

Beata Irena Rozwadowska, Marta Albertyńska, Grzegorz Hudzik

**APPLICATION OF WHOLE GENOME SEQUENCING TO ASSESS
THE RELATEDNESS OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS STRAINS ISOLATED
IN THE SILESIAN VOIVODESHIP**

ZASTOSOWANIE SEKWENCJONOWANIA PEŁNOGENOMOWEGO DO OCENY
POKREWIEŃSTWA SZCZEPÓW *SALMONELLA* ENTERITIDIS WYIZOLOWANYCH
NA TERENIE WOJEWÓDZTWA ŚLĄSKIEGO

Voivodeship Sanitary and Epidemiological Station in Katowice, Poland
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach

ABSTRACT

BACKGROUND. Gram-negative *Salmonella* bacilli are one of the most common bacterial causes of gastrointestinal infections. Well-selected and targeted microbiological diagnostics enable the detection and identification of the etiological agent of infection, however, standardized, routine and recommended methods do not always allow for the identification of the biological agent in an unambiguous manner. Next-generation sequencing has become an ideal tool for identifying microorganisms and tracking infection transmission in outbreaks for epidemiological purposes.

OBJECTIVE. The aim of the study was to assess the genomic relatedness of *Salmonella* Enteritidis strains using whole genome sequencing in the foodborne outbreak in August-September 2023 in the Silesian Voivodeship.

MATERIAL AND METHODS. The research material consisted of 11 strains of *S. Enteritidis* for which whole genome sequencing was performed using Illumina technology and the relationship between serotypes was assessed using bioinformatics tools.

RESULTS. The genomes of all *S. Enteritidis* isolates were assigned to HC2_53128, which may indicate a very close relationship between the strains.

CONCLUSIONS. Whole genome sequencing enabled the assessment of the genomic relatedness of *S. Enteritidis* strains in the foodborne outbreak in August-September 2023 in the Silesian Voivodeship.

Key words: *NGS, WGS, Salmonella, foodborne outbreaks*

BACKGROUND

Gram-negative *Salmonella* bacilli are one of the most common bacterial causes of gastrointestinal infections. The genus *Salmonella* includes two species: *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*. *S. enterica* includes 6 subspecies, with each subspecies containing multiple serovars (serotypes). More than 2,500 serovars have been described, including those pathogenic to humans and animals. The subspecies *S. enterica* subsp. *enterica* has the most serovars and contains the most clinically significant serovars. Some of the most common serovars include: Enteritidis, Typhimurium, monophasic Typhimurium, Infantis and Virchow (1-4).

Mainly children under 5 years of age, people over 60 years of age and people who eat outside the home, especially in the summer, are most at risk of *Salmonella* infections. Infection occurs after consuming contaminated food and water and via the fecal-oral route. The sources of infection are mainly dairy products, eggs and poultry meat prepared in bad hygienic and sanitary conditions, without sufficient thermal treatment, as well as raw fruit and vegetables (5-8).

Salmonella bacilli are responsible for four clinical forms of infection, i.e. enteritis, sepsis, typhoid fever or paratyphoid fever, and asymptomatic carriage, of which the most common form of salmonellosis is enteritis. Symptoms usually appear after 12-72 hours and include nausea, vomiting and diarrhea. They may be accompanied by fever, abdominal cramps, muscle pain and headaches. Symptoms usually disappear spontaneously after about 4-7 days (1-3).

Well-selected and targeted microbiological diagnostics enable the detection and identification of the etiological agent of infection, however, standardized, routine and recommended methods do not always allow for the identification of the biological agent in an unambiguous manner. Therefore, Next Generation Sequencing (NGS) has become an ideal tool for identifying microorganisms and tracking the transmission of infections in outbreaks for epidemiological purposes (9). Sequencing using NGS technology enables verification and in-depth analysis of the whole genome of microorganisms (WGS, Whole Genome Sequencing) (10). The advantages of using this technology in the field of epidemiology were clearly visible during the COVID-19 pandemic, when it was widely used for molecular surveillance of circulating variants of the SARS-CoV-2 (11). Currently, NGS is widely used in research in the field of oncology and diagnosis of genetic diseases, while the use of this technology in microbiological diagnostics on a large scale requires methodological standardization (9).

