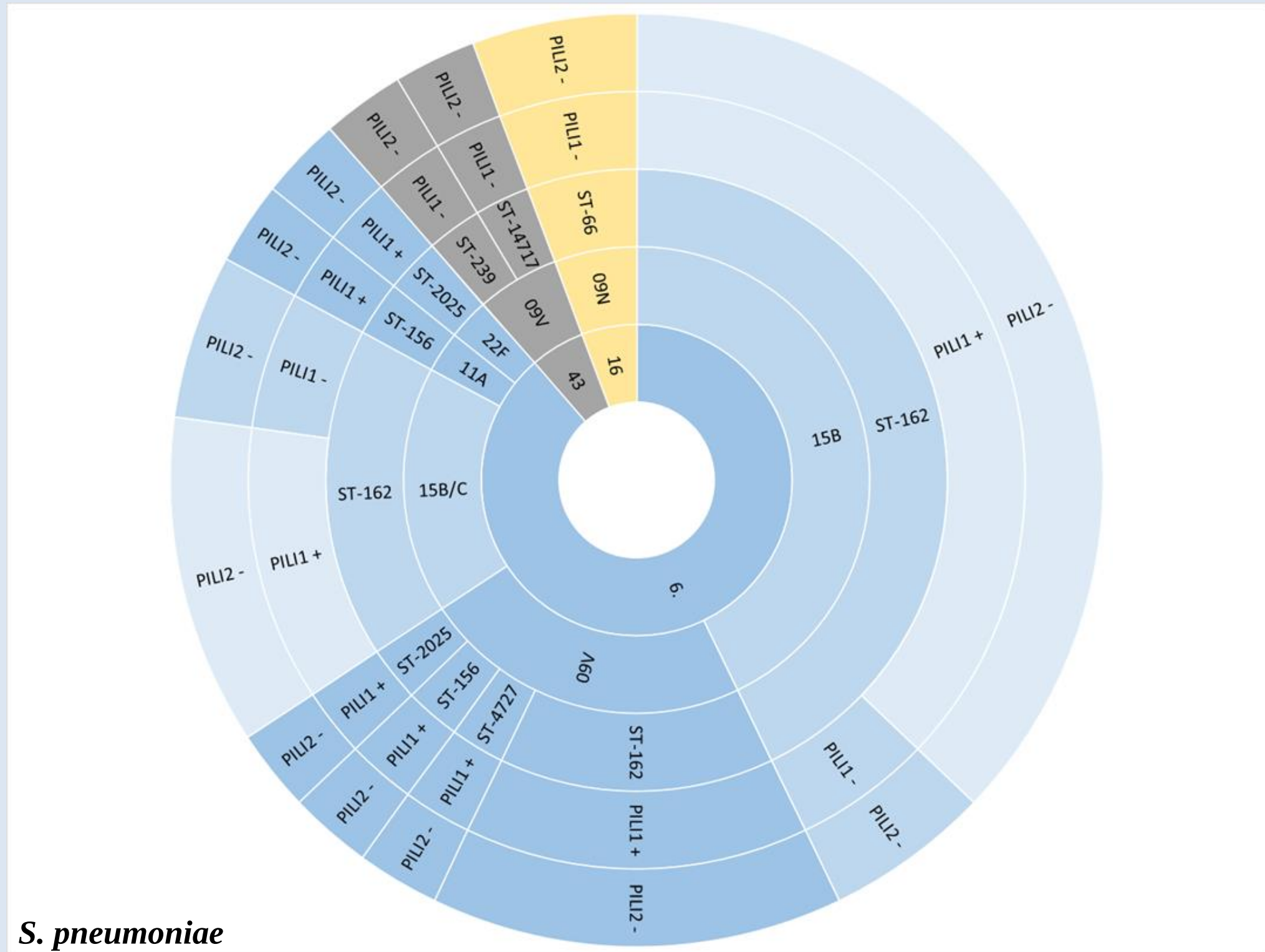
V důsledku zavedení epidemiologických opatření proti pandemii onemocnění covid-19, došlo v letech 2020-2022 k poklesu počtu infekčních onemocnění přenášených vzdušnou cestou, včetně invazivního meningokokového onemocnění (IMO). Do fylogenetické analýzy s využitím WGS dat byly zařazeny všechny izoláty *Neisseria meningitidis* (celkem 126) z IMO z České republiky, které byly zaslány do NRL mezi lety 2018-2024. Analýza prokázala, že v průběhu covidového období (2020-2022) došlo ke změně populace meningokoků. U izolátů MenACWY lze sledovat postupný a výrazný pokles celkové heterogenity – z 10 různých klonálních komplexů zachycených mezi lety 2018-2019 na pouhé 3 v post-covidových letech 2023-2024 (cc11, cc23 a cc103). Zároveň byla zjištěna významná redukce izolátů C; cc11, které v České republice v pre-covidových letech výrazně a dlouhodobě dominovaly. U izolátů MenB lze naopak pozorovat nárůst celkové heterogenity během období pandemie covid-19 a její opětovnou redukci na celkově nejnižší hodnoty v post-covidovém období. Toto snížení heterogenity výrazně změnilo strukturu populace izolátů MenB působících IMO v České republice. Izoláty *N. meningitidis* z post-covidových let (2023-2024) jsou na obrázku zvýrazněny a barevně odlišeny podle séroskupiny.

