

Bakteritüvede iseloomustus genoomi andmete põhjal



Age Brauer, Maido Remm, Tanel Tenson

Tartu Ülikool

Rakendusuringu teema: Mikroobide resistentsuse vähendamine ja ohjamise võimalused

*Uuringu tellis ja uuringut rahastas Eesti Teadusagentuur Euroopa Regionaalarengu Fondist toetatava programmi „Valdkondliku teadus- ja arendustegevuse tugevdamine“ (RITA) tegevuse 1 „Strateegilise TA tegevuse toetamine“ kaudu. Uuring valmis perioodil 1. juuli 2019 - 31. juuni 2022
Keskkonnaministeeriumi, Maaeluministeeriumi ja Sotsiaalministeeriumi eesmärkide elluviimiseks.*

Genoomsete järjestuste alusel analüüsiti *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ja *Staphylococcus aureus* tüvede levimust. Väiksemate tüvede hulgaga koguti andmeid ka *Enterococcus faecium*, *E. fecalis* ja *Salmonella enterica* kohta. Hiljutisi ülekandeid inimese-looma-toidu-keskkonna vahel ei täheldatud ühelgi juhul. Ülekanded ei ole seega väga sagedased ja sageduse täpsemaks hindamiseks vajame suuremat andmekogu.

Escherichia coli

Kokku tuvastati 174 erinevat järjestuse tüüpi, millest viis levinuimat oli **ST131** (n=62; 10,8%), **ST10** (n=49; 8,6%), **ST69** (n=25; 4,4%), **ST95** (n=22; 3,8%) ja **ST73** (n=19; 3,3%). Tuvastati 14 uut ST-d, mida PubMLST andmebaasis (<https://pubmlst.org/>) ei ole.

ST131 oli endiselt kõige sagedasem inimeselt isoleeritud tüvede järjestuse tüüp. Nii loomadelt, toidust kui ka keskkonnast isoleeritud tüvede hulgas oli levinuim ST10 (Tabel_1).

Tabel_1. Levinuimad *E. coli* ST-d erinevates keskkondades.

| Inimene | | Loomad | | Keskkond | | Toit | |
|---------|-----|--------|-----|----------|-----|------|-----|
| ST | Arv | ST | Arv | ST | Arv | ST | Arv |
| 131 | 61 | 10 | 31 | 10 | 8 | 10 | 6 |
| 95 | 22 | 88 | 14 | 1079 | 3 | 101 | 5 |
| 69 | 21 | 1079 | 13 | 101 | 1 | 752 | 5 |
| 73 | 20 | 58 | 10 | 3232 | 1 | 93 | 4 |
| 404 | 7 | 101 | 9 | 38 | 1 | 115 | 3 |
| 1193 | 6 | 23 | 9 | 877 | 1 | 117 | 3 |
| 12 | 6 | 75 | 7 | | | 23 | 3 |
| 10 | 4 | 1611 | 6 | | | 57 | 3 |
| 127 | 4 | 164 | 5 | | | 58 | 3 |
| 141 | 4 | 542 | 5 | | | 746 | 3 |

ST10 oli ühtlasi ka levinuimaks järjestuse tüübiks, mis esineb kõigis uuritud keskkondadest kogutud proovides. Lisaks tuvastati kõigis neljas päritolukeskkonnas ka ST1079 (n=18; 3,1%) ja ST38 (n=8; 1,4%). Inimeselt, loomadelt ja toidust leitud (kuid keskkonnas puudunud) tüvede hulgas on levinuimad ST88 (n=18; 3,1%) ja ST58 (n=15; 2,6%) (Joonis 1).

Erinevates keskkondades esinenud sama ST-ga tüved on siiski tuumgenoomi järjestustelt väga erinevad, mis näitab, et hiljutisi ülekandeid erinevate keskkondade vahel ei ole toimunud. Kõige lähedasemad tüved, mis erinevatest keskkondadest tuvastati, erinevad tuumgenoomi baasil minimaalselt ca 30 nukleotiidi võrra (Joonis 2). Arvestades mutatsioonide sageduseks ca 6-10 nukleotiidi aastas, paigutab see võimaliku ülekande 3-5 aasta tagusesse aega.

ESBL fenotüüp on suhteliselt ühtlaselt fülogeneetilisel puul jaotunud (Joonis 3). Siiski tuleb täheldada, et inimesel levinuim ST131 on peaaegu täielikult ESBL+. See on probleemiks, kuna tegemist on peamiselt invasiivsete tüvedega.

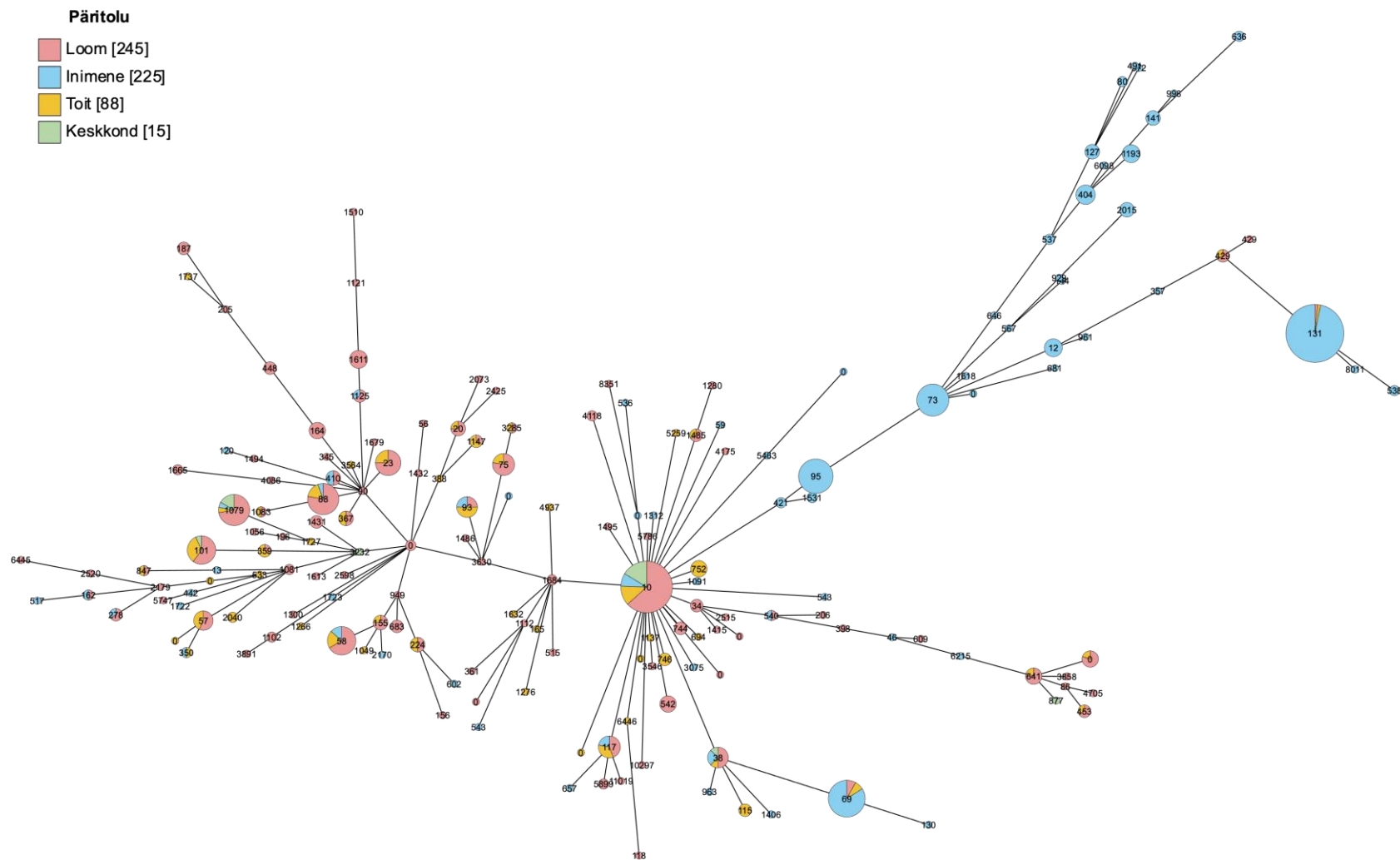
Võrreldes perioodiga 2010-2014 näeme, et kliinilistes tüvedes domineerib jätkuvalt ST131 (Joonis 4). Keskkonnast ja loomadelt pärit tüvedes on aga oluliselt tõusnud ST10 osakaal (Joonis 5, Joonis 6).