The aim of the study was to assess the genomic relatedness of *Salmonella* Enteritidis strains using whole genome sequencing in the foodborne outbreak in August-September 2023 in the Silesian Voivodeship.

MATERIAL AND METHODS

The research material consisted of 11 strains of *S. Enteritidis*, delivered to the Interdisciplinary Molecular Diagnostics Laboratory at the Voivodeship Sanitary and Epidemiological Station (WSSE) in Katowice by the District Sanitary and Epidemiological Station (PSSE) in Tychy and the Food Microbiology Laboratory in the WSSE in Katowice, in order to whole genome sequencing and assess the relationship between serotypes. The strains were cultured from 9 stool samples (Sal Seq 59-67) delivered to the PSSE Laboratory in Tychy from sick people and carriers in August-September 2023, and from 2 food samples (Sal Seq 68-69), collected from outbreak of food poisoning by the PSSE in Tychy. The tests were carried out using the bacterial cultures and then confirmed by biochemical and serological methods based on the "Recommendations for laboratory diagnosis of gastrointestinal infections with bacteria growing in aerobic and microaerophilic conditions". Serotype was determined according to the White-Kauffmann-Le Minor scheme (12).

Sequencing was performed by NGS using the MiniSeq system (Illumina, San Diego, CA, USA). All sample preparation steps and sequencing libraries were performed according to the Illumina DNA Prep protocol.

In order to assess the relationship between the strains, sequencing data in the form of FASTQ files were entered into the EnteroBase (Warwick Medical School, University of Warwick, UK), where cgMLST (Core Genome Multi-Locus Sequence Typing) and HierCC (Hierarchical Clustering of CgMLST) and Achtman 7 gene MLST analyzes were performed. *S. Enteritidis* serotypes were verified and confirmed using the SISTR1 and SeqSero2 algorithm in EnteroBase.

RESULTS

Genosertotyping performed using the SISTR1 and SeqSero2 algorithm confirmed the *S. Enteritidis* serotype (9:g,m:-) in all sequenced isolates. MLST typing showed that all sequenced *S. Enteritidis* strains belong to the ST11 type and show no differences in 7 housekeeping genes.

In the cgMLST + HierCC analysis in the EnteroBase, all *S. Enteritidis* isolates were assigned to HC2_53128, which may indicate a very close relationship between the strains. The HC2 (Hierarchical Clustering) cut-off means that the maximum allelic difference between genomes is 2.

The genomes of six isolates with Sal Seq numbers 60, 62, 63, 65, 67, 69 were assigned to HC0_53128, which may indicate that these strains do not show any differences between the genomes. The HC0 cut-off means maximum allelic difference between genomes is 0 (Table 1).

DISCUSSION

Next Generation Sequencing represents a technological revolution after Sanger sequencing, which was first introduced in 1977. Mass and commercial sequencing has only been in operation for about a dozen years. NGS is a technology that enables the simultaneous sequencing of millions of DNA or RNA sequences. The advantage of NGS compared to Sanger sequencing is higher throughput due to the possibility of multiplexing samples and, consequently, lower sequencing cost. The increase in sequencing throughput has changed the view of the genome. Currently, a human genome can be sequenced in just a few days. Reducing the costs of sequencing has caused this method being used in medicine and diagnostics, especially in the prognosis and therapy of hereditary diseases, cancers and infectious diseases (13-15).

Whole genome sequencing of microorganisms enables their identification for clinical and epidemiological purposes. According to the latest recommendations of EFSA (European Food Safety Authority) regarding the use of WGS in outbreaks, it is recommended to use the SeqSero2 algorithm to identify *Salmonella* serotypes. Its advantage is the ability to determine the serotype directly from raw sequencing reads, i.e. without time-consuming genome assembly (16,17).

Genetic typing is also used to assess relatedness and to track transmission in epidemiological investigations. The MLST method is considered the gold standard in genotyping for many bacterial pathogens. This method provides clear and repeatable results thanks to general access to sequences and tools for analysis and comparison. This technique plays a significant role in analyzes of populations, strains or outbreaks on a global scale (18). Basically, the MLST method is based on the sequencing of seven basic metabolism genes, while its extended version is currently preferred, based on the core genome, i.e. a set of genes found in all strains of a given species – cgMLST. Additionally, hierarchical clustering (HierCC) is performed based on cgMLST (10,18). Strains at the HC5 level and above are considered

endemic strains, while strains belonging to the HC2 and HC0 levels are considered closely related strains. However, this interpretation may vary depending on the variability of the pathogen and the dispersion of the outbreak.

