

**Aplikace metod celogenomového sekvenování v rámci
monitoringu zoonotických a kmenzálních bakterií
izolovaných z hospodářských zvířat a potravin
živočišného původu**

Tomáš Černý
SVÚ Praha

Pravidla stanovená pro pravidelné mikrobiologické vyšetření původců zoonóz a pravidla pro sledování a ohlašování antimikrobiální rezistence zoonotických a komenzálních bakterií prováděné státním veterinárním dozorem v potravinářských podnicích

MONITORING ZOONÓZ - každý rok (národní monitoring)			
BROJLER	JUT – kůže z krku	<i>Campylobacter</i> spp.	min. 49 vzorků z odběr. místa za rok
PRASE, SKOT, OVCE, KOZA KŮŇ	Stěr z 5 JUT (houbičky	<i>Salmonella</i> spp.	min. 49 vzorků z odběr. místa za rok
PRASE, SKOT	Stěr z JUT (samostatná houbička)	STEC	min. 1 měsíčně z odběr. místa, přežvýkavci celoročně , prasata pouze VI.-IX. měsících
BROJLER, KRŮTA	JUT – kůže z krku (5 směsných vzorků)	<i>Salmonella</i> spp.	min. 49 vzorků z odběr. místa za rok

MONITORING AMR – sudé roky (RK 2020/1729)			
BROJLER	slepá střeva	<i>Campylobacter</i> spp.	C. jejuni min. 170 izolátů, C. coli do 170 iz.
BROJLER	slepá střeva	komenzální <i>E. coli</i>	min. 170 izolátů
BROJLER	slepá střeva	enzymy produkující <i>E. coli</i>	min. 300 vzorků
KUŘECÍ a KRŮTÍ	čerstvé maso z maloobchodu	enzymy produkující <i>E. coli</i>	kuřecí 300 vzorků + krůtí 150 vzorků

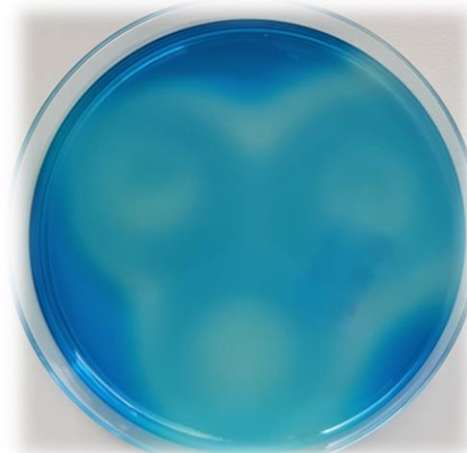
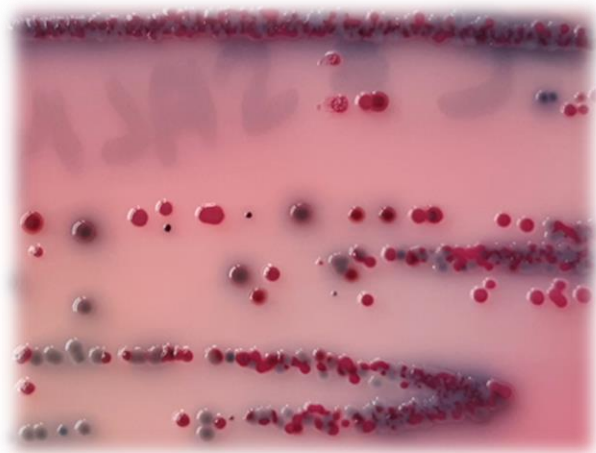
MONITORING AMR – liché roky (RK 2020/1729)			
PRASE VÝKRM	slepé střevo	komenzální <i>E. coli</i>	min. 170 izolátů
PRASE VÝKRM	slepé střevo	<i>Campylobacter coli</i>	min. 170 izolátů
PRASE VÝKRM	slepé střevo	enzymy produkující <i>E. coli</i>	min. 300 vzorků
PRASE VÝKRM	slepé střevo	<i>Salmonella</i> spp.	min. 300 vzorků
HOVĚZÍ a VEPŘOVÉ	čerstvé maso z maloobchodu	enzymy produkující <i>E. coli</i>	300 vzorků hovězí + 300 vzorků vepřové

+ každý rok monitoring AMR u izolátů, z NPSAL a z potravin v rámci hygienického dozoru

Monitoring - diagnostika

Odběr vzorků (randomizace, stratifikace) i jejich vyšetřování je prováděno harmonizovaně

- *Salmonella* spp. >> ISO 6579-1 >> sérotypizace (KWLm) >> MIC/WGS
- *Escherichia coli* komenzální >> selektivní pomnožení TBX >> MALDI-TOF >> MIC
- *Campylobacter coli/jejuni* >> harmonizovaný protokol EURL-C >> MIC (WGS)
- *Escherichia coli* produkující ESBL, AmpC a karbapenemázy >> harmonizovaný protokol EURL-AR >> WGS (MIC)



Monitoring - typizace

Testování MIC:

- evropsky harmonizovaný algoritmus pro použití desek
- jednotné MIC desky, akreditace metody,
- vyhodnocení podle ECOFFs (jednotná kritéria)
- každoroční EQAS
- ~ 400 vz./rok

Testování WGS (NGS):

- Illumina; Oxford Nanopore
- WGS SOP - EURL- AR
- Harmonizace QC kritérií
- Používání harmonizovaných databází CGE pro predikci genů a mutací
- každoroční EQAS
- In house bioinformatická pipeline
- ~ 400 vz./rok

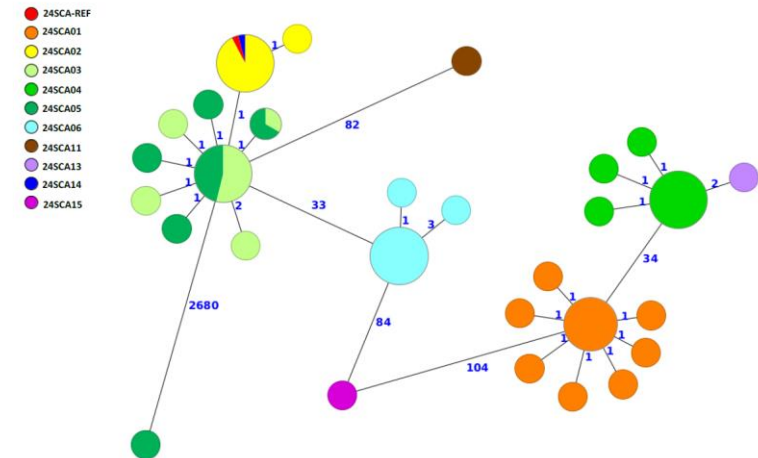
DTU Genomic Proficiency Test 2024:
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* &
Enterococcus spp.