Kirjandusest nähtub, et:

ST131 on inimesel kõige tavaline ja sageli ESBLi sisaldav, seda eriti invasiivsete tüvede osas. Seejuures on ST131 loomadel harv (Suurbritannia, Day, et al., 2019)(Soome, Kurittu et al, 2022).

ST10 on ST, mida leidub erinevates reservuaarides, samas on tüved üksteisest kauged, st ülekanded ei ole toimunud hiljuti (Suurbritannia, Day, et al., 2019)(Brasiilia, Fuga et al., 2022).

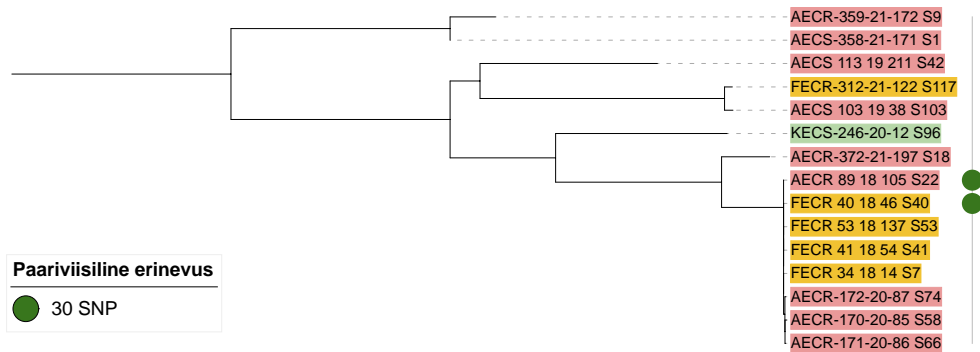
Olulise ohuna nähakse plasmiididel levivaid *mcr* geene, mis annavad resistentsuse kolistiinile (Xu et al., 2022). Oma uuringus me selliseid geene ei tuvastanud.



Joonis 1. *E.coli* tüvede jaotus järjestuse tüüpide ja päritolu põhjal.