WGS analysis conducted by the WSSE laboratory in Katowice showed not only the relationship between the strains isolated from sick people and carriers, but also confirmed the presence of the same strain in the material isolated from food samples. The close relationship between strains from feces and food, demonstrated by cgMLST+HierCC analysis, may indicate that the source of infection in the outbreak was contaminated food.

In 2022, WGS enabled the identification of one of the largest outbreaks of *S. Typhimurium* infection in Europe, the source of which was chocolate. It was similar in the case of the epidemiological investigation into the outbreak of *S. Mbandaka* (2022) and *S. Enteritidis* (2023) infections, isolated from poultry meat. The activities were coordinated by EFSA and ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) (19-21). Furthermore, WGS helps detect not only known antimicrobial resistance genes and mechanisms, but also new genes or mechanisms that are not currently defined. For example, WGS is also used to identify *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Clostridioides*, *Cronobacter*, *Helicobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Yersinia*, and *Vibrio* (10).

NGS technologies are changing the face of clinical microbiological diagnostics. Although NGS cannot replace the conventional microbiology, the amount of information provided by sequencing will certainly improve patient care and epidemiological surveillance of infections and infectious diseases.

CONCLUSIONS

- Whole genome sequencing enabled the assessment of the genomic relatedness of *S. Enteritidis* strains in the foodborne outbreak in August-September 2023 in the Silesian Voivodeship
- Close genetic similarity was demonstrated between the analyzed *S. Enteritidis* genomes, which may indicate a common origin and source of transmission of the isolated strains.

Table 1. Results of cgMLST and HierCC analysis performed using EnteroBase

Tabela 1. Wyniki analizy cgMLST i HierCC przeprowadzonej z wykorzystaniem EnteroBase

No.	Sample code	Serovar	Antigenic pattern	Barcode from EnteroBase	HC0	HC2	HC5	HC10
1.	Sal Seq 59	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4683AA	377659	53128	1358	413
2.	Sal Seq 60	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4686AA	53128	53128	1358	413
3.	Sal Seq 61	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4687AA	377664	53128	1358	413
4.	Sal Seq 62	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4690AA	53128	53128	1358	413
5.	Sal Seq 63	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4691AA	53128	53128	1358	413
6.	Sal Seq 64	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4689AA	377668	53128	1358	413
7.	Sal Seq 65	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4688AA	53128	53128	1358	413
8.	Sal Seq 66	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4707AA	377671	53128	1358	413
9.	Sal Seq 67	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4706AA	53128	53128	1358	413
10.	Sal Seq 68	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4703AA	377671	53128	1358	413
11.	Sal Seq 69	<i>S. Enteritidis</i>	9:g,m:-	SAL_UB4705AA	53128	53128	1358	413

REFERENCES

1. Dekker J, Frank K. Salmonella, Shigella, and Yersinia. Clin Lab Med. 2015;35(2):225–246.
2. Andino A, Hanning I. Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. ScientificWorldJournal. 2015;520179.
3. Yin Y, Zhou D. Organoid and Enteroid Modeling of Salmonella Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:102.
4. Le Minor L, Popoff MY. Request for an Opinion. Designation of Salmonella enterica sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus Salmonella. Int J Syst Bacteriol. 1987; 37:465–468.

5. Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9:270.
6. Ajmera A, Shabbir N. Salmonella. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
7. Johnson R, Mylona E, Frankel G. Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2018;20(9): e12939.
8. Kowalska B. Fresh vegetables and fruit as a source of Salmonella bacteria. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.* 2023;30(1):9–14.
9. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic Laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019; 38(6):1059–1070.
10. Hilt EE, Ferrieri P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. *Genes (Basel).* 2022;13(9):1566.
11. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.* 2021;43(2):845–867.
12. Szych J. Rekomendacje laboratoryjnej diagnostyki zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych oraz mikroaerofilnych. NIZP PZH i KIDL. Warszawa 2015;1-36.
13. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2019;9(11): a036798.
14. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Ann Lab Med.* 2021;41(1):25–43.
15. Pervez MT, Hasnain MJ, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *Biomed Res Int.* 2022; 3457806.
16. Zhang S, den Bakker HC, Li S, Chen J, Dinsmore BA, Lane C, et al. SeqSero2: Rapid and Improved Salmonella Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. *Applied and Environmental Microbiology.* 2019;85(23). e01746-19.
17. EFSA (European Food Safety Authority), Costa G, Di Piazza G, Koevoets P, Iacono G, Liebana E, et al. Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data