A Guide on the Interpretation of the Submitted Data and the
Scoring System

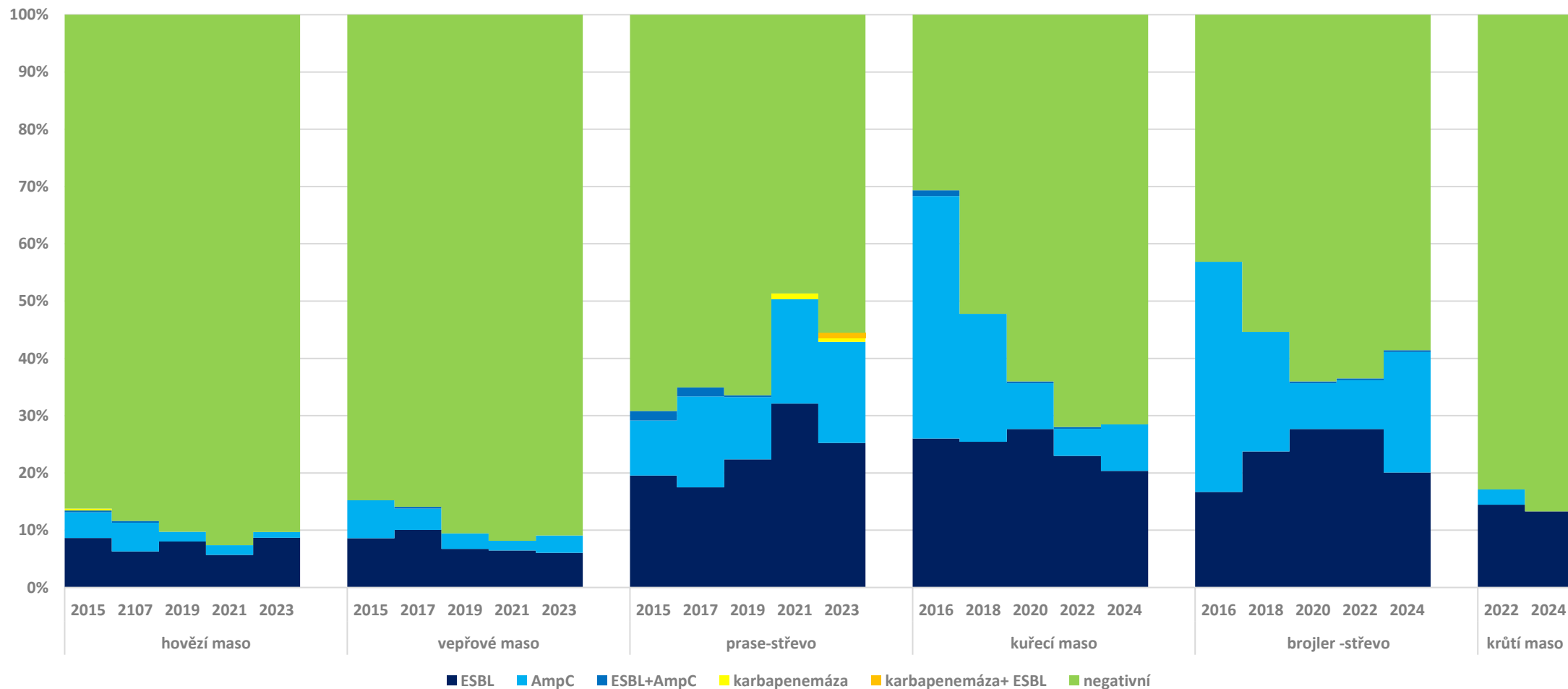
EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AMR)
National Food Institute – DTU Food
Technical University of Denmark