Haemophilus influenzae

V rámci projektu HERA2CZ bylo celogenomově osekvenováno 56 izolátů *Haemophilus influenzae*. Pro účely fylogenetické analýzy bylo vybráno 47 izolátů: 35x *H. influenzae* netypovatelný (NT), 8x *H. influenzae* sérotypu B, 3x *H. influenzae* sérotypu F, 1x *H. influenzae* sérotypu A. K českým izolátům bylo v rámci fylogenetické analýzy připojeno 340 invazivních izolátů *H. influenzae* z dalších evropských zemí (Portugalsko, n = 218; Francie, n = 105; Norsko, n = 9; Velká Británie, n = 5; Švédsko, n = 1; Dánsko, n = 1; Irsko, n = 1), které byly dostupné v databázi PubMLST. Všechny izoláty pocházejí z let 2020-2025. Fylogenetická analýza na úrovni cgMLST (1037 lokusů) prokázala, že opouzdřené izoláty *H. influenzae* tvoří samostatné, vysoce homogenní linie, které nejsou příbuzné k liniím neopouzdřených izolátů ani k sobě navzájem. S jedinou výjimkou patří všechny evropské izoláty *H. influenzae* A ke klonálnímu komplexu cc23, izoláty *H. influenzae* F patří výhradně k cc124 a pro izoláty *H. influenzae* B je typický cc6. Oproti tomu neopouzdřené izoláty patří k mnoha různým klonálním komplexům a na fylogenetické síti vytvářejí velké množství vysoce heterogenních genetických linií s různou mírou vzájemné příbuznosti.

Bordetella pertussis

Celogenomová sekvenace proběhla u 33 kmenů *Bordetella pertussis*, které byly izolovány v České republice v epidemickém roce 2024. Všechny izoláty byly přiřazeny k sekvenčnímu typu ST-2, který patří do klonálního komplexu cc2. Přítomnost genu pro pertaktin byla potvrzena u 29 izolátů, u čtyř izolátů nebyl gen pro pertaktin nalezen. Pro porovnání genetické diverzity epidemických izolátů z roku 2024 byly využity dříve osekvenované české izoláty *B. pertussis* z let 2019, 2020 a 2023, které patřily rovněž k ST-2. Fylogenetická analýza (3592 lokusů) prokázala, že izoláty formují dvě geneticky odlišné subpopulace. Jednu subpopulaci tvoří všechny izoláty z roku 2024 (n = 33) a jeden izolát z roku 2023. Druhá subpopulace je tvořena izoláty z let 2019 (n = 7) a 2020 (n = 13). Pomocí WGS dat bylo možné rozlišit homogenní populaci českých izolátů *B. pertussis* ST-2 a prokázat, že izoláty z roku 2024, které způsobily na našem území epidemii, jsou geneticky odlišné od izolátů *B. pertussis* z let 2019-2020.

