

# NRL pro salmonely – typizace



Státní zdravotní ústav

Šrobárova 49/48

Praha 10, 100 00

[ondrej.daniel@szu.cz](mailto:ondrej.daniel@szu.cz), [andrea.mancikova@szu.cz](mailto:andrea.mancikova@szu.cz)

**Telefon (pevná linka): 267082216**



Co-funded by the  
European Union

# **Genomic surveillance of selected infectious diseases in the Czech Republic**

HERA2CZ

# Přehled prezentace

- Typizační metody používané v NRL
- Celogenomová sekvenace
- Aplikace celogenomové sekvenace

# Salmonela - typizace

Co je typizace?

- jedná se o metodu identifikace bakterií
- zařazení kmenu pod úroveň poddruhu v případě salmonel

Proč se typizuje?

- zjištění agens či zdroje
- provádění opatření v ohnisku onemocnění
- účinné kontroly infekčních onemocnění

**esenciální je spolupráce mezi  
epidemiology a mikrobiology**

# Typizační metody používané v NRL

- Sérotypizace
- Pulzní gelová elektroforéza
- MLVA typizace
- Celogenomová sekvenace

**WHO launches guide on whole genome sequencing use as a tool for foodborne disease surveillance and response**

7 November 2023 | Departmental news | Geneva | Reading time: 1 min (273 words)



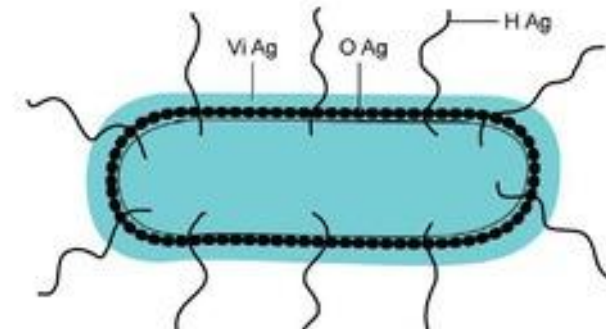
**PFGE**  **WGS**

Pulsed-Field Gel Electrophoresis || **Whole Genome Sequencing**

# Sérotypizace

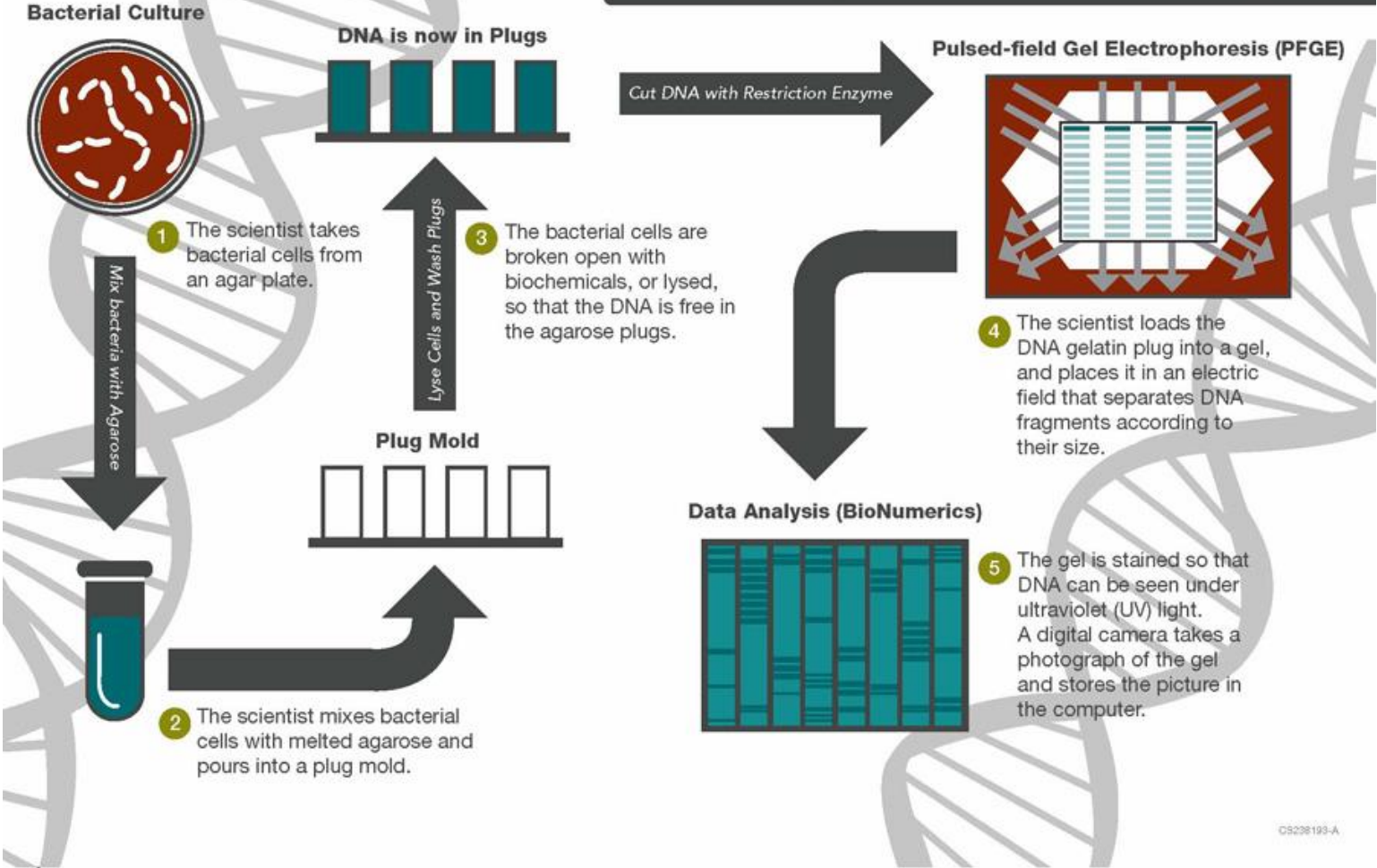
- Metoda – sklíčková aglutinace (O a H antigen)  
– (MALDI-TOF MS: pouze *Salmonella* species)
- White-Kauffmann-Le Minor schéma (9. edice, r. 2007; Supplement no. 48, 2014 - **2659 sérotypů**)
- Dělení dle O skupin (A-Z), nověji (O:2 – O:67)