Athina Andrea, Joana Mourão & René Hendriksen

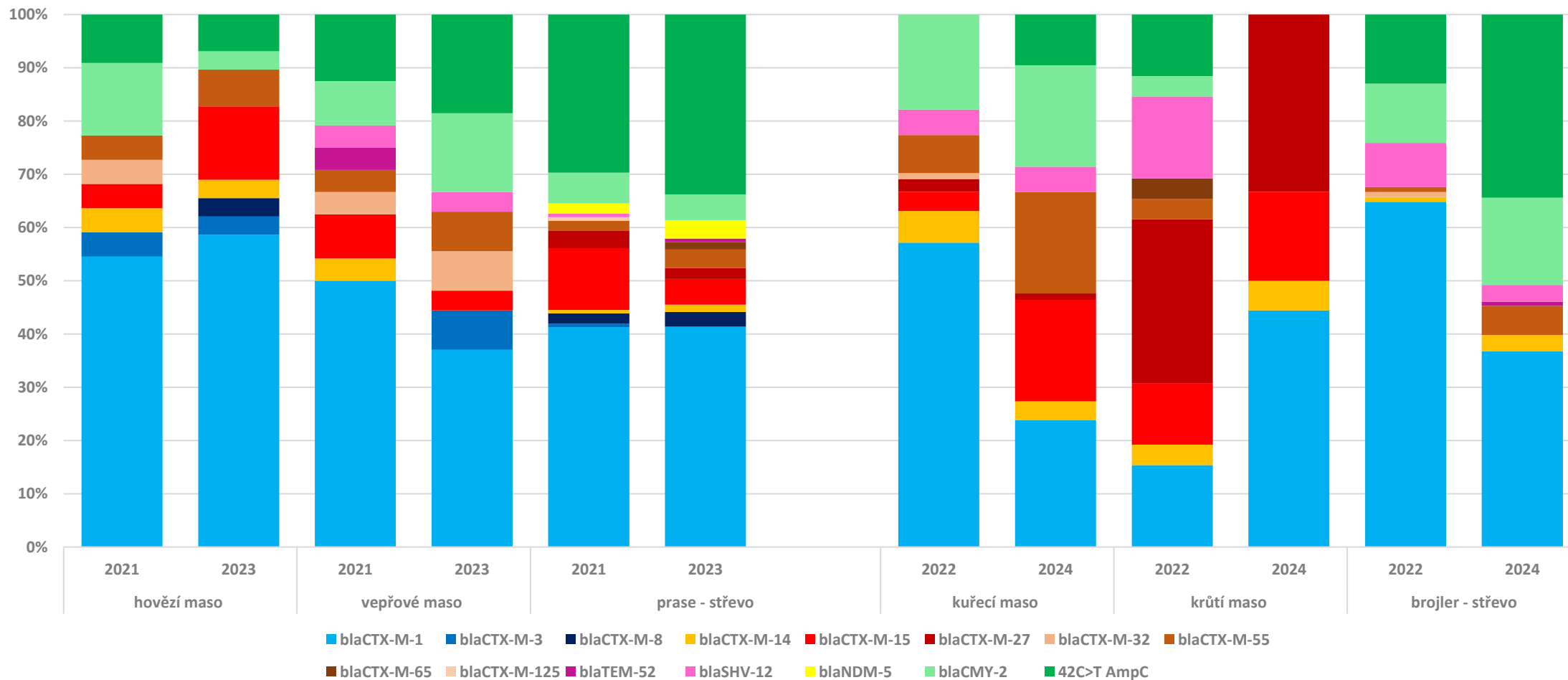
Contact Genomic PT Coordinator: Joana Mourão, joam@food.dtu.dk



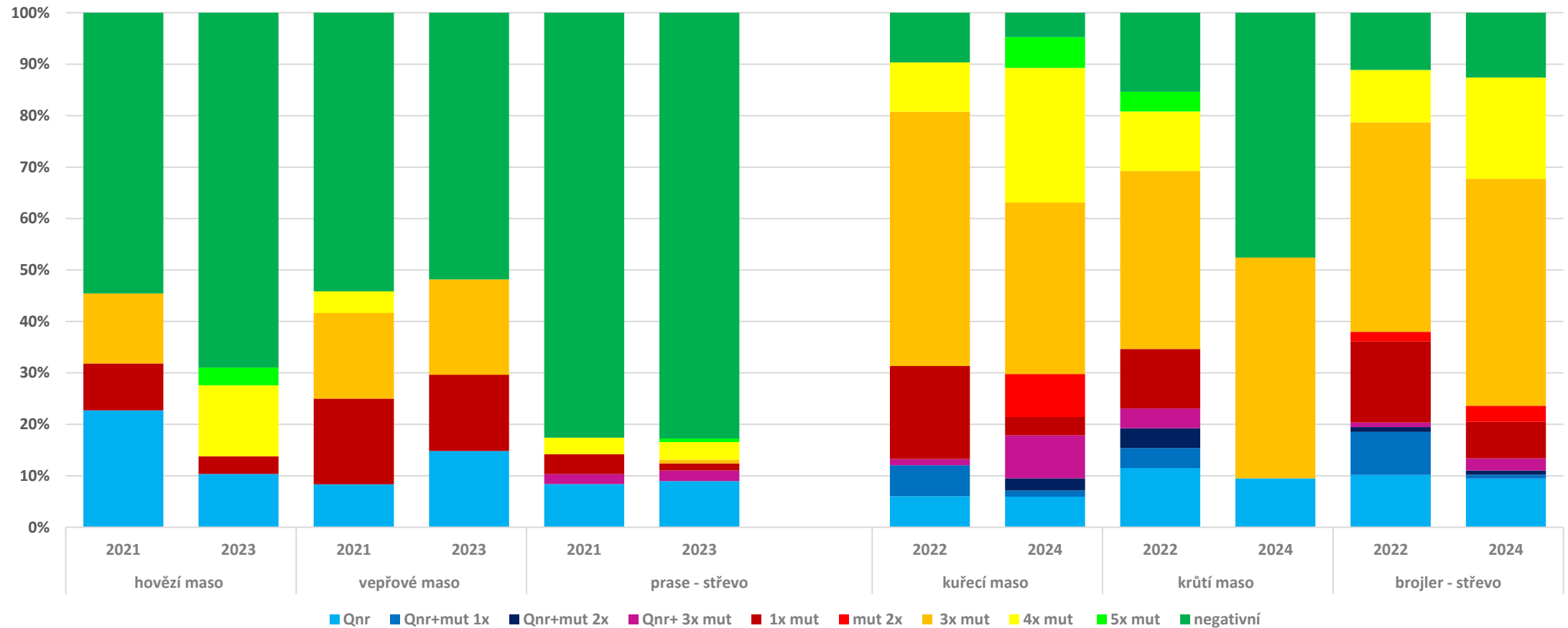
Porovnání relativní četnosti sledovaných fenotypů rezistence izolátů *Escherichia coli* detekovaných při harmonizovaném monitoringu producentů ESBL/AmpC/CPE