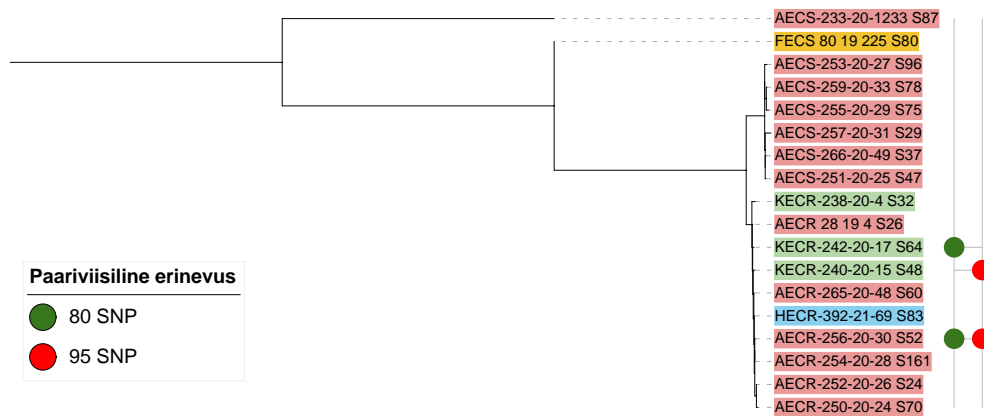
Tree scale: 0.1

ST101



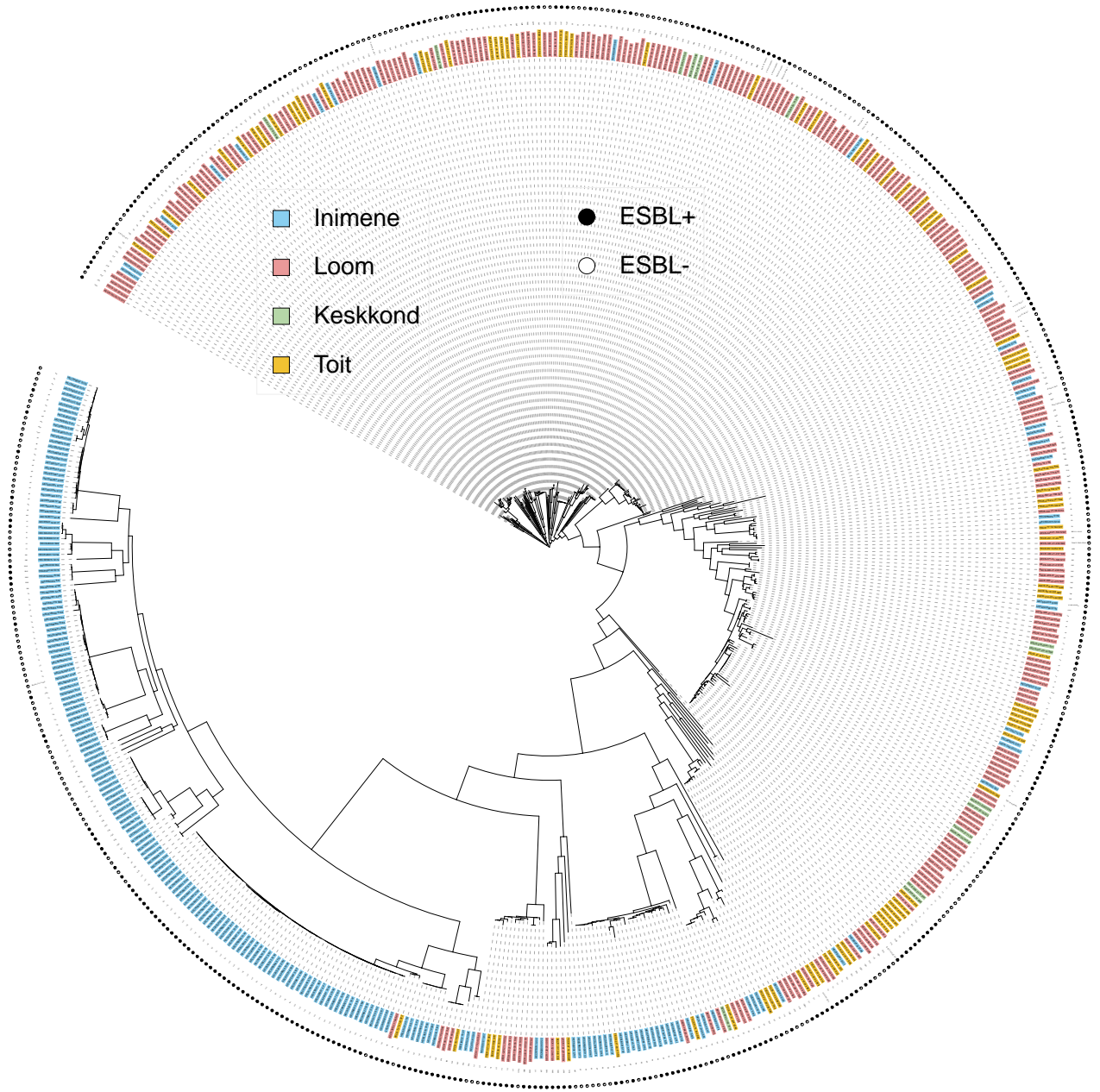
Tree scale: 1

ST1079

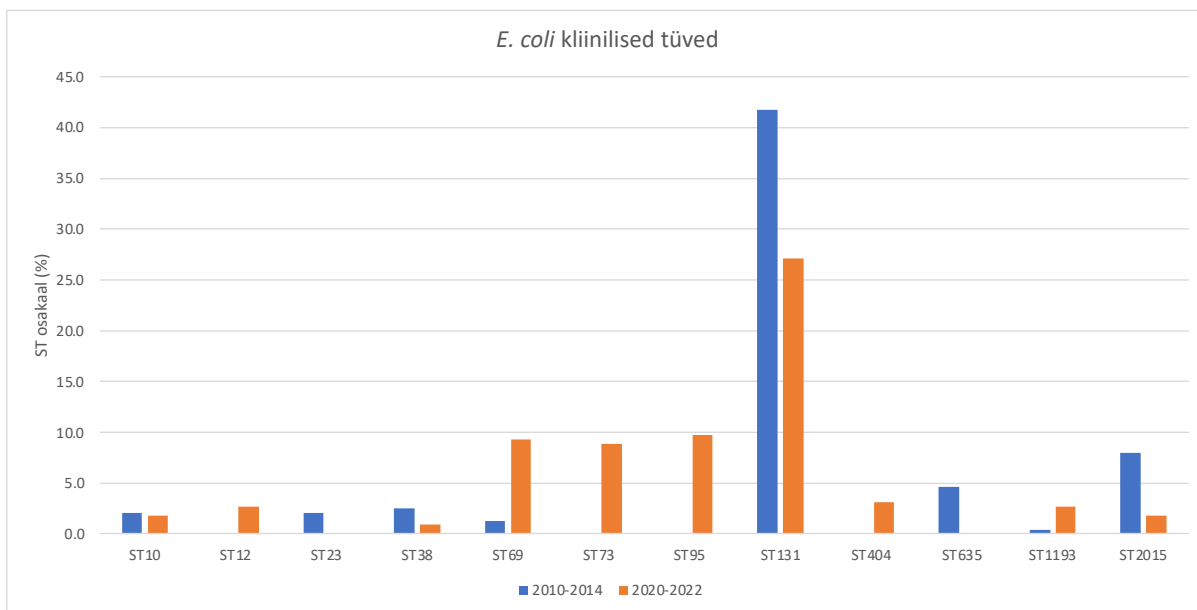


Joonis 2. Näide järjestuse tüüpide sisese erinevuse ulatusest tuumgenoomi tasemel ST101 ja ST1079 tüvedes. Tähistatud on <100 nukleotiidise erinevusega tüved, mis pärinevad erinevatest keskkondadest.