Antigenic Structures of Salmonellae Used in Serologic Typing



# PFGE

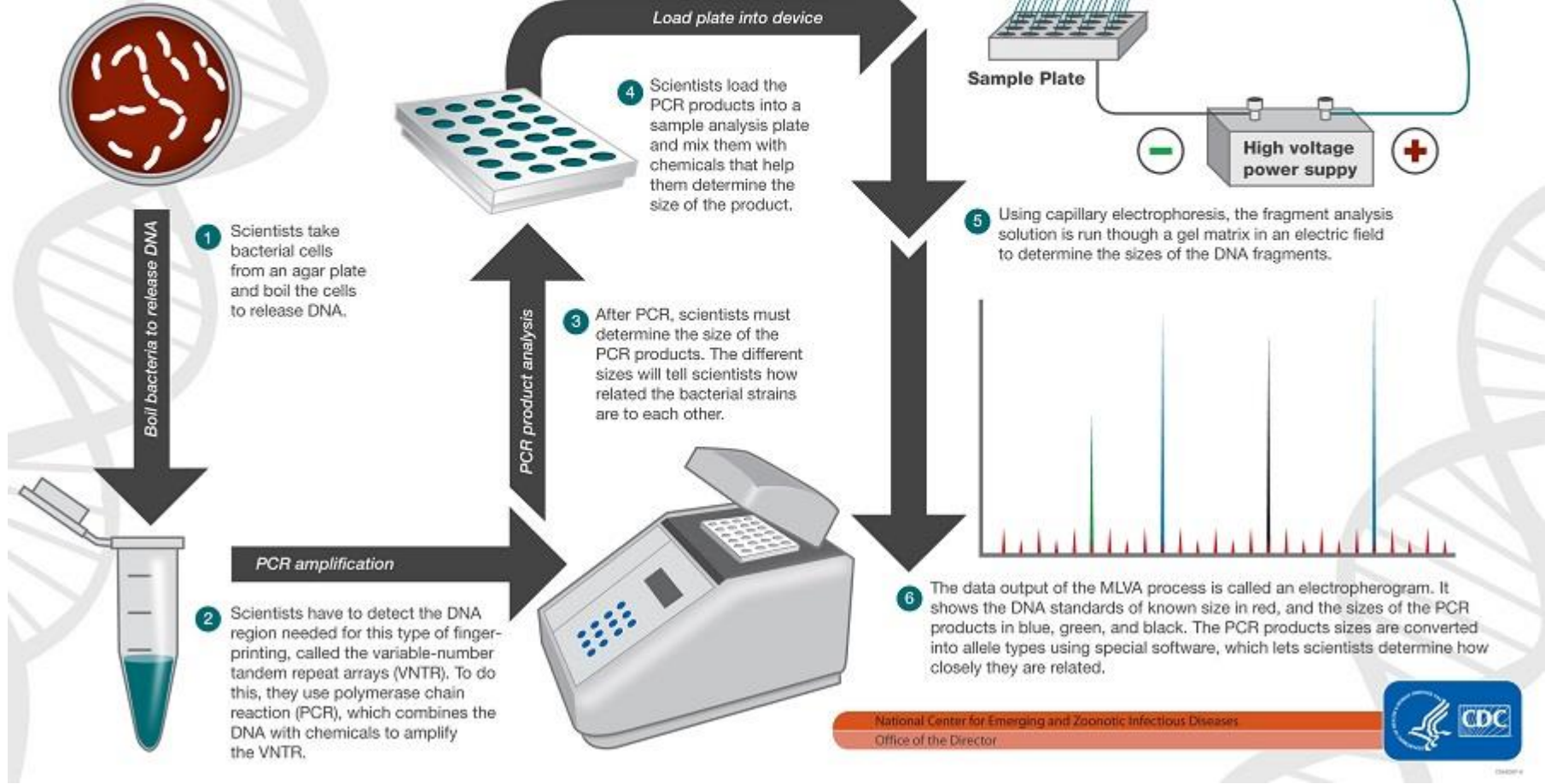
## The Pulsed-field Gel Electrophoresis Process