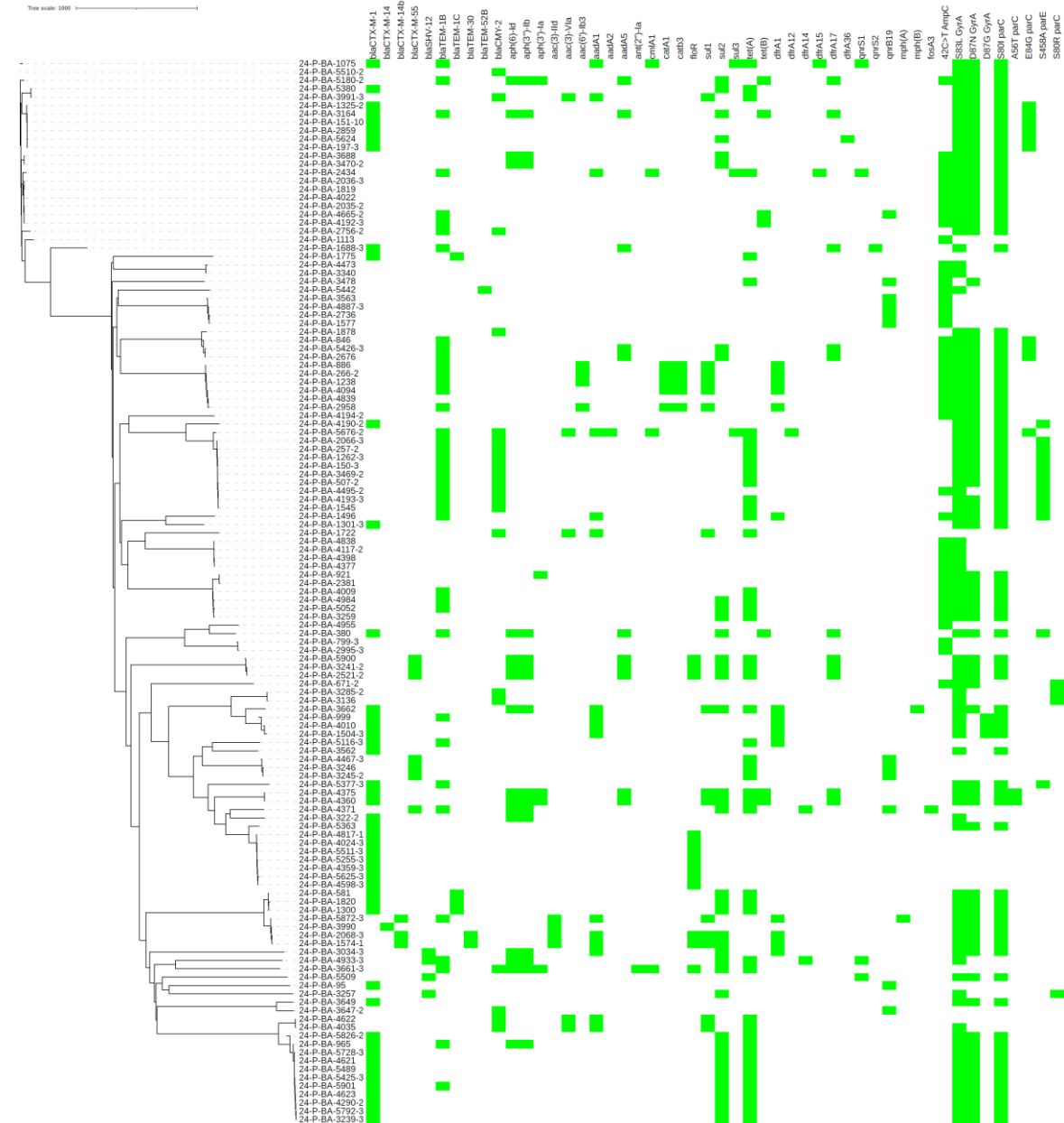
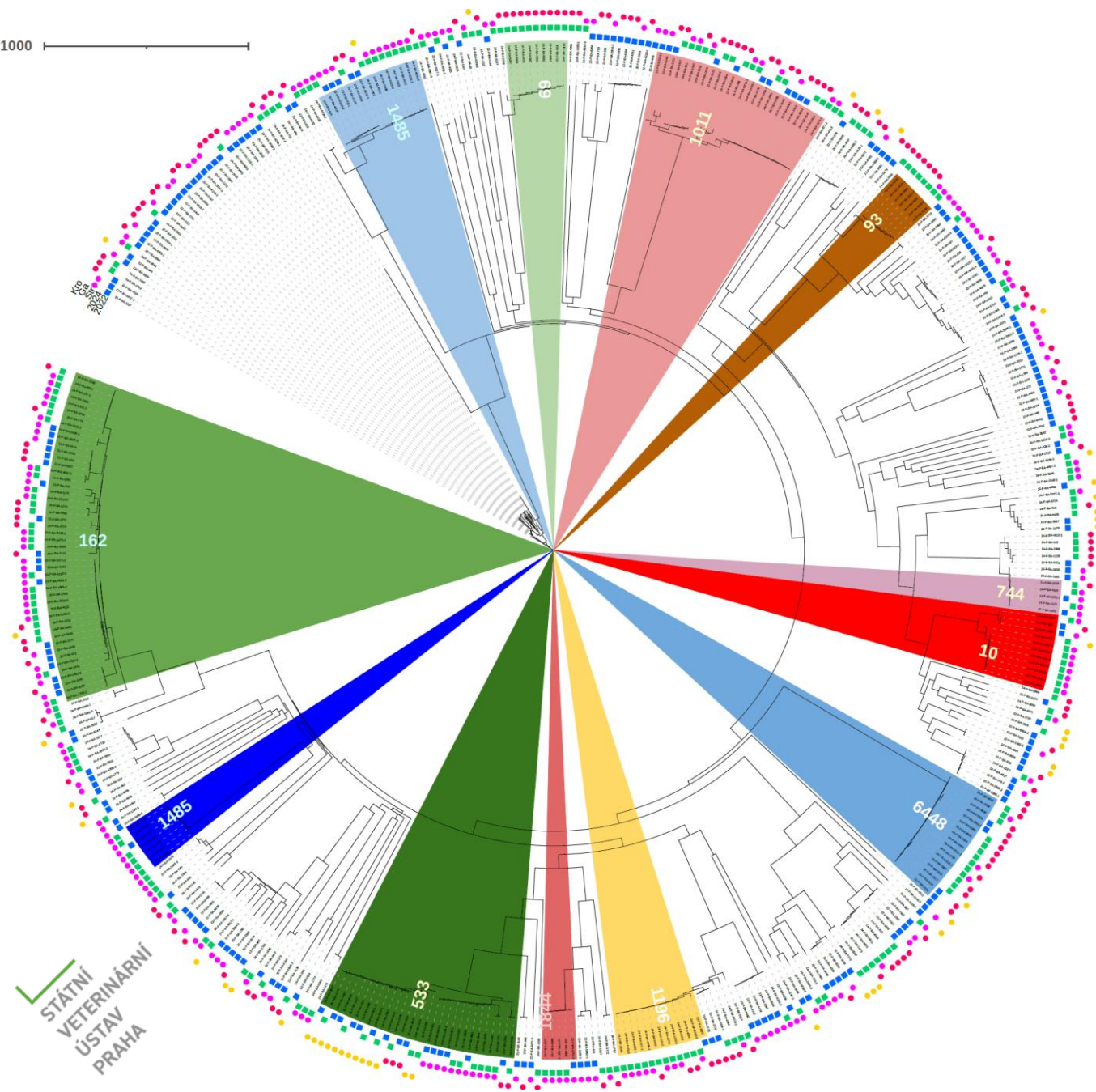
Porovnání relativní četnosti genů rezistencí a chromozomálních mutací u ESBL/AmpC/CPE pozitivních izolátů *Escherichia coli* detekovaných v rámci harmonizovaného monitoringu