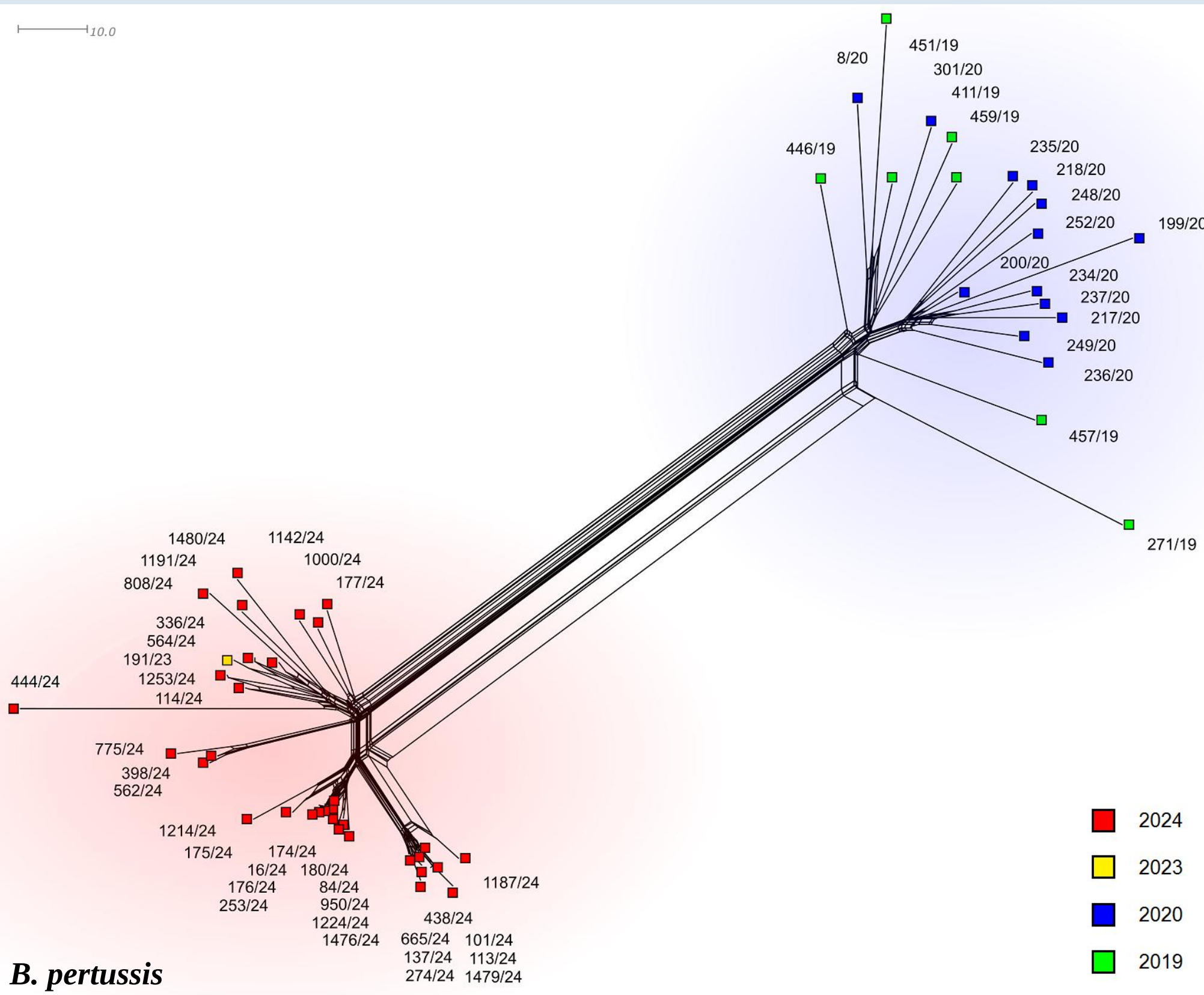
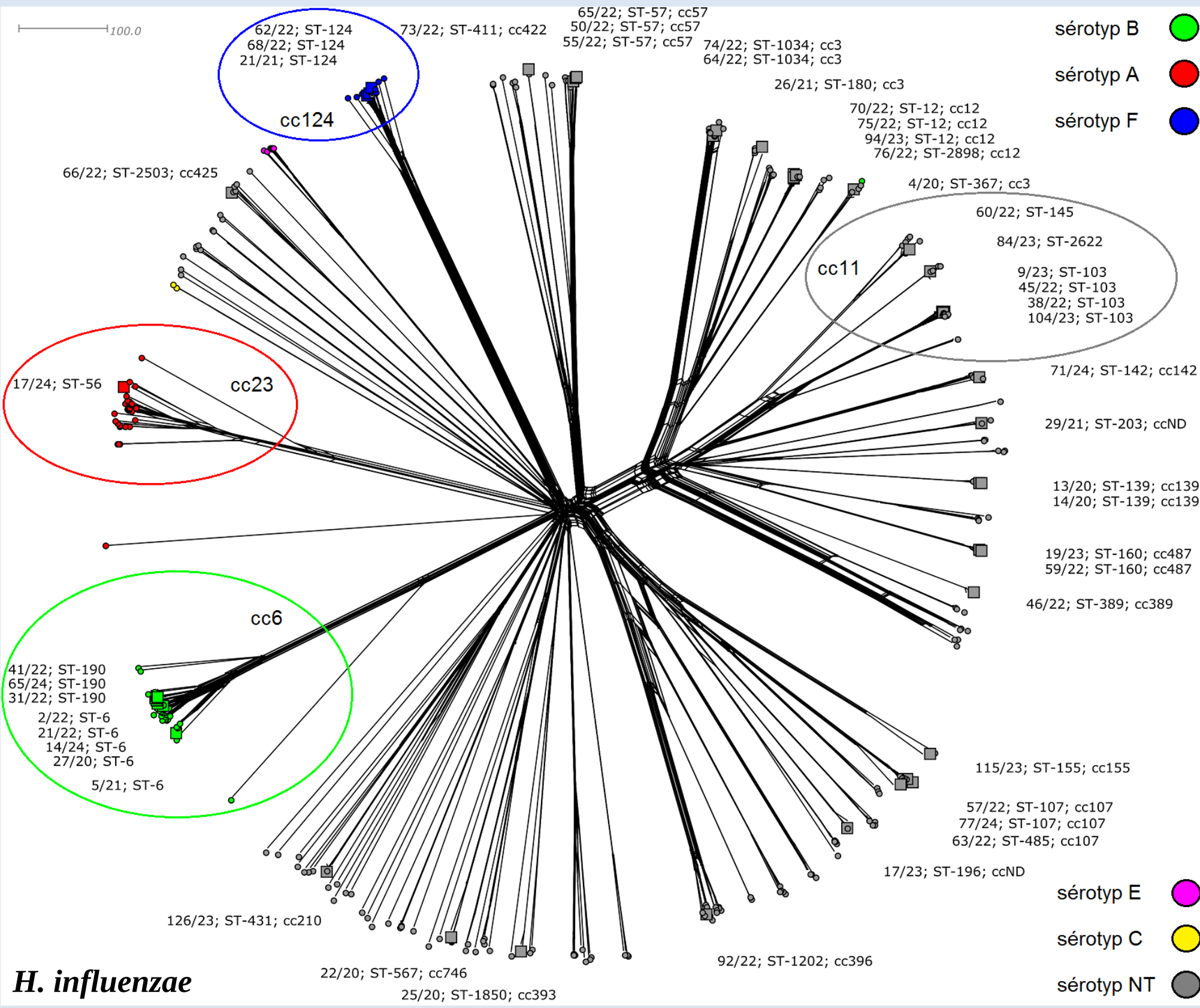