## MLVA Process

(Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis)

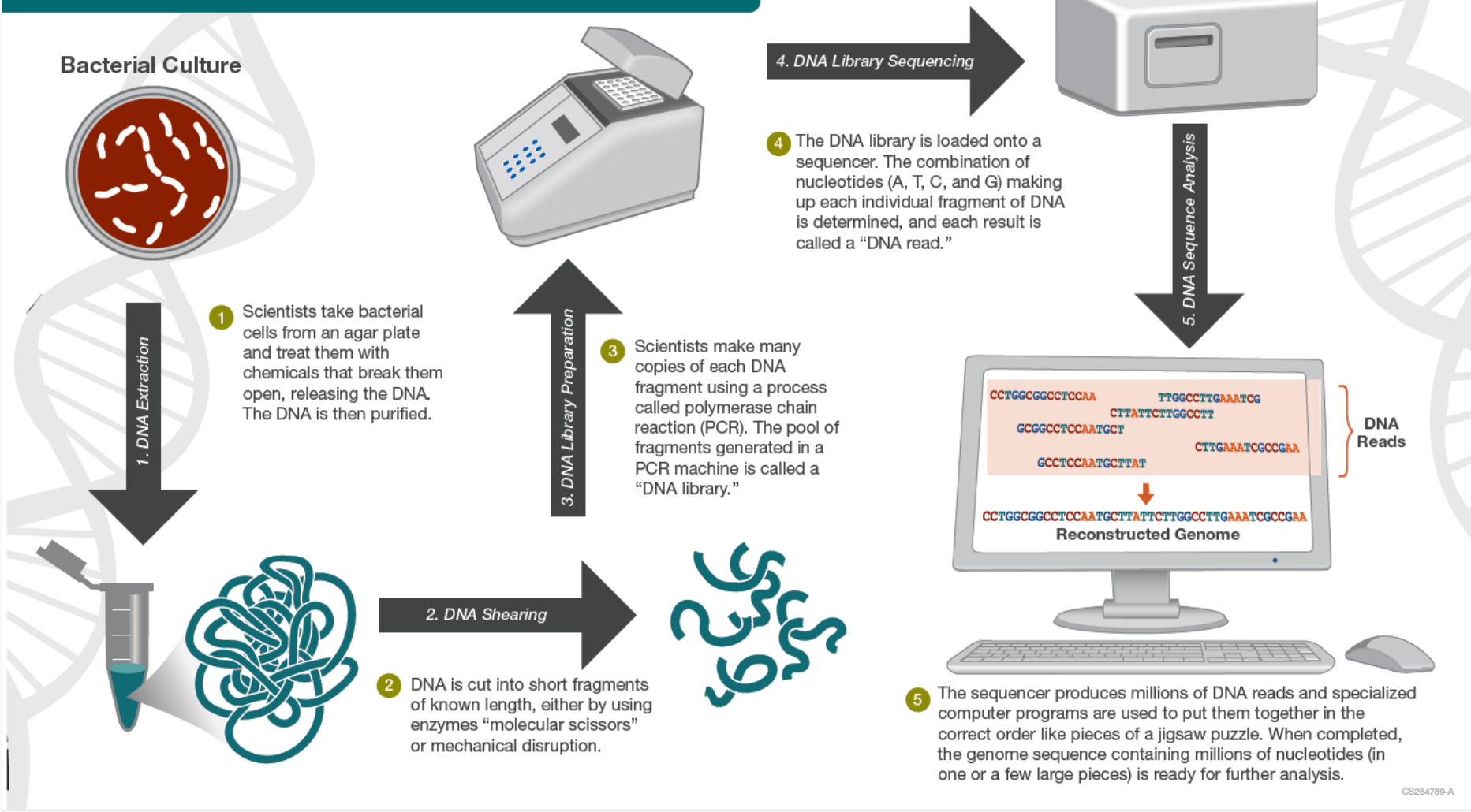
### Bacterial Culture





## The Whole Genome Sequencing (WGS) Process

WGS is a laboratory procedure that determines the order of bases in the genome of an organism in one process. WGS provides a very precise DNA fingerprint that can help link cases to one another allowing an outbreak to be detected and solved sooner.