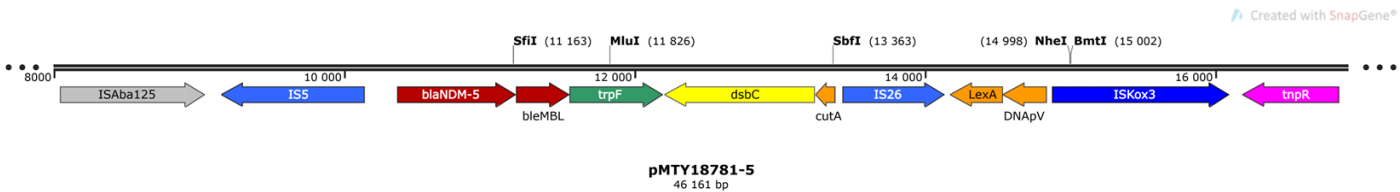
Porovnání relativní četnosti genů rezistencí a chromozomálních mutací zodpovědných za rezistenci k fluorochinolonům u ESBL/AmpC/CPE pozitivních izolátů *Escherichia coli* detekovaných v rámci harmonizovaného monitoringu



Porovnání vzájemné příbuznosti a profilů rezistence ESBL/AmpC pozitivních izolátů EC z drůbeže v letech 2022 a 2024