through the EFSA One Health WGS System. EFSA Supporting Publication 2022: 19(6): EN-7413. 29 pp. doi:[10.2903/sp.efsa.2022.EN-7413](https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7413)

18. Artyszuk D, Wołkowicz T. Zastosowanie sekwencjonowania pełnogenomowego do genotypowania bakterii. *Post. Mikrobiol.* 2018; 57(2):179–193.
19. Larkin L, Pardos de la Gandara M, Hoban A, Pulford C, Jourdan-Da Silva N, de Valk H et al. Investigation of an international outbreak of multidrug-resistant monophasic *Salmonella* Typhimurium associated with chocolate products, EU/EEA and United Kingdom, February to April 2022. *Euro Surveill.* 2022;27(15):pii=2200314.
20. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2024. Multi-country outbreak of *Salmonella* Mbandaka ST413 linked to consumption of chicken meat products in the EU/EEA and the UK – first update - 21 March 2024.
21. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2023. Three clusters of *Salmonella* Enteritidis ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products – 26 October 2023.

Received: 17.05.2024

Accepted for publication: 30.08.2024

Otrzymano: 17.05.2024

Zaakceptowano do publikacji: 30.08.2024

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Beata Irena Rozwadowska

Interdyscyplinarna Pracownia Diagnostyki Molekularnej,

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach

Raciborska 39, 40-074, Katowice

e-mail: rozwadowska.beata@sanepid.gov.pl

Beata Irena Rozwadowska, Marta Albertyńska, Grzegorz Hudzik

**APPLICATION OF WHOLE GENOME SEQUENCING TO ASSESS
THE RELATEDNESS OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS STRAINS ISOLATED
IN THE SILESIAN VOIVODESHIP**

ZASTOSOWANIE SEKWENCJONOWANIA PEŁNOGENOMOWEGO DO OCENY
POKREWIEŃSTWA SZCZEPÓW *SALMONELLA* ENTERITIDIS WYIZOLOWANYCH
NA TERENIE WOJEWÓDZTWA ŚLĄSKIEGO

Voivodeship Sanitary and Epidemiological Station in Katowice, Poland
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach

STRESZCZENIE

WPROWADZENIE. Gram-ujemne pałeczki *Salmonella* są jedną z najczęstszych bakteryjnych przyczyn zakażeń jelitowo-żołądkowych. Dobrze dobrana i celowana diagnostyka mikrobiologiczna umożliwia wykrycie i identyfikację czynnika etiologicznego zakażenia, jednakże nie zawsze metody wystandaryzowane, rutynowe i rekomendowane pozwalają na identyfikację czynnika biologicznego w sposób jednoznaczny. Sekwencjonowanie nowej generacji stało się idealnym narzędziem do identyfikacji mikroorganizmów oraz śledzenia transmisji zakażeń w ogniskach do celów epidemiologicznych.

CEL. Celem badania była ocena pokrewieństwa genomowego szczepów *Salmonella* Enteritidis z wykorzystaniem sekwencjonowania pełnogenomowego w ognisku zatrucia zbiorowego w okresie sierpień-wrzesień 2023 r. na terenie województwa śląskiego.

MATERIAŁ I METODY. Materiał do badań stanowiło 11 szczepów *S. Enteritidis*, dla których przeprowadzono sekwencjonowanie pełnogenomowe w technologii Illumina oraz dokonano oceny pokrewieństwa pomiędzy serotypami z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych.

WYNIKI. Genomy wszystkich izolatów *S. Enteritidis* zostały przypisane do HC2_53128, co może wskazywać na bardzo bliskie pokrewieństwo pomiędzy szczepami.