## Sekvenování - definice

- **Sekvenace** - metody, které umožňují popsat pořadí nukleotidů v určitém úseku přímo (DNA) či nepřímo (RNA).
- **Sekvenování nové generace** - (z angl. *next generation sequencing* – **NGS**) je označení metod sekvenování, jehož podstatou je zpracování tisíců až miliard sekvencí v jednom běhu a využívá bioinformatické metody k jejich zpracování
- NGS umožňuje sekvenovat úseky nukleových kyselin až celých genomů rychleji a **cenově výhodněji** než ostatní sekvenační metody (Slabý O., 2015)

# Sekvenování – vývoj I

## 1) **sekvenování I. generace** = ABI

- Klasické sekvenování kapilární elektroforézou

## 2) **sekvenování II. generace** = Illumina (2011), Ion Torrent, BGI

- Sekvenování nové generace (Next generation sequencing)
- Masivní paralelní sekvenování krátkých fragmentů (High-throughput sequencing)

## 3) **sekvenování III. generace** = PacBio, ONT (2014)

- Sekvenování nové generace (Next generation sequencing)
- Sekvenace jedné molekuly (Single-molecule sequencing)



# Sekvenování – vývoj II

## 1) Sekvenování I. generace

- Vyžaduje velký počet kopií vstupního materiálu DNA jako templátu pro přípravu jednořetězců.

## 2) Sekvenování II. generace

- Templátem je jediná molekula, která je amplifikována pro získání dostatečného signálu a produkuje krátká čtení.

## 3) Sekvenování III. generace


- Templátem je jediná molekula, nevyužívá amplifikace za účelem zvýšení signálu a produkuje dlouhé čtení.

# Vybrané aplikace v bakteriologii a virologii

- detekce nových bakterií/virů
  - sekvenování celých bakter./virových genomů
  - charakteristika variability genomů bakterií/virů
  - sledování rezistence vůči atb/antivirotikům
  - šetření bakteriálních/virových epidemií (i HAI)
- v archívu sekvencí získaných celogenomovým sekvenováním se autorům podařilo odhalit kromě:
    - 9 nových koronavirů
    - 300 virů souvisejících s virem hepatitidy D
    - identifikovat části genomů téměř **132 tisíc** dosud neznámých virů