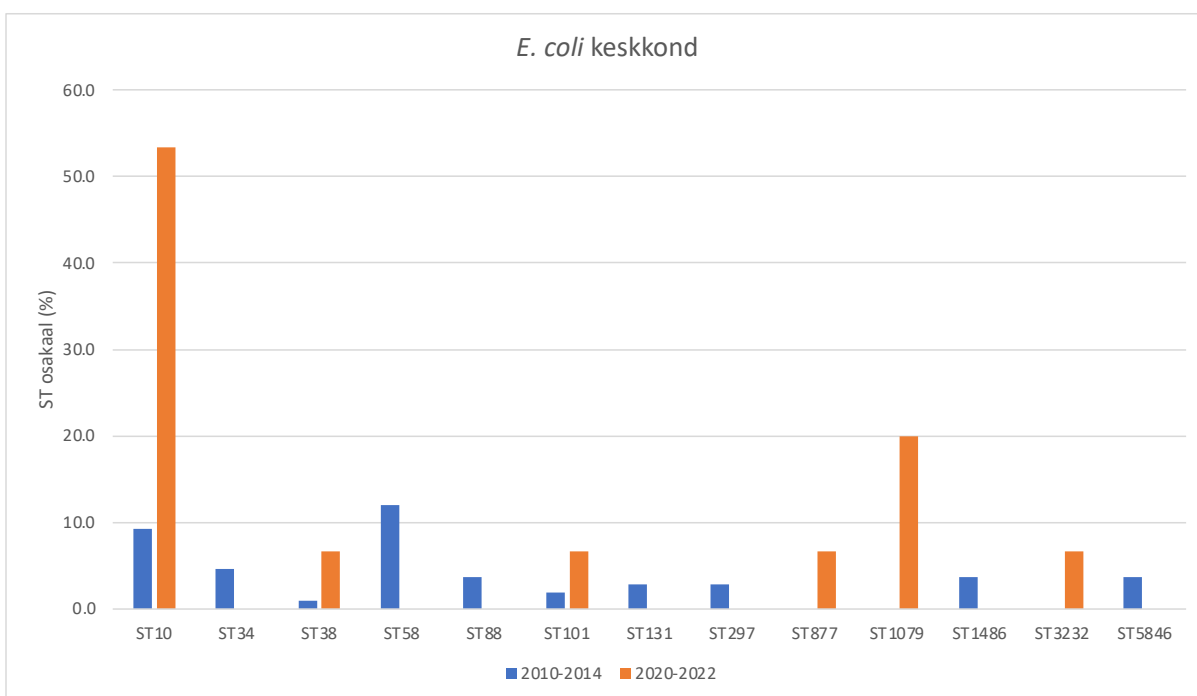
Tree scale: 0.1



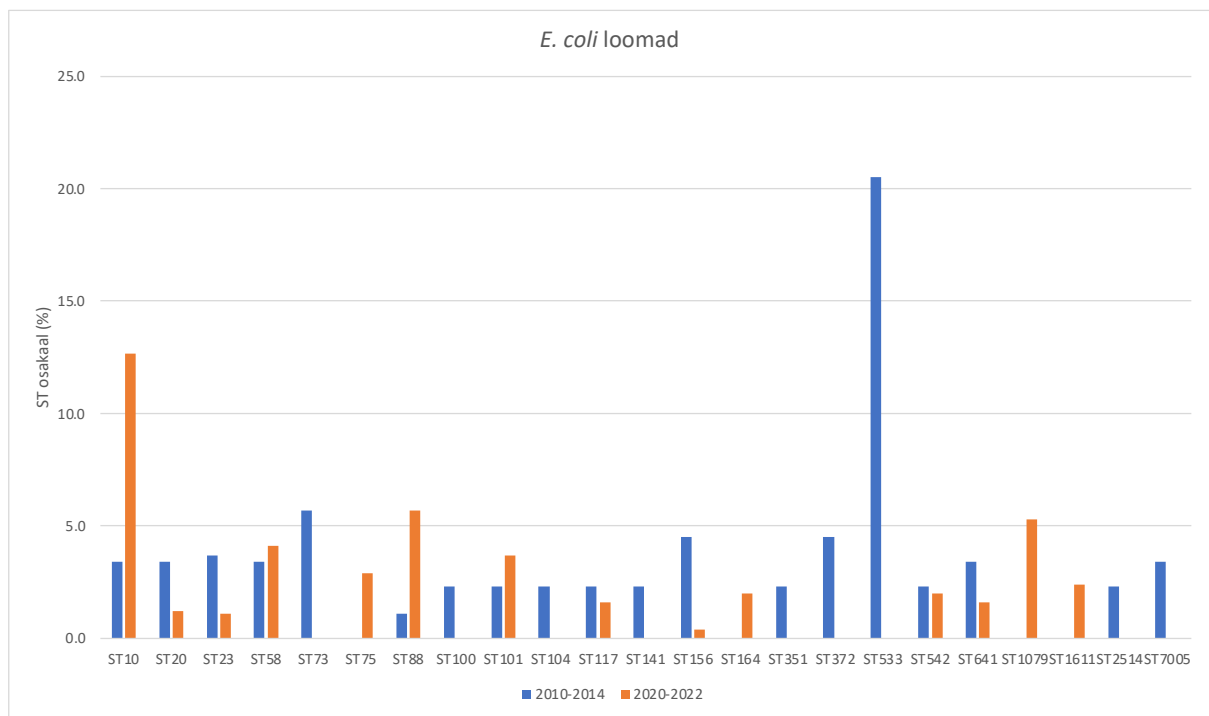
Joonis 3. Kogutud *E. coli* tüvede fülogeneetiline puu



Joonis 4. *E. coli* kliiniliste tüvede ST jaotuse võrdlus erinevatel ajaperioodidel.



Joonis 5. *E. coli* keskkonnatüvede ST jaotuse võrdlus erinevatel ajaperioodidel.



Joonis 6. *E. coli* loomadelt pärit tüvede ST jaotuse võrdlus erinevatel ajaperioodidel.

Klebsiella pneumoniae

Kokku tuvastati 69 erinevat järjestuse tüüpi, millest viis levinuimat on **ST307** (n=20; 14,7%), **ST15** (n=12; 8,8%), **ST395** (n=6; 4,4%), **ST86** (n=6; 4,4%) ja **ST219** (n=5; 3,7%). Kõik need ST-d esinesid inimeselt pärit tüvede hulgas. Tuvastati 5 uut ST-d, mida PubMLST andmebaasis ei ole.

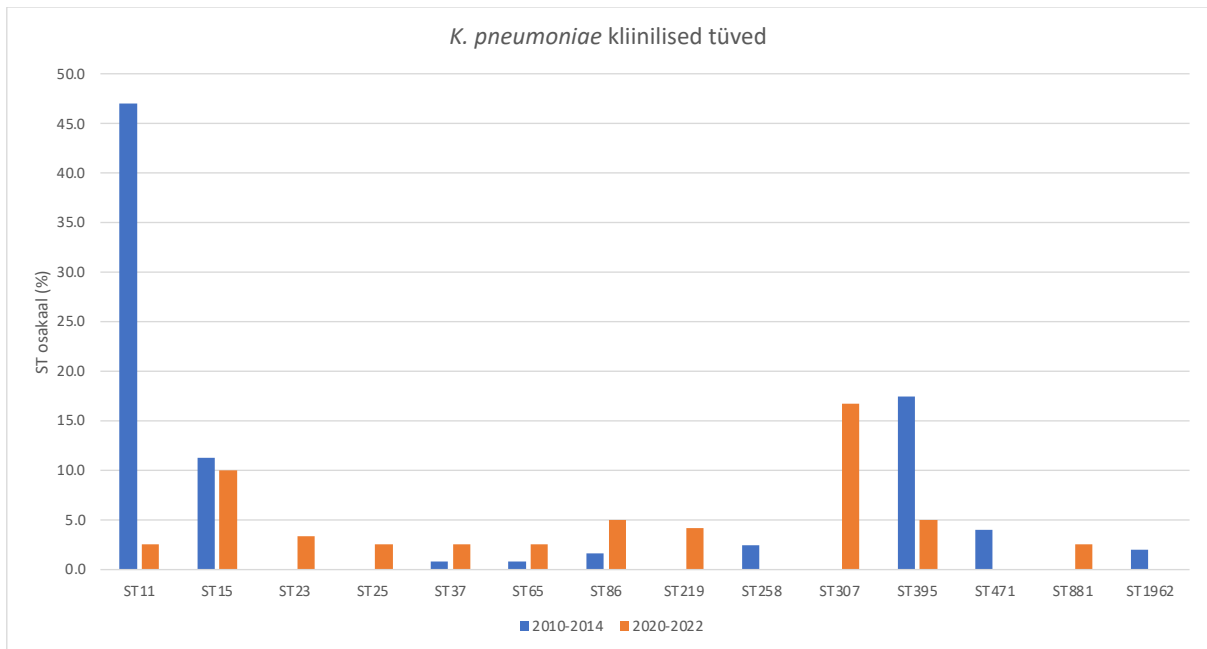
ST307 on levinud ja ESBL+ ST Põhja-Ameerikas (Long et al., 2017), Lõuna-Ameerikas (Andrade et al., 2018) ja Euroopas (David et al., 2019). Ka meie uuringus on ST307 valdavalt ESBL+.

Perioodil 2010-2014 ei olnud ST307 Eestist leitud. Tundub, et tegemist on maailmas laialt leviva klastriga, mis on ka Eestisse jõudnud (Joonis 7).