WNIOSKI. Sekwencjonowanie pełnogenomowe umożliwiło ocenę pokrewieństwa genomowego szczepów *S. Enteritidis* w ognisku zatrucia zbiorowego w okresie sierpień-wrzesień 2023 r. na terenie województwa śląskiego.

Słowa kluczowe: NGS, WGS, *Salmonella*, ognisko zatrucia

WSTĘP

Gram-ujemne pałeczki *Salmonella* są jedną z najczęstszych bakteryjnych przyczyn zakażeń jelitowo-żołądkowych. Do rodzaju *Salmonella* zalicza się dwa gatunki: *Salmonella enterica* oraz *Salmonella bongori*. *S. enterica* obejmuje 6 podgatunków, z czego każdy podgatunek zawiera wiele serowarów (serotypów). Opisano ponad 2500 serowarów, w tym serowary patogenne dla człowieka i zwierząt. Podgatunek *S. enterica* subsp. *enterica* posiada najwięcej serowarów i zawiera serowary najbardziej znaczące z klinicznego punktu widzenia. Jednymi z najczęściej występujących serowarów są m.in. Enteritidis, Typhimurium, jednofazowa Typhimurium, Infantis i Virchow (1-4).

Na zakażenia wywołane *Salmonella* narażone są głównie dzieci poniżej 5 roku życia, osoby powyżej 60 roku życia oraz osoby, które spożywają pokarmy poza domem, szczególnie w okresie letnim. Do zakażenia dochodzi po spożyciu zanieczyszczonej żywności i wody oraz drogą fekalno-oralną. Źródłem zakażenia są głównie produkty nabiałowe, jajka oraz mięso drobiowe przygotowane w złych warunkach higieniczno-sanitarnych, bez wystarczającej obróbki termicznej, a także surowe owoce i warzywa (5-8).

Pałeczki *Salmonella* odpowiadają za cztery postacie kliniczne zakażenia tj. zapalenie jelit, sepsę, dur brzuszny i dury rzekome oraz bezobjawowe nosicielstwo, z czego najczęstszą postacią salmonellozy jest zapalenie jelit. Objawy pojawiają się zwykle po 12-72 godzinach i są to nudności, wymioty, biegunka. Towarzyszyć im może gorączka, skurcze brzucha oraz bóle mięśni i głowy. Objawy zwykle po około 4-7 dniach ustępują samoistnie (1-3).

Dobrze dobrana i celowana diagnostyka mikrobiologiczna umożliwia wykrycie i identyfikację czynnika etiologicznego zakażenia, jednakże nie zawsze metody wystandaryzowane, rutynowe i rekomendowane pozwalają na identyfikację czynnika biologicznego w sposób jednoznaczny. Dlatego też sekwencjonowanie nowej generacji NGS (ang. *Next Generation Sequencing*) stało się idealnym narzędziem do identyfikacji mikroorganizmów oraz śledzenia transmisji zakażeń w ogniskach do celów epidemiologicznych (9). Sekwencjonowanie w technologii NGS umożliwia weryfikację i dogłębną analizę całego genomu mikroorganizmów (WGS, ang. *Whole Genome Sequencing*) (10). Zalety zastosowania tej technologii w obszarze epidemiologii były dobrze widoczne w dobie pandemii COVID-19, kiedy to na szeroką skalę wykorzystywano ją do nadzoru molekularnego nad krążącymi wariantami wirusa SARS-CoV-2 (11). Obecnie NGS ma szerokie zastosowanie w badaniach z zakresu onkologii i diagnostyki chorób o podłożu genetycznym, natomiast wykorzystanie tej technologii w diagnostyce mikrobiologicznej na szeroką skalę wymaga między innymi standaryzacji metodologicznej (9).