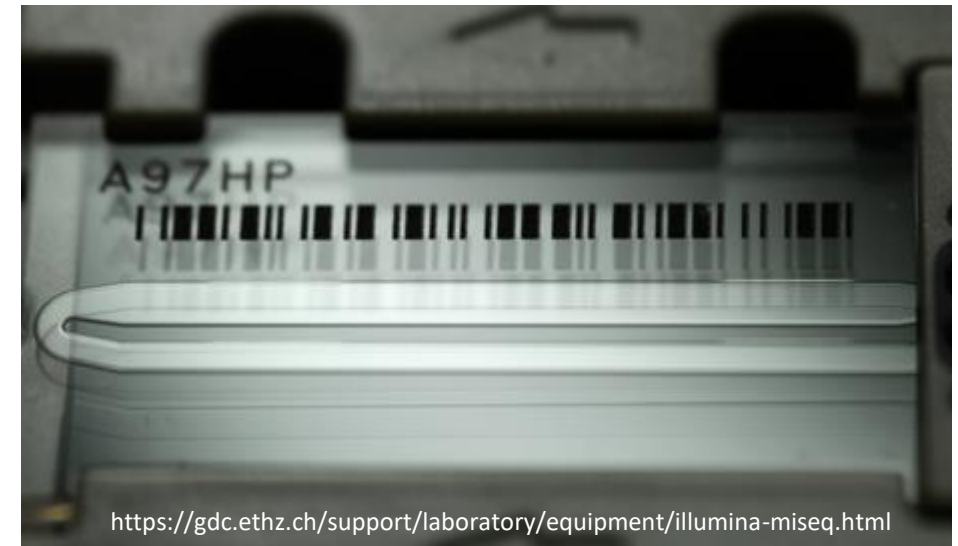
Article | Published: 26 January 2022

## Petabase-scale sequence alignment catalyses viral discovery

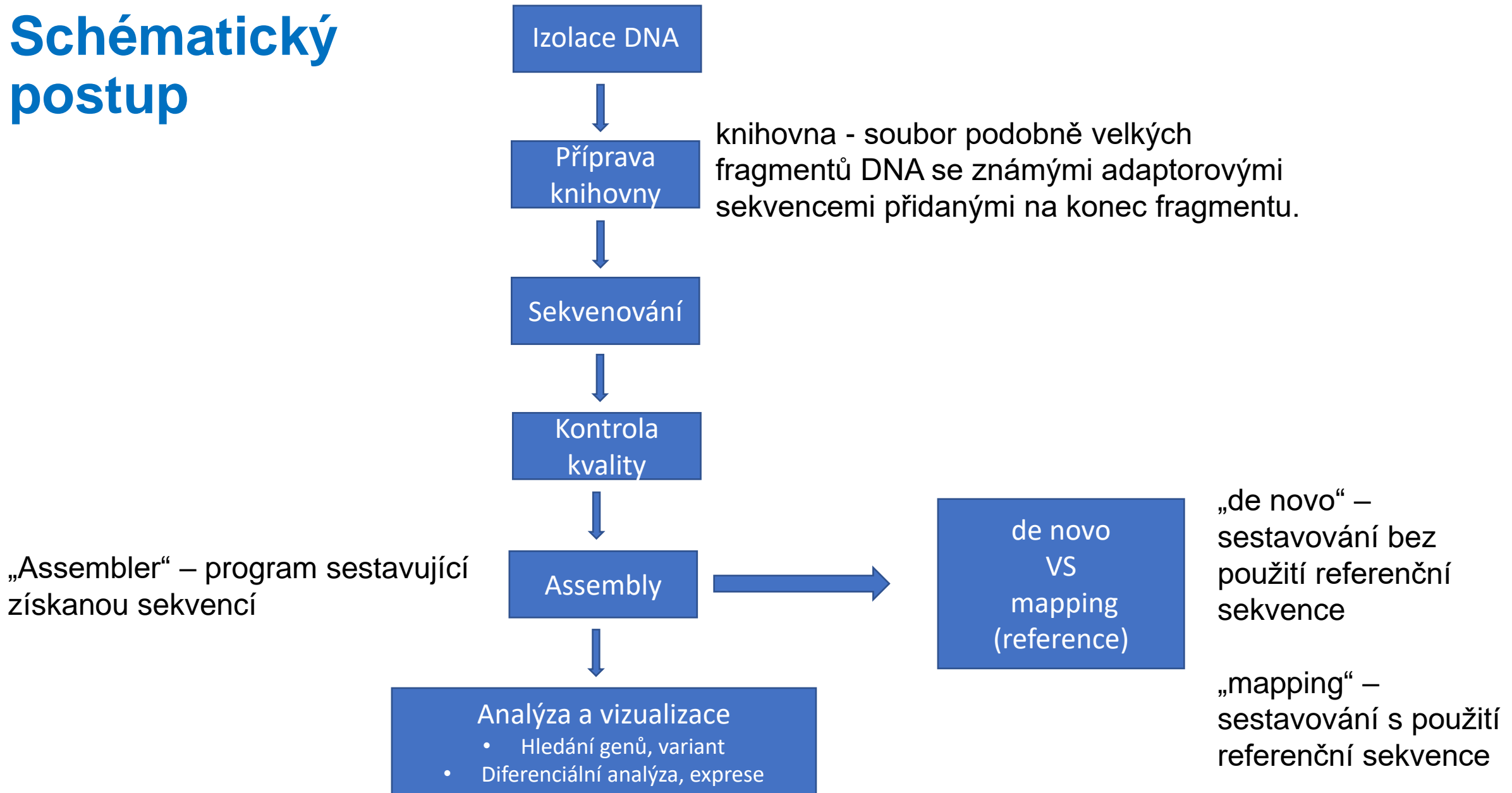
[Robert C. Edgar](#), [Jeff Taylor](#), [Victor Lin](#), [Tomer Altman](#), [Pierre Barbera](#), [Dmitry Meleshko](#), [Dan Lohr](#), [Gherman Novakovsky](#), [Benjamin Buchfink](#), [Basem Al-Shayeb](#), [Jillian F. Banfield](#), [Marcos de la Peña](#), [Anton Korobeynikov](#), [Rayan Chikhi](#) & [Artem Babaian](#) 

[Nature](#) (2022) | [Cite this article](#)

# MiSeq – II. generace

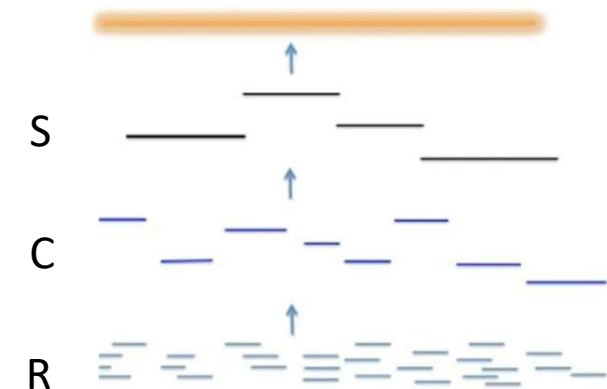
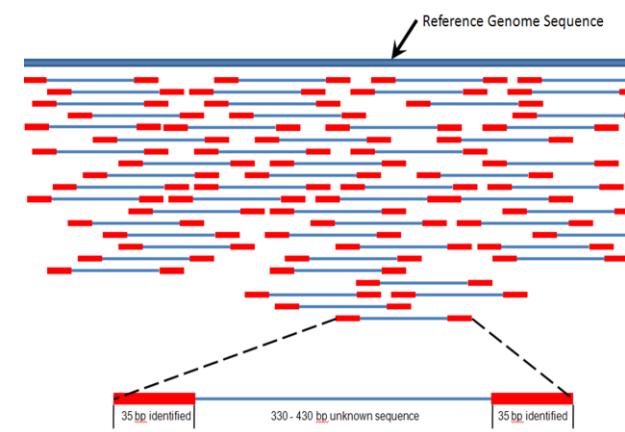