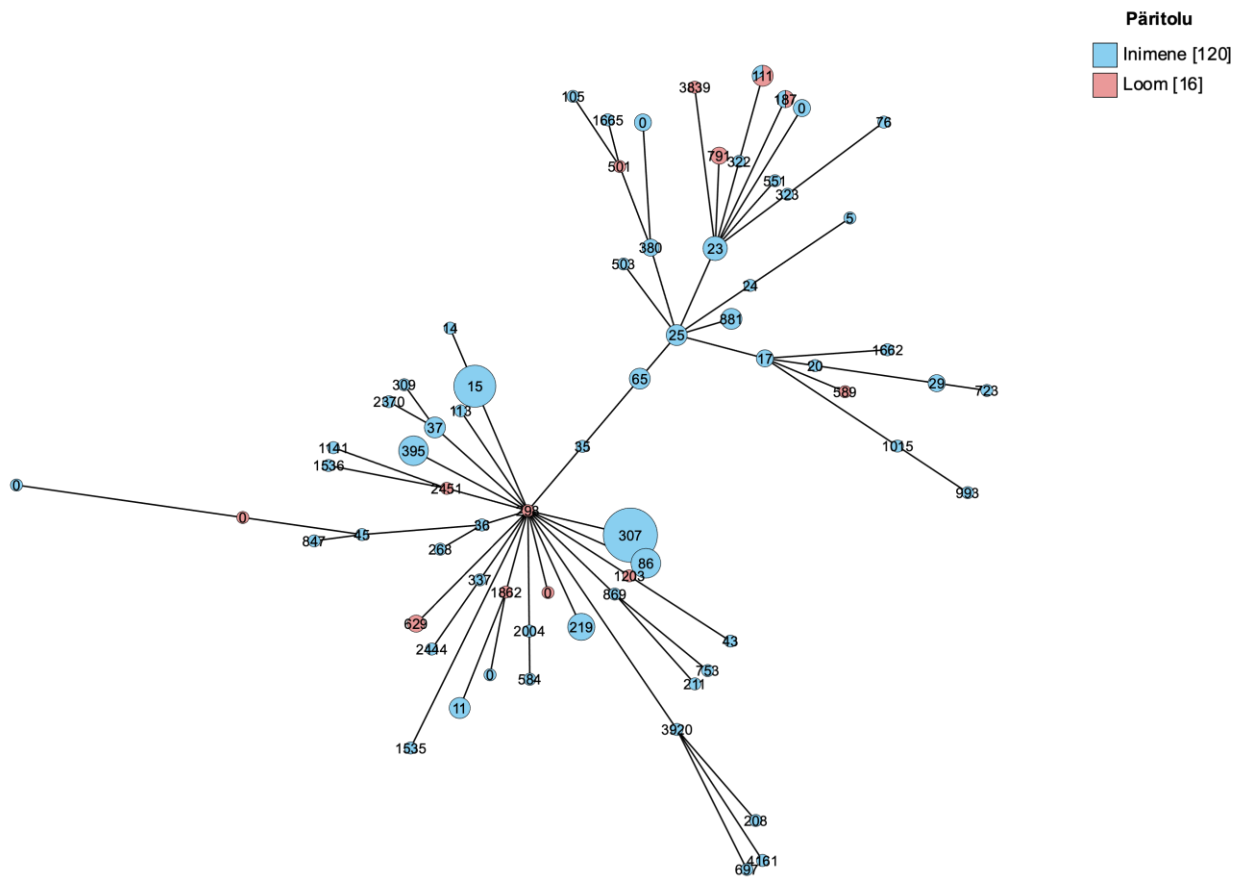
K. pneumoniae'le on iseloomulik spetsiifiliste ST-de esinemine inimestel ja loomadel (Joonis 8). Ainsana leidsid mõlemas keskkonnas ST111 (n=3; 2,2%) ja ST187 (n=2; 1,5%), kuid tuumgenoomi suur erinevus ei viita hiljutisele ülekandele (Joonis 9).

Kirjanduse andmetel on *Klebsiella pneumoniae* zoonootilise ülekande potentsiaaliga, kuid tüvesid on veel vähe iseloomustatud ja me ei tea ülekande ulatust (Hu et al., 2021). Käesoleva töö andmete põhjal me väga sagedast ölekannet ei tuvasta.

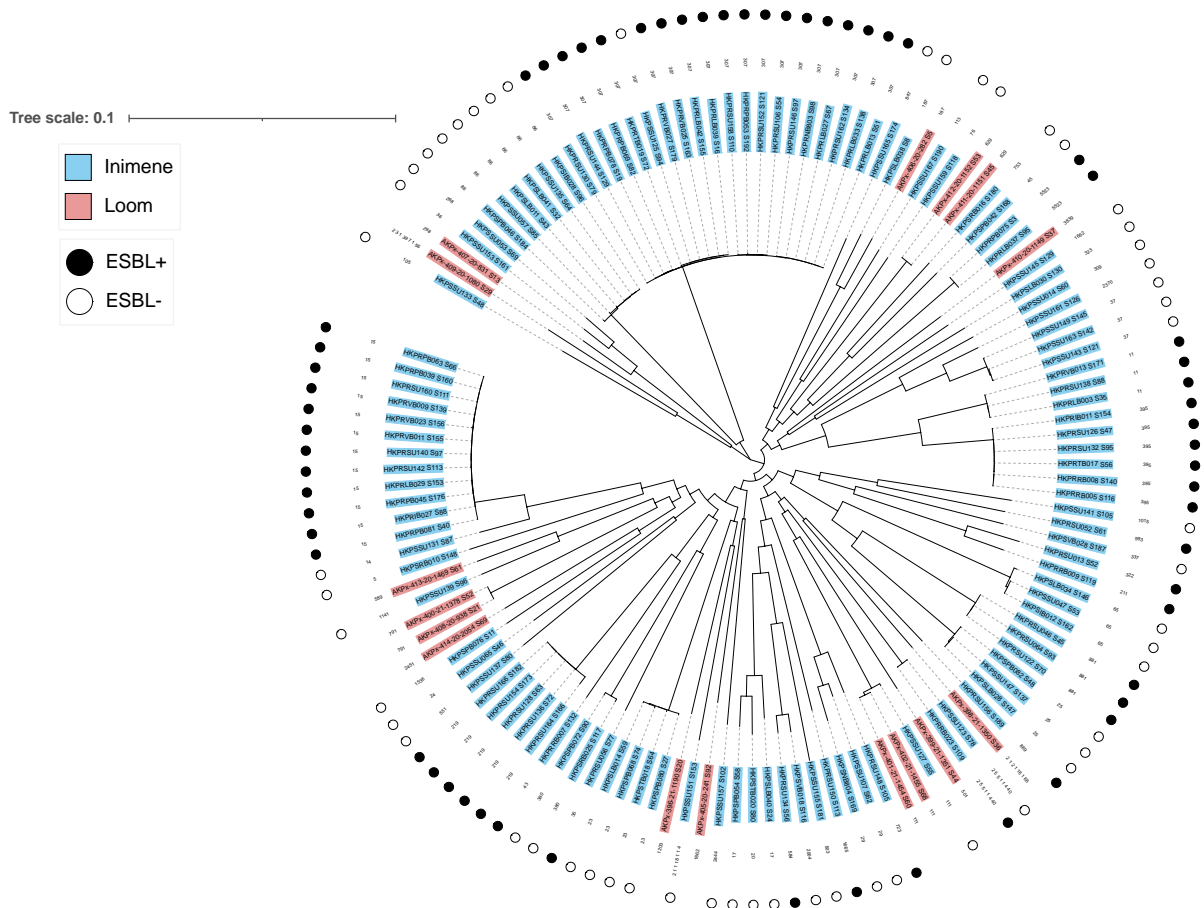
Olulise ohuna nähakse plasmiididel levivaid *mcr* geene, mis annavad resistentsuse kolistiinile (Xu et al., 2022). Oma uuringus me selliseid geene ei tuvastanud.



Joonis 7. *K. pneumoniae* kliiniliste tüvede järjestuseklastrite (ST) levik erinevatel ajaperioodidel.



Joonis 8. *K. pneumoniae* tüvede jaotus järjestuse tüüpide ja päritolu põhjal.