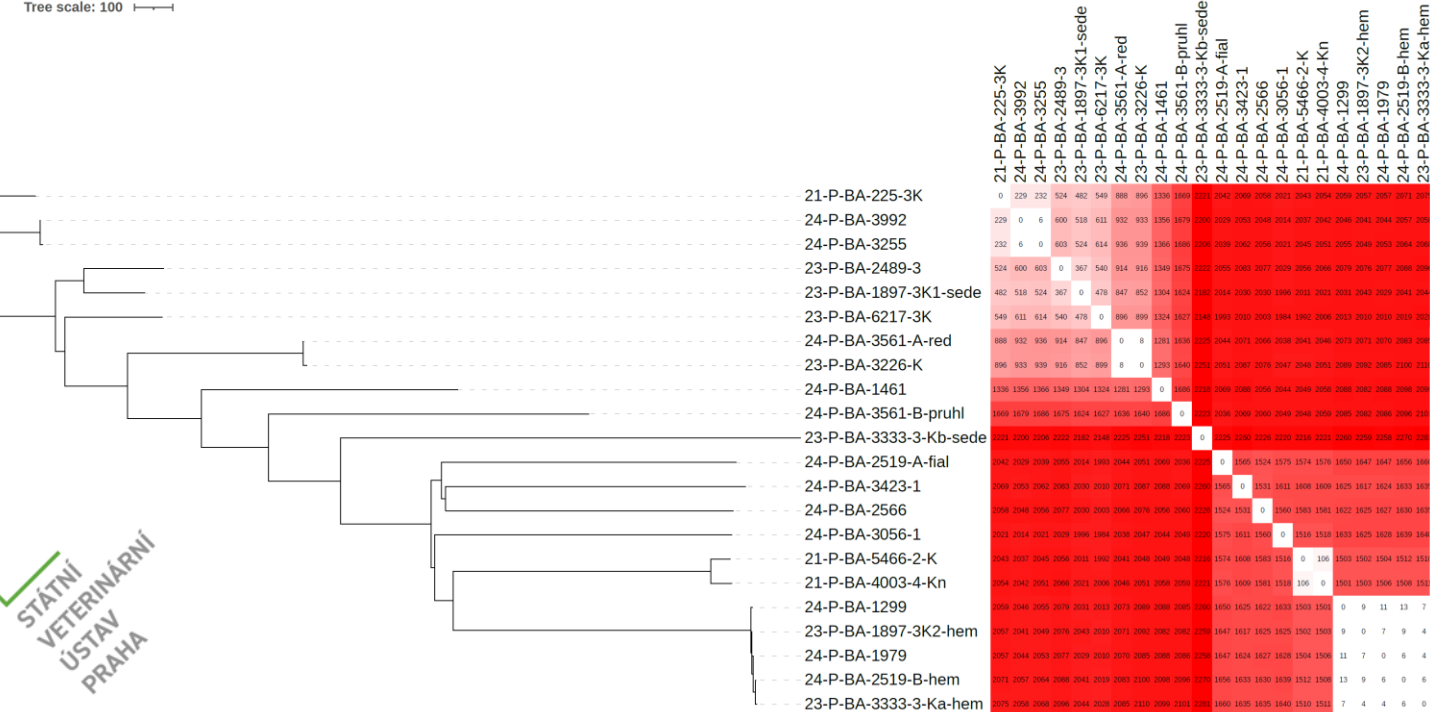


Plazmid IncX3 - nosič genu blaNMD-5

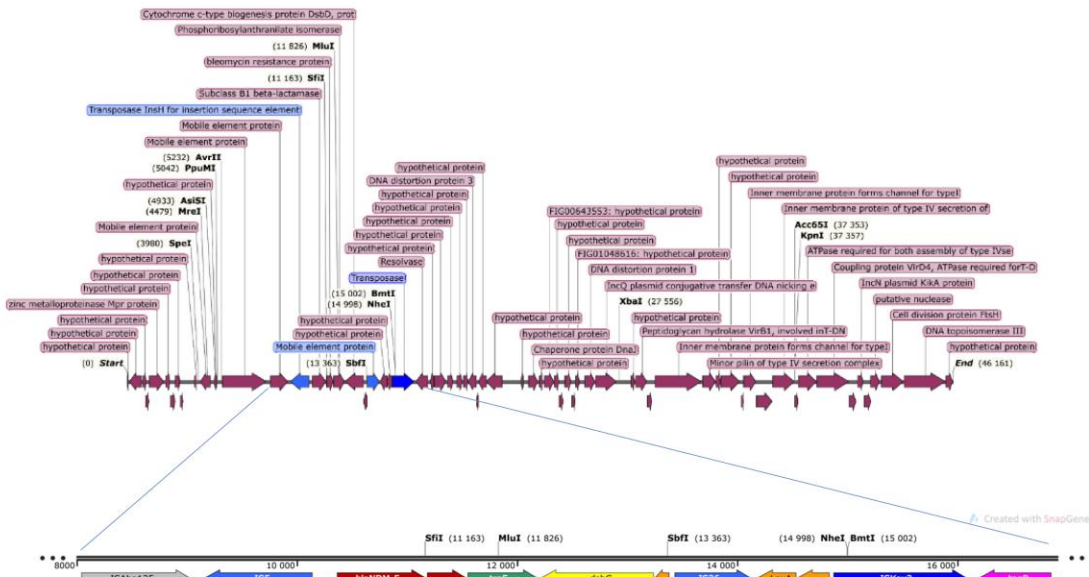


Příloha č.7
Detailní porovnání příbuznosti izolátů Eschrichia coli blaNDM-5 detekovaných v letech 2021-2024 (cgMLST V1 + HierCC V1)

Tree scale: 100



Topografie plazmidu IncX3 - nosiče blaNDM-5 genu



Identifikace rozdílů v topografii plazmidů IncX3

Plazmid IncX3	Size (pb)	Change	Description
p23-P-BA 3333-3-Ks	46131	Deletion 30 pb	ISAb125
pMTY18781-5	46161		
p23-P-BA 3333-3-Kh	46161		
p23-P-BA 1897-3-Kh	46161		
p23-P-BA 1897-3-Ks	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)
p23-P-BA 2489-3-K	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)
p23-P-BA 3226-K	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)
p21-P-BA 225-3-K	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)
p23-P-BA-6217-3K	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)
p21-P-BA 5466-2-K	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)
p21-P-BA 4003-4-K	46452	Insertion 291 bp	Tn3(ISSba14)

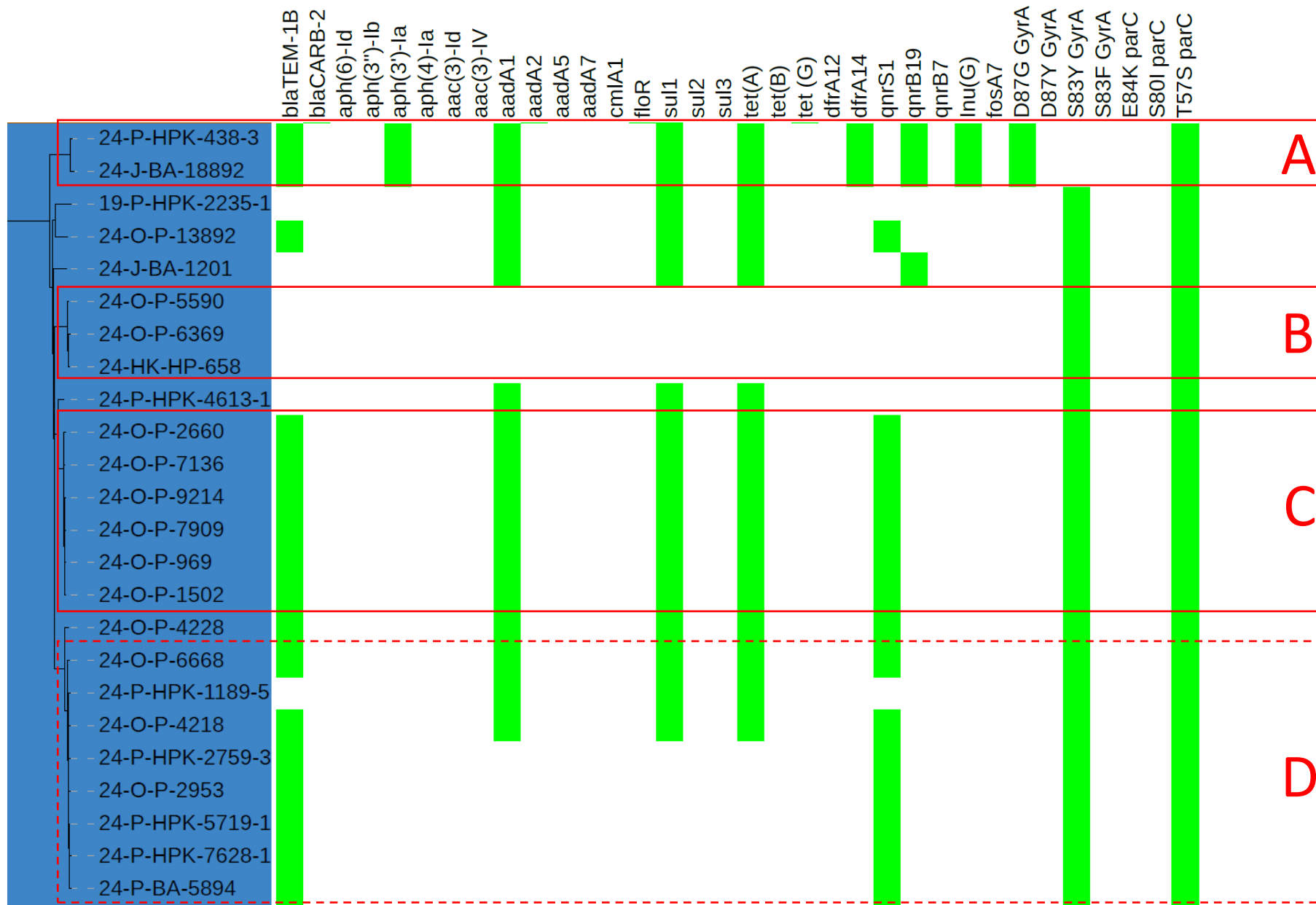
Počty provedených WGS salmonel 01/2024-06/2025