Celem badania była ocena pokrewieństwa genomowego szczepów *Salmonella* Enteritidis z wykorzystaniem sekwencjonowania pełnogenomowego w ognisku zatrucia zbiorowego w okresie sierpień-wrzesień 2023 r. na terenie województwa śląskiego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 11 szczepów *S. Enteritidis*, przekazanych do Interdyscyplinarnej Pracowni Diagnostyki Molekularnej w Wojewódzkiej Stacji Sanitarno-Epidemiologicznej w Katowicach przez Powiatową Stację Sanitarno-Epidemiologiczną w Tychach oraz Pracownię Mikrobiologii Żywności WSSE w Katowicach, w celu przeprowadzenia sekwencjonowania pełnogenomowego i oceny pokrewieństwa pomiędzy serotypami. Szczepy zostały wyhodowane z 9 próbek kału (Sal Seq 59 – 67) dostarczonych do Laboratorium PSSE w Tychach od osób chorych i nosicieli w okresie sierpień-wrzesień 2023 r., oraz z 2 próbek żywności (Sal Seq 68-69), pobranych w ramach opracowania ogniska zatrucia pokarmowego na obszarze nadzorowanym przez PSSE w Tychach. Badania były przeprowadzone metodą hodowlaną, a następnie potwierdzone metodami biochemicznymi i serologicznymi w oparciu o „Rekomendacje laboratoryjnej diagnostyki zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych oraz mikroaerofilnych”. Serotyp określono zgodnie ze schematem White’a-Kauffmanna-Le Minora (12).

Sekwencjonowanie przeprowadzono metodą NGS z wykorzystaniem systemu MiniSeq (Illumina, San Diego, CA, USA). Wszystkie etapy przygotowania próbek oraz biblioteki do sekwencjonowania przeprowadzono zgodnie z protokołem Illumina DNA Prep.

W celu oceny pokrewieństwa pomiędzy szczepami dane sekwencjonowania w postaci plików FASTQ zostały wprowadzone do bazy EnteroBase (Warwick Medical School, University of Warwick, UK), gdzie dokonano analizy cgMLST (ang. *Core Genome Multi-Locus Sequence Typing*) i HierCC (ang. *Hierarchical Clustering of CgMLST*) oraz Achtman 7 gene MLST. Przynależność do serotypu *S. Enteritidis* została zweryfikowana i potwierdzona z wykorzystaniem algorytmu SISTR1 i SeqSero2 w EnteroBase.

WYNIKI

Genoserotypowanie przeprowadzone z wykorzystaniem algorytmu SISTR1 i SeqSero2 potwierdziło serotyp *S. Enteritidis* (9: g,m:-) we wszystkich zsekwencjonowanych izolatach. Typowanie MLST wykazało, że wszystkie zsekwencjonowane szczepy *S. Enteritidis* należą do typu ST11 i nie wykazują różnic w odniesieniu do 7 genów metabolizmu podstawowego.

W analizie cgMLST + HierCC w bazie EnteroBase wszystkie izolaty *S. Enteritidis* zostały przypisane do HC2_53128, co może wskazywać na bardzo bliskie pokrewieństwo pomiędzy szczepami. Punkt odcięcia HC2 (ang. *Hierarchical Clustering*) oznacza, że maksymalna różnica alleliczna między genomami wynosi 2.

Genomy sześciu izolatów o numerach Sal Seq 60, 62, 63, 65, 67, 69 zostały przypisane do HC0_53128, co może wskazywać, że szczepy te nie wykazują żadnych różnic pomiędzy genomami. Punkt odcięcia HC0 – maksymalna różnica alleliczna między genomami wynosi 0 (Tabela 1).

DYSKUSJA

Sekwencjonowanie nowej generacji NGS stanowi prawdziwą rewolucję technologiczną po sekwencjonowaniu Sangera, które zostało po raz pierwszy wprowadzone w 1977 roku. Masowe i komercyjne sekwencjonowanie funkcjonuje dopiero od około kilkunastu lat. Sekwencjonowanie nowej generacji to technologia umożliwiająca jednoczesne sekwencjonowanie milionów sekwencji DNA lub RNA. Zaletą NGS w porównaniu z sekwencjonowaniem metodą Sangera jest wyższa przepustowość, spowodowana możliwością multipleksowania próbek, a co za tym idzie niższy koszt sekwencjonowania. Wzrost przepustowości sekwencjonowania zmienił spojrzenie na genom. Obecnie genom człowieka można zsekwencjonować w ciągu zaledwie kilku dni. Obniżenie kosztów sekwencjonowania spowodowało, że metoda ta znalazła zastosowanie w medycynie i diagnostyce, zwłaszcza w prognozowaniu i terapii chorób dziedzicznych, nowotworów i chorób zakaźnych (13-15).