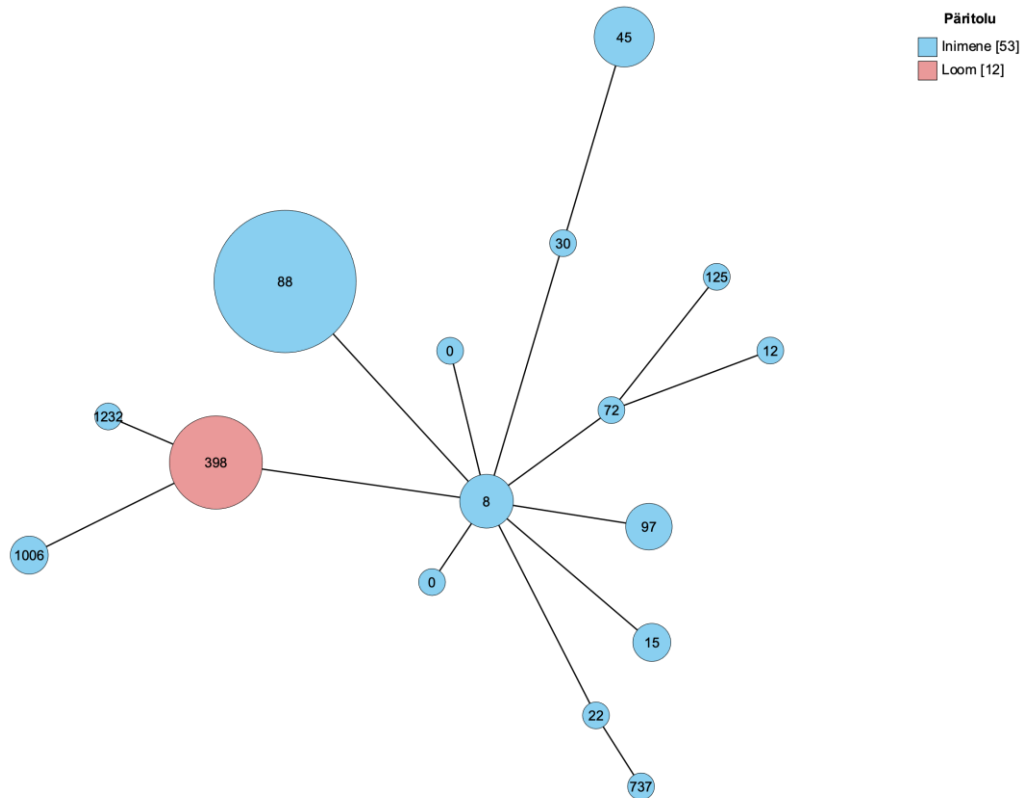
Joonis 9. Kogutud *K. pneumoniae* tüvede fülogeneetiline puu.

Staphylococcus aureus

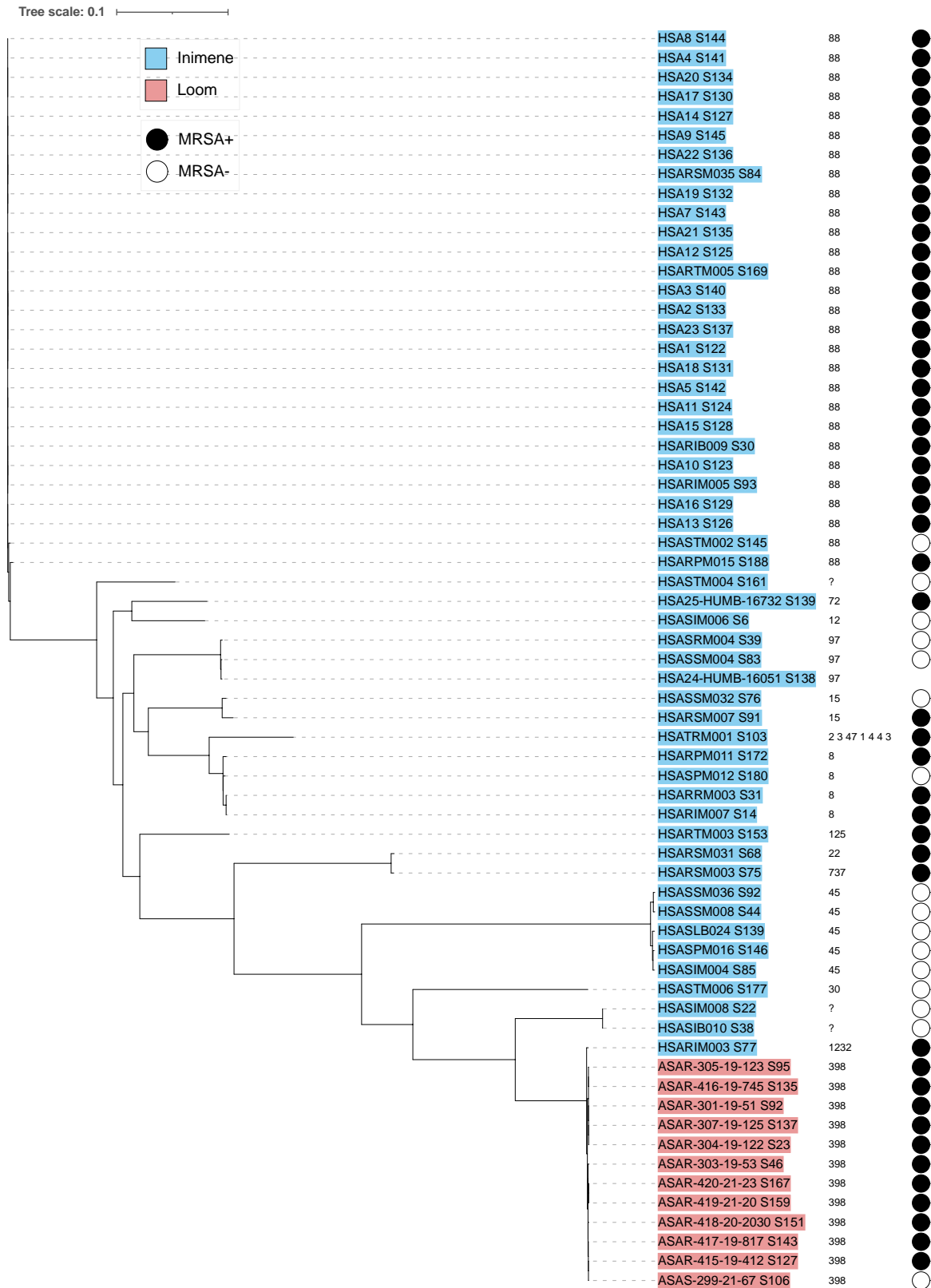
Kokku tuvastati 16 erinevat järjestuse tüüpi, millest kõik osutused spetsiifiliseks kas ainult loomadele või inimestele. Kolm levinuimat järjestuse tüüpi oli **ST88** (n=28; 43,1%), **ST398** (n=12; 18,5%) ja **ST45** (n=5; 7,7%) (Joonis 10, 11). Neist ST88 oli inimese spetsiifiline. Kõik ST398 tüved isoleeriti loomadelt. Tuvastati 3 võimalikku uut ST-d, mida PubMLST andmebaasis hetkel ei ole.

ST88 on algselt Aafrikas levinud klaster (community acquired, MRSA)(Kpeli et al 2017). Ka antud töös on tegemist valdavalt metitsilliiniresistentse klastriga (Joonis 11). Praeguses projektis on ST88 tüved ühest puhangust Tallinna haiglates.