# Schématický postup



# Assembly a Assembler

- DNA je nasekána na malé kousky
- Tyto malé kousky jsou sekvenovány a všechny tyto krátké sekvence jsou uloženy v souborech s příponou fastq.gz
- Assembler vezme tyto krátké sekvence a znovu z nich sestaví původní sekvenci
  - **De novo assembly** = bez použití referenční sekvence
    - Používané programy (např. SPAdes, MASuRCA, Velvet)
    - propojování krátkých kousků do delších tzv. contigů („contiguous lengths of DNA“) a větších scaffoldu
  - **Mapping assembly** = s použitím referenční sekvence
    - Používané programy (např. BWA, BWA-MEM-Bowtie2)
    - scaffold sekvence složená z kontigů a známých mezer, které jsou spojeny dohromady počítačově (až scaffoldu)





# Aplikace v NRL pro Salmonely

- Typizace *Salmonella* sp. pro rozpoznání a řešení epidemických výskytů
- sérotypizace -> PFGE -> WGS (detekce ohnisek)



- **sekvenování celého genomu** – (z angl. *Whole Genome Sequencing* – **WGS**)
  - zachycuje změny sekvence DNA v celém genomu jednotlivých mikrobiálních izolátů
  - umožňuje přesný popis genetické příbuznosti izolátů

(+)

vyšší rozlišení a přesnost

stabilita vybraných genů v čase

(-)

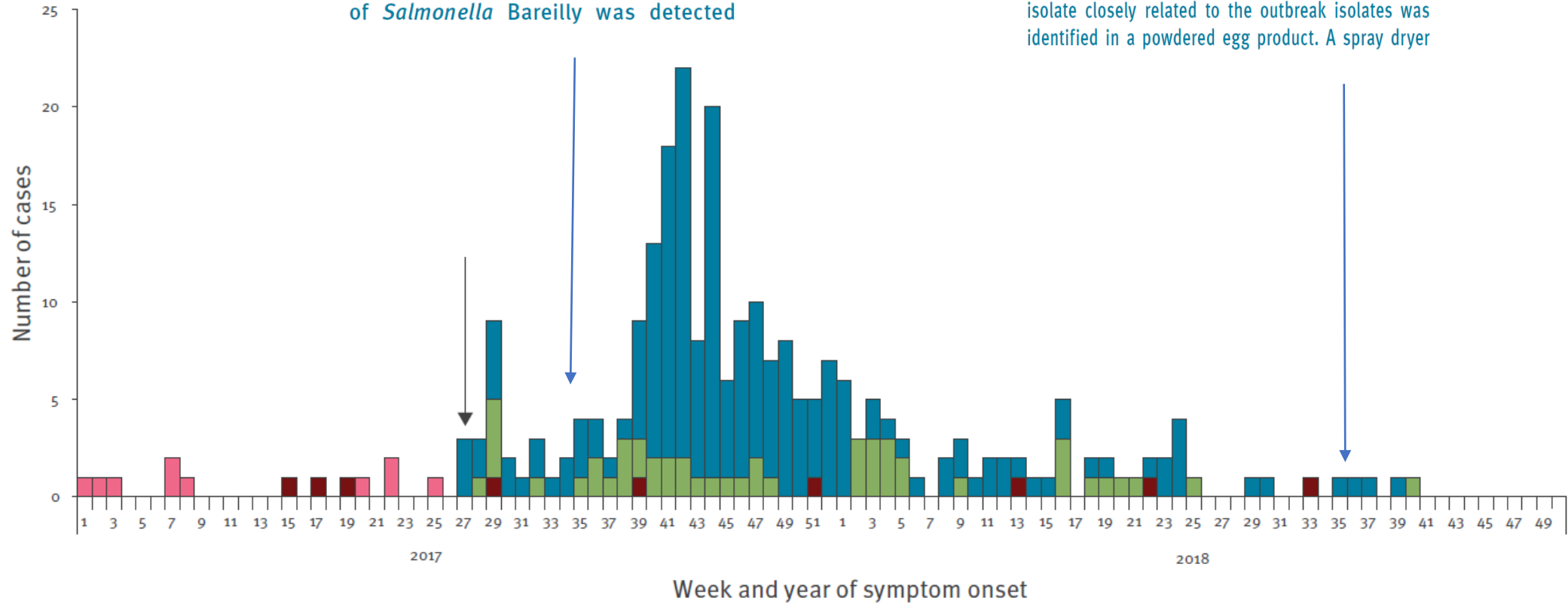
vyšší nároky na analýzu dat

větší množství dat

( $n = 325$ )