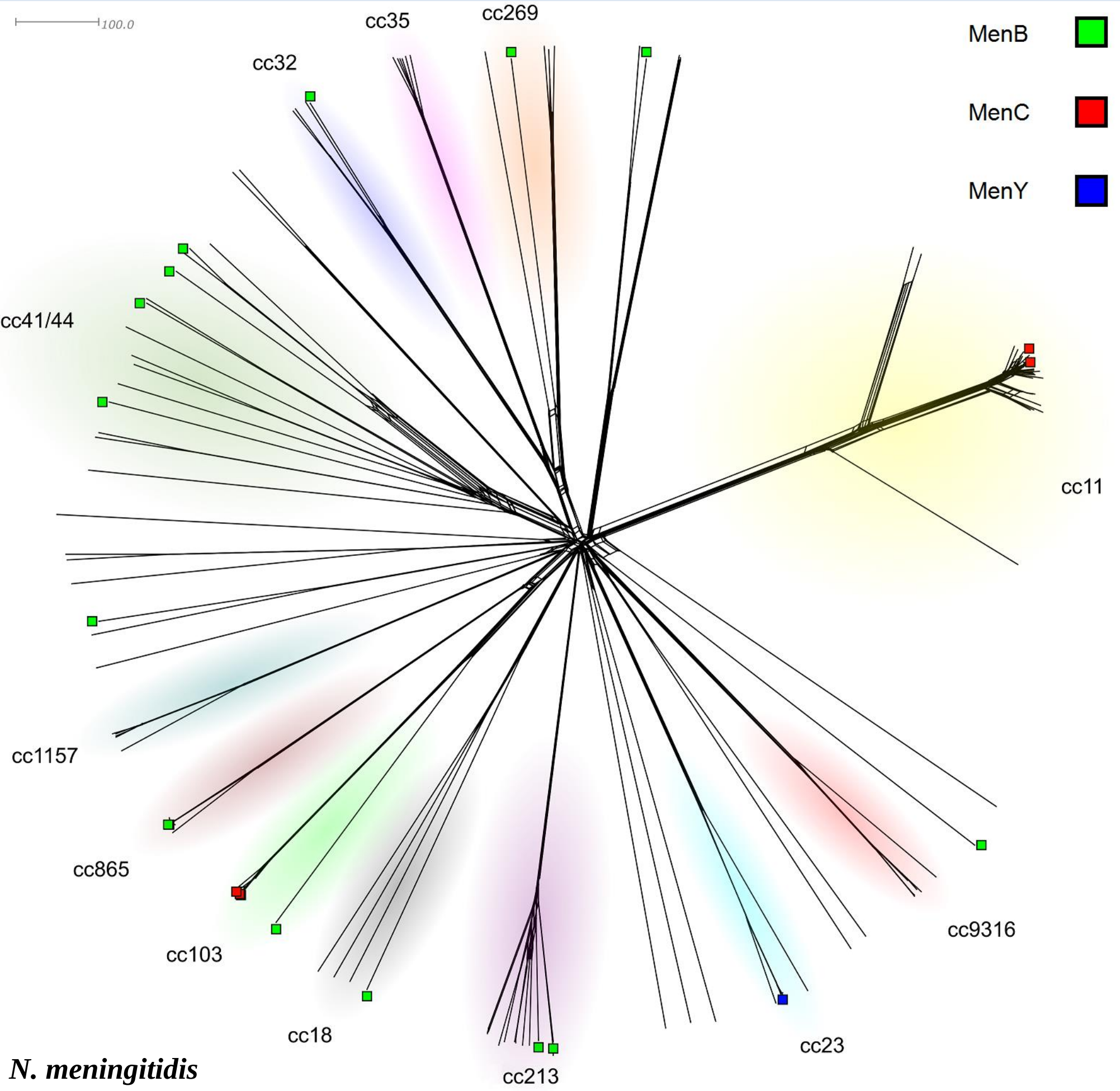