ST398 on loomakasvatustes tavaline ST, mis võib vahel ka inimese kanduda, kuid tavaliselt haigust inimesel ei põhjusta (Lienen et al. 2021).



Joonis 10. *S. aureus* tüvede jaotus järjestuse tüüpide ja päritolu põhjal.

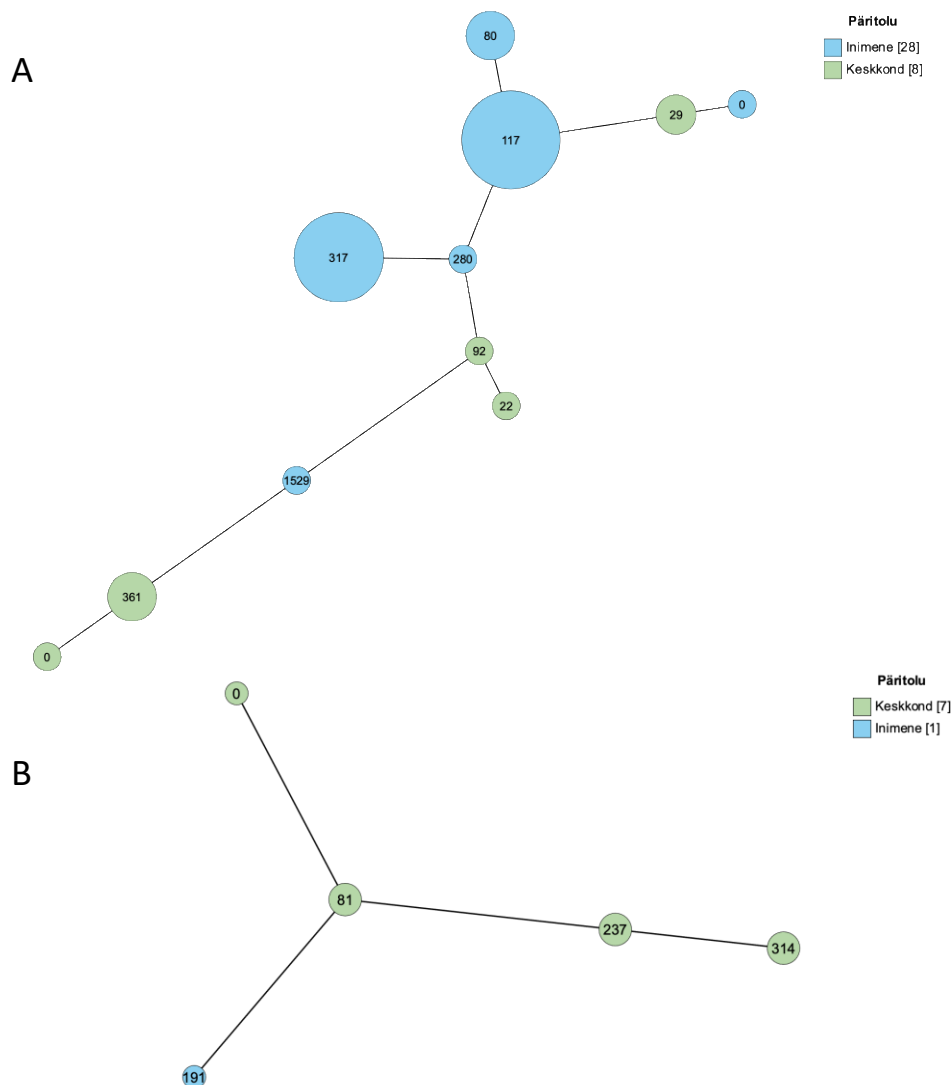


Joonis 11. Kogutud *S. aureus* tüvede fülogeneetiline puu.

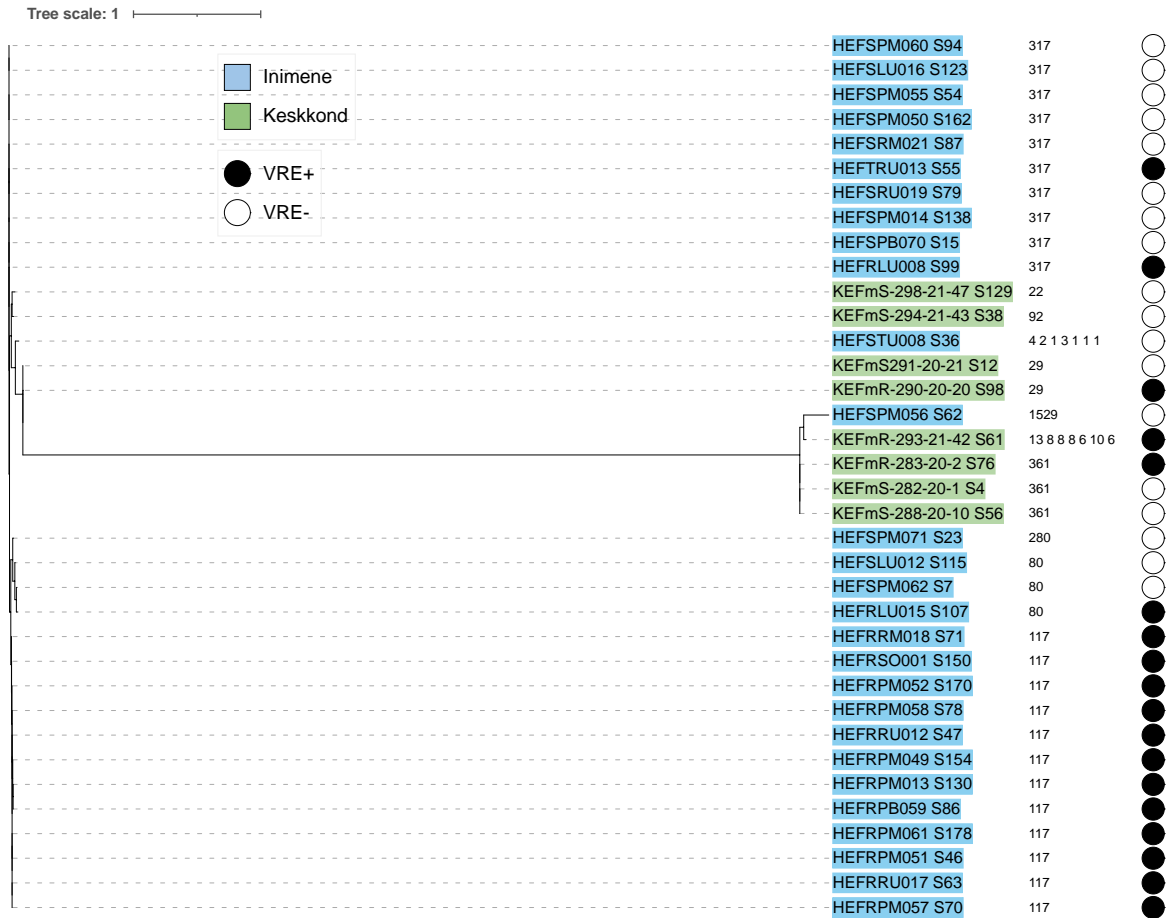
Vankomüsiiniresistentsed enterokokid (VRE)

Projekti alustades olime mures, et vankomüsiiniresistentsete enterokokkide probleem suureneb kiiresti õnneks seda ei juhtunud ja projekti raames leidsime ainult üksikuid tüvesid. Eelneva materjali analüüsi publitseerisime artiklis Aun et al. 2021.