In August 2017, an increased incidence of *Salmonella* Bareilly was detected

unusual or imported foods. In September 2018, an isolate closely related to the outbreak isolates was identified in a powdered egg product. A spray dryer



Labská et al., 2021

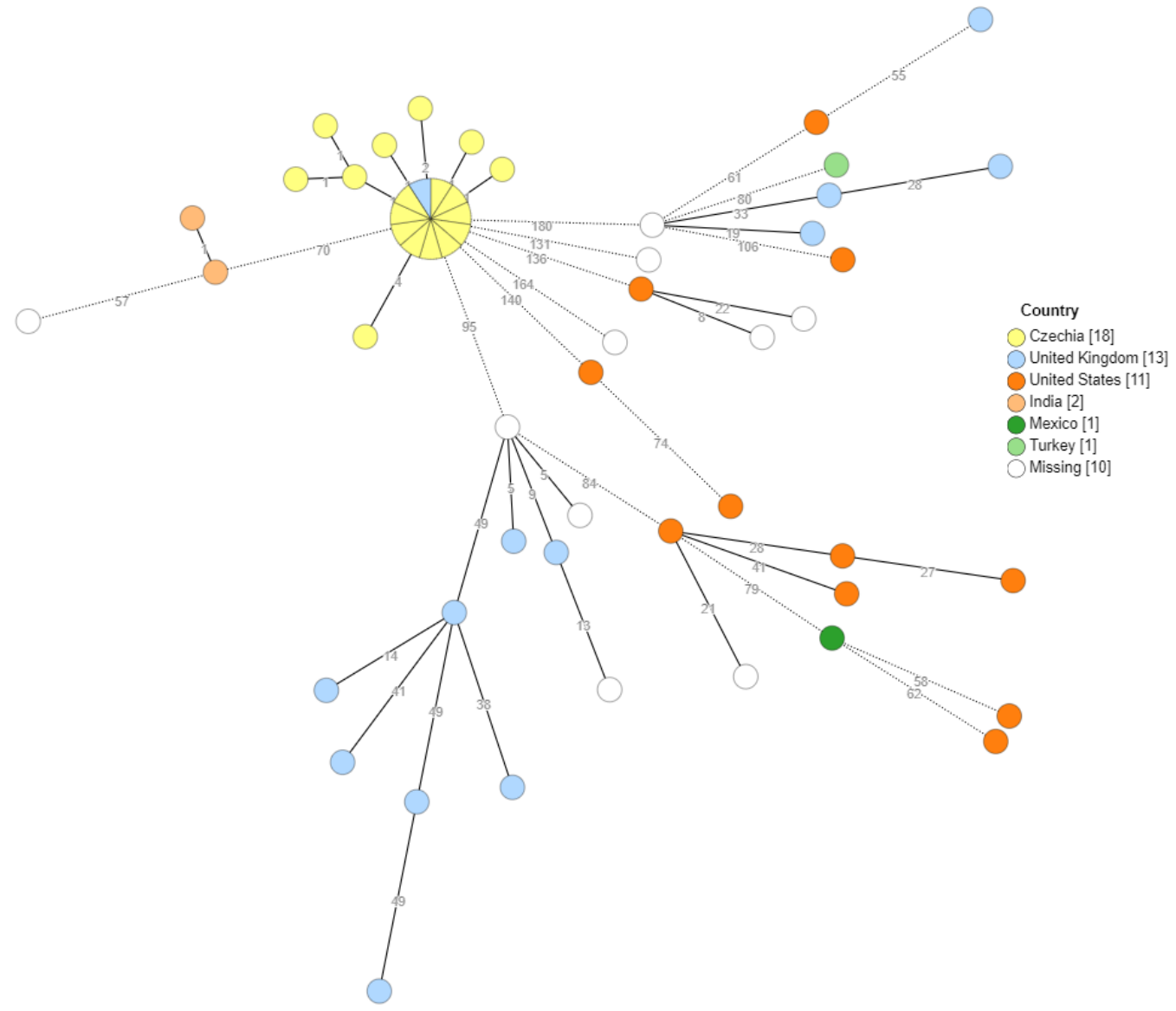
Case out of outbreak period

Confirmed case

Probable case

Non outbreak case

„Monoclonal point source outbreak“



Minimal Spanning Tree  
cgMLST schéma

# monofázická *Salmonella* Typhimurium

How global food safety 'disaster' was averted by scientists tracing salmonella-infected chocolate eggs to its source