Sekwencjonowanie całego genomu (WGS) mikroorganizmów pozwala na ich identyfikację do celów klinicznych i epidemiologicznych. Według najnowszych rekomendacji EFSA (ang. *European Food Safety Authority*, Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności) dotyczących wykorzystania WGS w ogniskach, do identyfikacji serotypów *Salmonella* zaleca się stosowanie algorytmu SeqSero2. Jego zaletą jest możliwość określenia serotypu bezpośrednio z surowych odczytów sekwencjonowania, czyli bez czasochłonnego składania genomu (16,17).

Typowanie genetyczne wykorzystywane jest również do oceny pokrewieństwa i w celu śledzenia transmisji w dochodzeniach epidemiologicznych. Metoda MLST jest uznawana jako złoty standard w genotypowaniu dla wielu bakteryjnych patogenów. Metoda ta dostarcza jednoznaczne i powtarzalne wyniki dzięki ogólnemu dostępowi do sekwencji oraz narzędzi pozwalających na analizę i porównywanie. Technika ta odgrywa znaczną rolę w szerszych analizach populacji, szczepów czy też ognisk w skali globalnej (18). Zasadniczo metoda MLST

opiera się na sekwencjonowaniu siedmiu genów metabolizmu podstawowego, natomiast obecnie preferowana jest jej szersza odmiana oparta na genomie rdzeniowym, czyli zbiorze genów występujących u wszystkich szczepów danego gatunku – cgMLST. Dodatkowo w oparciu o cgMLST dokonuje się hierarchicznego klastrowania – HierCC (10,18). Szczepy identyczne tylko przy poziomie HC5 i wyżej uważa się za szczepy występujące endemicznie, natomiast szczepy należące do poziomu HC2 i HC0 za szczepy blisko spokrewnione. Jednakże, interpretacja ta może być inna w zależności od zmienności patogenu i rozproszenia ogniska.

Analiza WGS przeprowadzona przez laboratorium WSSE w Katowicach wykazała nie tylko pokrewieństwo pomiędzy wyizolowanymi szczepami od osób chorych i nosicieli, ale również potwierdziła obecność tego samego szczepu w materiale wyizolowanym z próbek żywności. Bliskie pokrewieństwo pomiędzy szczepami wyhodowanymi z kału i żywności, wykazane za pomocą analizy cgMLST+HierCC może świadczyć, że źródłem zakażenia w ognisku była skażona żywność.

W 2022 roku WGS umożliwiło identyfikację jednego z największych ognisk zakażenia *S. Typhimurium* w Europie, której źródłem była czekolada. Podobnie było w przypadku dochodzenia epidemiologicznego w ognisku zakażeń *S. Mbandaka* (2022 r.) i *S. Enteritidis* (2023 r.), wyizolowanych z mięsa drobiowego. Działania były koordynowane przez EFSA i ECDC (ang. *European Centre for Disease Prevention and Control*, Europejskie Centrum ds. Zapobiegania i Kontroli Chorób) (19,20,21). Ponadto WGS pomaga w wykrywaniu nie tylko znanych genów i mechanizmów oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, ale także nowych genów lub mechanizmów, które nie są obecnie zdefiniowane. Przykładowo WGS wykorzystywany jest również do identyfikacji *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Clostridioides*, *Cronobacter*, *Helicobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Yersinia*, i *Vibrio* (10).

Technologie NGS zmieniają oblicze klinicznej diagnostyki mikrobiologicznej. Chociaż NGS nie może zastąpić konwencjonalnego laboratorium mikrobiologicznego, ilość informacji dostarczanych z sekwencjonowania na pewno poprawi opiekę nad pacjentem oraz nadzór epidemiologiczny nad zakażeniami i chorobami zakaźnymi.