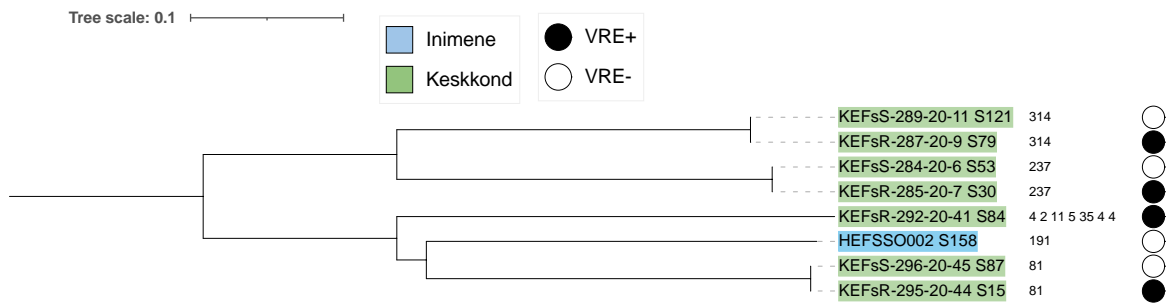
Sama ST-ga tüvesid, mis oleks levinud erinevates keskkondades ja ülekande toimumisele, VRE-de hulgas ei tuvastatud. Kokku tuvastati *E. faecium*'i ja *E. faecalis*'e puhul vastavalt 11 ja 4 erinevat järjestuse tüüpi (Joonis 12, Joonis 13, Joonis 14). Neist 3 on uued, mida hetkel PubMLST andmebaasis pole. VRE+ *E. faecium*'i puhul oli levinuim vankomüsiiniresistentne **ST117** (n=12; 33,3%) (Joonis 13).



Joonis 12. Enterokokkide tüvede jaotus järjestuse tüüpide ja päritolu põhjal. **A.** *E. faecium* **B.** *E. faecalis*



Joonis 13 Kogutud *E. faecium* tüvede fülogeneetiline puu



Joonis 14. Kogutud *E. faecalis* tüvede fülogeneetiline puu.

Salmonella enterica

Kõik kogutud *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Mbandaka* tüved kuulusid tüüpi ST314 ning pärinesid loomadelt. Keskkonnast isoleeritud *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Typhimurium* tüvi oli ST34. Ülekannet ei tuvastatud.

Seejuures tuleb märkida, et ST314 on olnud seostatud väga kõrge antibiootikumiresistentsuse tasemega (Wang et al., 2021). Eestist isoleeritud tüvedel aga resistentsust ei tuvastatud.

VIITED

Andrade LN, Novais Â, Stegani LMM, Ferreira JC, Rodrigues C, Darini ALC, Peixe L. 2018. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018 Jun;91(2):164-168. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.01.007. Epub 2018

Aun E, Kisand V, Laht M, Telling K, Kalmus P, Väli Ü, Brauer A, Remm M, Tenson T. 2021. Molecular Characterization of *Enterococcus* Isolates From Different Sources in Estonia Reveals Potential Transmission of Resistance Genes Among Different Reservoirs. *Front Microbiol.* 2021 Mar 26;12:601490. doi: 10.3389/fmicb.2021.601490. eCollection 2021.

David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, Abudahab K, Goater R, Giani T, Errico G, Aspbury M, Sjunnebo S; EuSCAPE Working Group; ESGEM Study Group, Feil EJ, Rossolini GM, Aanensen DM, Grundmann H. 2019. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019 Nov;4(11):1919-1929. doi: 10.1038/s41564-019-0492-8. Epub 2019 Jul 29.

Day MJ, Hopkins KL, Wareham DW, Toleman MA, Elviss N, Randall L, Teale C, Cleary P, Wiuff C, Doumith M, Ellington MJ, Woodford N, Livermore DM. 2019. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *Lancet Infect Dis.* 2019 Dec;19(12):1325-1335. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30273-7. Epub 2019 Oct 22

Fuga B, Sellera FP, Cerdeira L, Esposito F, Cardoso B, Fontana H, Moura Q, Cardenas-Arias A, Sano E, Ribas RM, Carvalho AC, Tognim MCB, de Moraes MMC, Quaresma AJPG, Santana ÂP, Reis JN, Pilonetto M, Vespero EC, Bonelli RR, Cerqueira AMF, Sincero TCM, Lincopan N. 2022. WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *Microbiol Spectr.* 2022 Apr 27;10(2):e0125621. doi: 10.1128/spectrum.01256-21. Epub 2022 Mar 2.

Hu Y, Anes J, Devineau S, Fanning S. 2021. *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence, Reservoirs, Antimicrobial Resistance, Pathogenicity, and Infection: A Hitherto Unrecognized Zoonotic Bacterium.

Foodborne Pathog Dis. 2021 Feb;18(2):63-84. doi: 10.1089/fpd.2020.2847. Epub 2020 Oct 30.

Kpeli G, Buultjens AH, Giulieri S, Owusu-Mireku E, Aboagye SY, Baines SL, Seemann T, Bulach D, Gonçalves da Silva A, Monk IR, Howden BP, Pluschke G, Yeboah-Manu D, Stinear T. 2017. Genomic analysis of ST88 community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Ghana.

PeerJ. 2017 Feb 28;5:e3047. doi: 10.7717/peerj.3047. eCollection 2017.

Kurittu P, Khakipoor B, Jalava J, Karhukorpi J, Heikinheimo A. 2022. Whole-Genome Sequencing of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Human Infections in Finland Revealed Isolates Belonging to Internationally Successful ST131-C1-M27 Subclade but Distinct From Non-human Sources.

Front Microbiol. 2022 Jan 4;12:789280. doi: 10.3389/fmicb.2021.789280. eCollection 2021.

Lienen T, Schnitt A, Cuny C, Maurischat S, Tenhagen BA. 2021. Phylogenetic Tracking of LA-MRSA ST398 Intra-Farm Transmission among Animals, Humans and the Environment on German Dairy Farms.

Microorganisms. 2021 May 21;9(6):1119. doi: 10.3390/microorganisms9061119.

Long SW, Olsen RJ, Eagar TN, Beres SB, Zhao P, Davis JJ, Brettin T, Xia F, Musser JM. 2017. Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307.

mBio. 2017 May 16;8(3):e00489-17. doi: 10.1128/mBio.00489-17.

Wang S, Liao X, Xiong Z, Lin Q, Wen J, Xu C, Qu X, Chen K, Zhang J. 2021. Characterization of the emerging multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST314 in China.

Zoonoses Public Health. 2021 Sep;68(6):622-629. doi: 10.1111/zph.12850. Epub 2021 May 18.

Xu L, Wan F, Fu H, Tang B, Ruan Z, Xiao Y, Luo Q. 2022. Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-10* in *Enterobacterales* Isolates Recovered from Fecal Samples of Chickens, Slaughterhouse Workers, and a Nearby Resident.

Microbiol Spectr. 2022 Apr 27;10(2):e0041822. doi: 10.1128/spectrum.00418-22. Epub 2022 Apr 12.