Sérovar	Počet izolátů salmonel 01/2024-06/2025	stěr JUT skot	stěr JUT prase	kůže drůbež	potravina	jiné
Infantis	30			18	10	1 krmivo + 1 střevo
Enteritidis	24	6	4	9	3	2xtrus
Derby	19	6	9		3	1 krmivo
Typhimurium	14	2	7	1	2	1 trus + 1 krmivo
Typhimurium monofázická (4,[5],12:i:-)	13	4	5		3	1 JUT ovce
Montevideo	8	4		3	1	
Stanleyville	6	2		4		
Bredeney	4	3	1			
Indiana	4	2	2			
Kentucky	3		1	2xkrocan		
Agona	2		1			1 trus
Coeln	2				1	1 trus
Newport	2				2	
Brandenburg	1				1	
Diarizonae	1					1 JUT ovce
Kottbus	1			1		
Ohio	1		1			
Seftenberg	1				1	
S.Weltevreden	1				1	
S.enterica ssp.enterica (4,12:b:-)	1				1	
Celkem	138	29	31	38	29	11

✓ STÁTNÍ
VETERINÁRNÍ
ÚSTAV
PRAHA

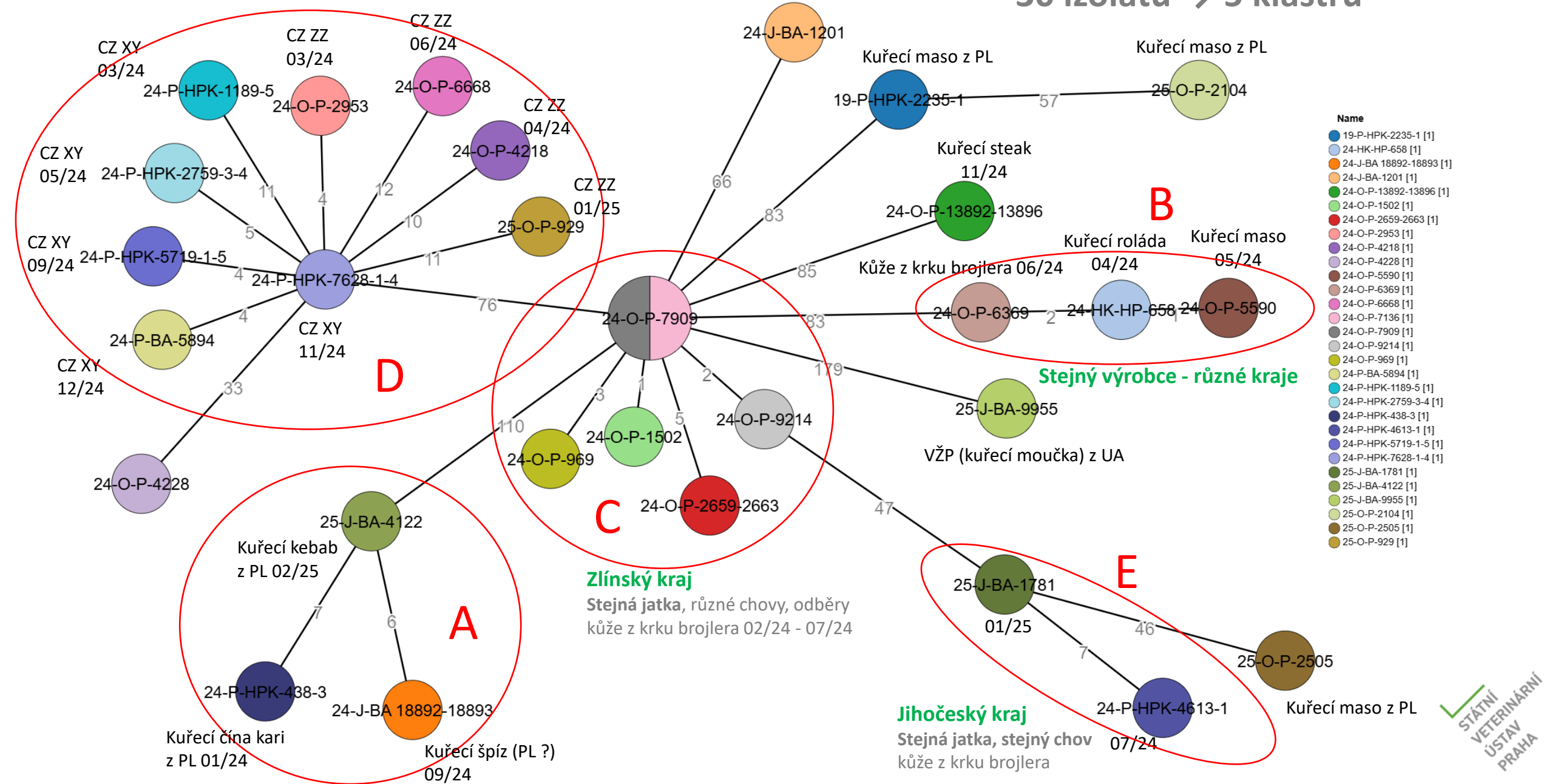


Porovnání vzájemné příbuznosti a profilů rezistence u izolátů *Salmonella* Infantis ST 32 (2024)