Streptococcus pneumoniae

Celogenomová data vybraných izolátů *Streptococcus pneumoniae* byla analyzována pomocí GPS Pipeline, kdy byl u izolátů určen GPSC (Global Pneumococcal Sequencing Cluster), sérotyp, sekvenční typ (ST) a dále byla zjišťována přítomnost genů pro Pilus-1 a Pilus-2, což jsou faktory virulence *S. pneumoniae* umožňující adhezi ke slizničnímu epitelu a potencující patogenizi onemocnění. GPSC je typizace používaná pro bakterie *S. pneumoniae* umožňující na rozdíl od sérotypu rozeznat skupiny izolátů, které v genomu nesou geny pro antibiotickou rezistenci, geny k tvorbě faktorů virulence či skupiny izolátů mající sklon k tzv. serotype replacementu. Byla provedena analýza celkem 35 izolátů *S. pneumoniae* patřící ke třem GPSC - 31 izolátů patřilo ke GPSC6, 2 izoláty ke GPSC16 a 2 izoláty ke GPSC43. Tyto tři GPSC obsahovaly 5 sérotypů – 2x 9N, 10x 9V, 1x 11A, 21x 15B z toho 6x 15B/C, 1x 22F. Na přiloženém grafu jsou zobrazeny GPSC a k nim přiřazené sérotypy, a dále výsledek ST a výsledek testování přítomnosti genů pro Pilus-1 a Pilus-2. Analyzováno bylo 21 izolátů sérotypu 15B. Sérotyp je v NRL pro streptokokové nákazy určován pomocí kombinace PCR a následné Quellung reakce, sérotyp 15B není pomocí metody Quellung rozlišitelný od sérotypu 15C, spolehlivou metodou rozlišující tyto sérotypy je celogenomová sekvenace. Analýzou celogenomových dat bylo zjištěno, že 6 izolátů určených Quellung reakcí jako 15B je co do genové výbavy sérotypu 15C. Všechny izoláty 15B (15B/C) patří ke GPSC6 a ST-162, všechny mají negativní gen pro Pilus-2, ale gen pro Pilus-1 je u části izolátů pozitivní a u části negativní. Skupina izolátů sérotypu 9V se řadí ke dvěma různým GPSC (GPSC6 a GPSC43) a šesti různým ST. U izolátů sérotypu 9V GPSC43 nebyly zjištěny geny pro Pilus-1 a Pilus-2. Skupina izolátů sérotypu 9V GPSC6 má pozitivní gen pro Pilus-1.