On April 8, 2022, officials ordered the Belgian chocolate factory closed. Within two days, they had issued a global re-call of products. Stock image: Getty Images

# monofázická Salmonella Typhimurium

Kmen monof. S. Typhimurium rezistentní na:

- Ampicilin
- Kanamycin
- Tetracykliny

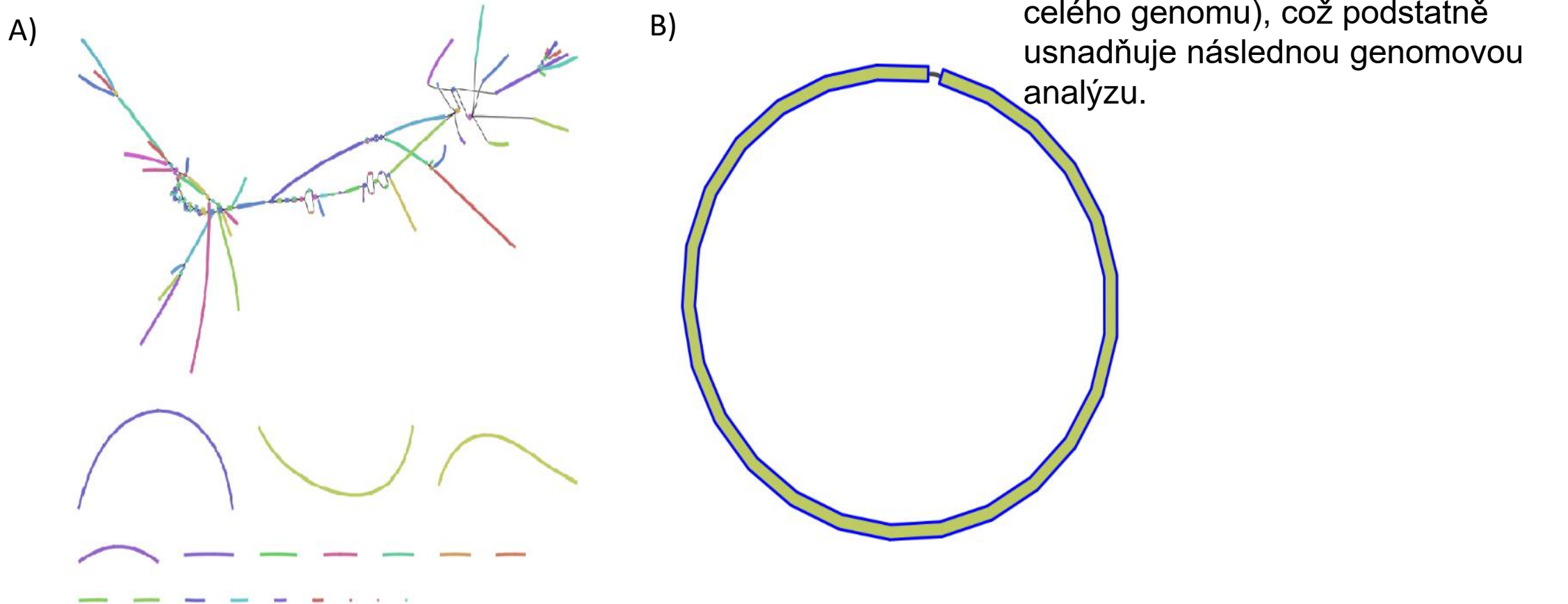
- Dále nesl mobilizovatelné geny



**Problematické pro jeho eradikaci**




# Sekvenace III. generace



**Obr. 1 :** Visualizace assembly grafů. A) Výsledné assembly z dat, která byla získána sekvenováním formou krátkého čtení (Illumina). B) Výsledné hybridní assembly získané z dat, která byla získána sekvenováním formou krátkého a dlouhého čtení (Illumina a Oxford Nanopore).

# Salmonella spp. (2023)

- Identifikace 3 klastrů *Salmonella* spp.
  - *Salmonella* Enteritidis (2x)
  - *Salmonella* Typhimurium (1x)
- Propagace do systému 
  - S. Typhimurium - [2023-FWD-00056](#)
  - S. Enteritidis - [2023-FWD-00072](#) - Comfort
  - S. Enteritidis - [2023-FWD-00073](#) - Adeba

# Děkuji za pozornost



Co-funded by the  
European Union

Project Genomic surveillance of selected infectious diseases in the Czech Republic (HERA2CZ) was Funded by the European Union. Views and opinions expressed are however those of the author(s) only and do not necessarily reflect those of the European Union or the European Health and Digital Executive Agency (HADEA). Neither the European Union nor the European Health and Digital Executive Agency (HADEA) can be held responsible for them.