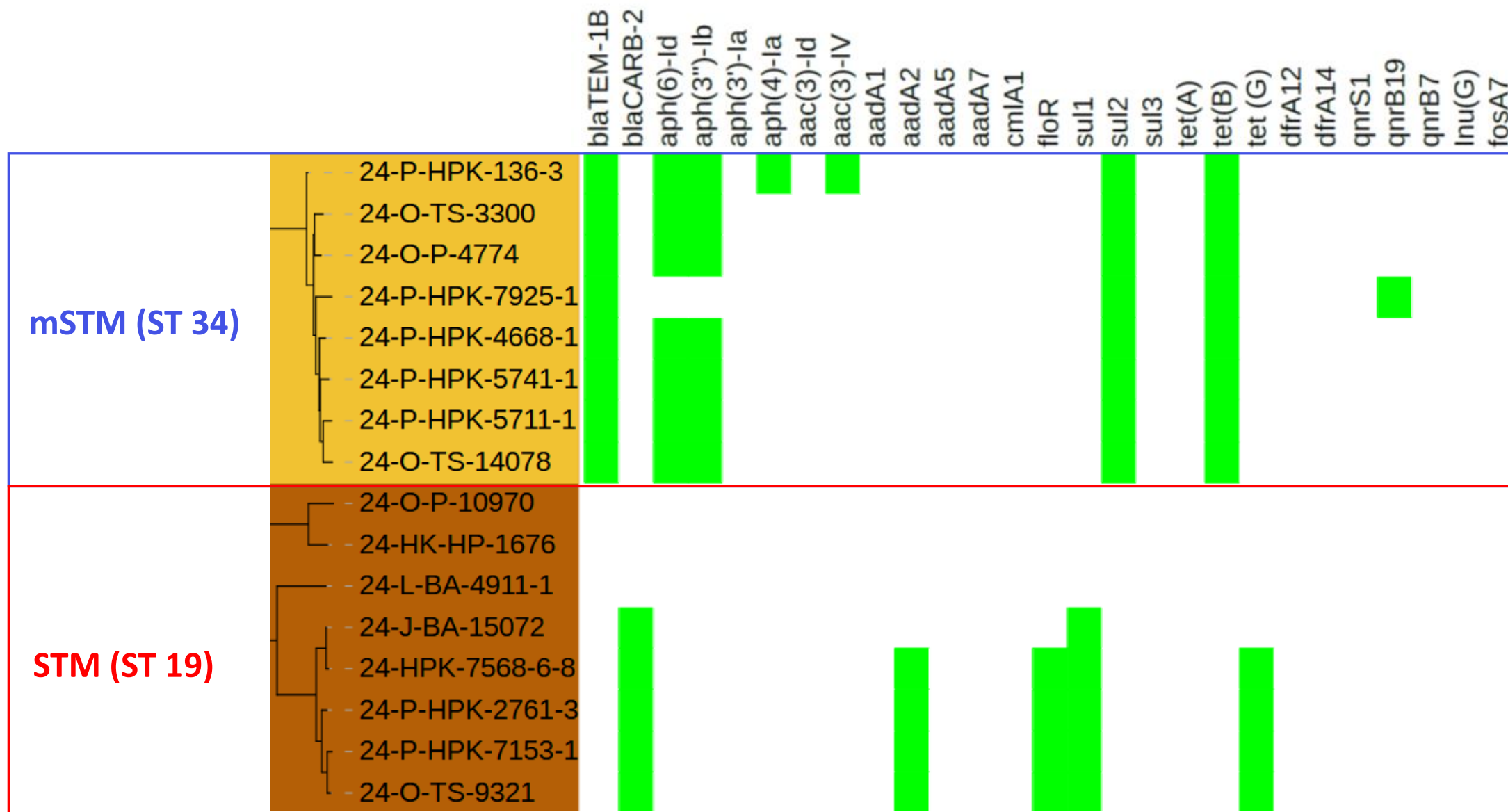


30 izolátů → 5 klastrů

Dvě rozdílná jatka, různé chovy, odběry kůže z krku brojlera



Porovnání vzájemné příbuznosti a profilů rezistence u izolátů *Salmonella Typhimurium* včetně monofázické varianty (2024)



Závěr

Data management:

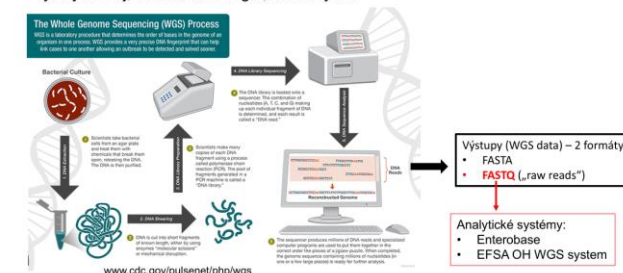
- MIC / WGS data jsou vkládána do DCF EFSA DB
- FASTQ - vkládány do databází OH EFSA DB , EnteroBase
- V roce 2025 dále prováděna sekvenace STEC, *kampylobakterů*

V roce 2026 plánujeme:

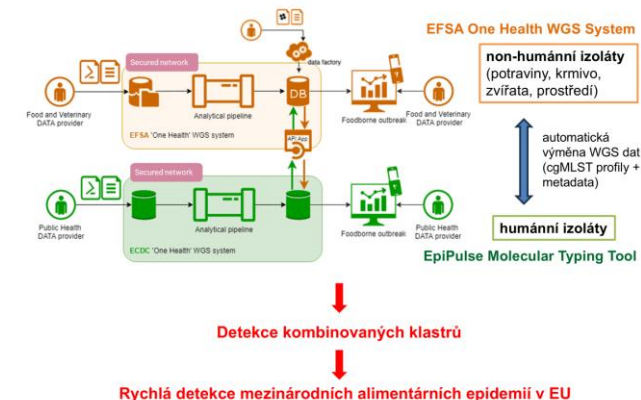
- sekvenovat MRSA - BS, salmonely z NPSAL (krojler, krůta)
- Nárůst na 500- 600 sekvenací/rok
- Příprava akreditace metody

Celogenomová sekvenace (Whole genome sequencing, WGS)

- moderní molekulární metoda → kompletní informace o celém genomu mikroorganismu
- alternativa tradičních typizačních metod (sérotypizace, BCH, PCR, AST, PFGE,...)
- rychlý rozvoj, různé technologie, různé využití



ECDC-EFSA One Health WGS System





Děkuji za pozornost