MATERÁL A METODY

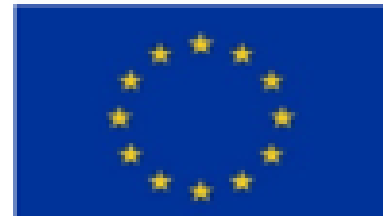
Metoda WGS byla realizována na platformě Illumina MiSeq. K základnímu zpracování WGS dat principem *de novo* assembly byl použit software Velvet *de novo* Assembler. Výsledné genomy bakteriálních izolátů byly nahrány do mezinárodních databází, které využívají platformy BIGSdb (PubMLST, BIGSdb-Pasteur) a ve kterých jsou veřejně dostupná. Díky systému automatického skenování jsou u každého genomu označeny známé alelové varianty druhově specifických genů, včetně genů multilokusové sekvenční typizace (MLST). Kombinace alelových variant MLST genů následně stanoví sekvenční typ izolátu a příslušnost ke klonálnímu komplexu (cc). Výše uvedené databáze zprostředkovávají také základní analýzu a vzájemné porovnání genomů pomocí softwaru Genome Comparator. Tato analýza může probíhat na širokém spektru rozlišení (MLST, rMLST, cgMLST) a umožňuje i srovnávání s izoláty z celého světa, které jsou v databázi PubMLST dostupné. Genome Comparator produkuje distanční matice, které jsou založené na počtu a alelické variabilitě všech analyzovaných lokusů u každého z analyzovaných izolátů. Na základně těchto matic jsou poté generovány fylogenetické sítě softwarem SplitsTree4.



ZÁVĚRY

Přestože WGS je velice účinnou metodou, je náročnější na zdroje ve srovnání s jinými sekvenčními metodami. Proces sekvenování celého genomu generuje velké množství dat, což představuje značné nároky na moderní technologickou výbavu a dostatečné výpočetní a analytické kapacity. Správa, sdílení a archivace WGS dat vyžaduje datové kapacity, pravidelnou údržbu systému a zabezpečení. Projekt HERA2CZ se zaměřuje na zvýšení celogenomové sekvenční kapacity v rámci jednotlivých NRL Státního zdravotního ústavu v Praze a rozšíření spektra WGS charakterizace na různé lidské patogeny, čímž nejen zvyšuje schopnosti monitorování infekčních chorob, ale také posiluje koordinační a reakční mechanismy systémů ochrany veřejného zdraví napříč Evropou. Zvýšením kapacity pro WGS sekvenaci a zpřesněním metodiky přispívá projekt HERA2CZ ke zlepšení systému ochrany veřejného zdraví a umožňuje detekci hrozbby přeshraničního šíření infekčních onemocnění.

Projekt „Genomická surveillance vybraných infekčních nemocí v České republice“ (HERA2CZ) je spolufinancován Evropskou unií. Prezentované názory a postoje však představují pouze názory autorů a nemusí nutně odrážet názory a postoje Evropské unie nebo Evropské výkonné agentury pro zdraví a digitální oblast (HaDEA). Ani Evropská unie, ani Evropská výkonná agentura pro zdraví a digitální oblast (HaDEA) za ně nemohou nést odpovědnost.



Co-funded by the European Union