WNIOSKI

- Sekwencjonowanie pełnogenomowe umożliwiło ocenę pokrewieństwa genomowego szczepów *S. Enteritidis* w ognisku zatrucia zbiorowego w okresie sierpień-wrzesień 2023 r. na terenie województwa śląskiego
- Wykazano bliskie genetyczne podobieństwo pomiędzy analizowanymi genomami

S. Enteritidis, co może wskazywać na wspólne pochodzenie i źródło transmisji wyizolowanych szczepów.

PIŚMIENNICTWO

1. Dekker J, Frank K. Salmonella, Shigella, and Yersinia. Clin Lab Med. 2015;35(2):225–246.
2. Andino A, Hanning I. Salmonella enterica: survival, colonization, and virulence differences among serovars. ScientificWorldJournal. 2015;520179.
3. Yin Y, Zhou D. Organoid and Enteroid Modeling of Salmonella Infection. Front Cell Infect Microbiol. 2018; 8:102.
4. Le Minor L, Popoff MY. Request for an Opinion. Designation of Salmonella enterica sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus Salmonella. Int J Syst Bacteriol. 1987; 37:465–468.
5. Lou L, Zhang P, Piao R, Wang Y. Salmonella Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. Front Cell Infect Microbiol. 2019; 9:270.
6. Ajmera A, Shabbir N. Salmonella. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555892/>
7. Johnson R, Mylona E, Frankel G. Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. Cell Microbiol. 2018;20(9): e12939.
8. Kowalska B. Fresh vegetables and fruit as a source of Salmonella bacteria. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2023;30(1):9–14.
9. Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic Laboratory. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019; 38(6):1059–1070.
10. Hilt EE, Ferrieri P. Next Generation and Other Sequencing Technologies in Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases. Genes (Basel). 2022;13(9):1566.
11. John G, Sahajpal NS, Mondal AK, Ananth S, Williams C, Chaubey A, et al. Next-Generation Sequencing (NGS) in COVID-19: A Tool for SARS-CoV-2 Diagnosis, Monitoring New Strains and Phylodynamic Modeling in Molecular Epidemiology. Curr Issues Mol Biol. 2021;43(2):845–867.
12. Szych J. Rekomendacje laboratoryjnej diagnostyki zakażeń przewodu pokarmowego bakteriami rosnącymi w warunkach tlenowych oraz mikroaerofilnych. NIZP PZH i KIDL. Warszawa 2015;1-36.

13. McCombie WR, McPherson JD, Mardis ER. Next-Generation Sequencing Technologies. Cold Spring Harb Perspect Med. 2019;9(11): a036798.
14. Zhong Y, Xu F, Wu J, Schubert J, Li MM. Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. Ann Lab Med. 2021;41(1):25–43.
15. Pervez MT, Hasnain MJ, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. Biomed Res Int. 2022; 3457806.
16. Zhang S, den Bakker HC, Li S, Chen J, Dinsmore BA, Lane C, et al. SeqSero2: Rapid and Improved Salmonella Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data. Applied and Environmental Microbiology. 2019;85(23). e01746-19.
17. EFSA (European Food Safety Authority), Costa G, Di Piazza G, Koevoets P, Iacono G, Liebana E, et al. Guidelines for reporting Whole Genome Sequencing-based typing data through the EFSA One Health WGS System. EFSA Supporting Publication 2022: 19(6): EN-7413. 29 pp. doi:[10.2903/sp.efsa.2022.EN-7413](https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7413)
18. Artyszuk D, Wołkowicz T. Zastosowanie sekwencjonowania pełnogenomowego do genotypowania bakterii. Post. Mikrobiol. 2018; 57(2):179–193.
19. Larkin L, Pardos de la Gandara M, Hoban A, Pulford C, Jourdan-Da Silva N, de Valk H et al. Investigation of an international outbreak of multidrug-resistant monophasic Salmonella Typhimurium associated with chocolate products, EU/EEA and United Kingdom, February to April 2022. Euro Surveill. 2022;27(15):pii=2200314.
20. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2024. Multi-country outbreak of *Salmonella* Mbandaka ST413 linked to consumption of chicken meat products in the EU/EEA and the UK – first update - 21 March 2024.
21. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority, 2023. Three clusters of *Salmonella* Enteritidis ST11 infections linked to chicken meat and chicken meat products – 26 October 2023.

Received: 17.05.2024

Accepted for publication: 30.08.2024

Otrzymano: 17.05.2024

Zaakceptowano do publikacji: 30.08.2024

Address for correspondence:

Adres do korespondencji:

Beata Irena Rozwadowska

Interdyscyplinarna Pracownia Diagnostyki Molekularnej,

Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Katowicach,
Raciborska 39, 40-074, Katowice
email: rozwadowska.beata@sanepid.gov.pl