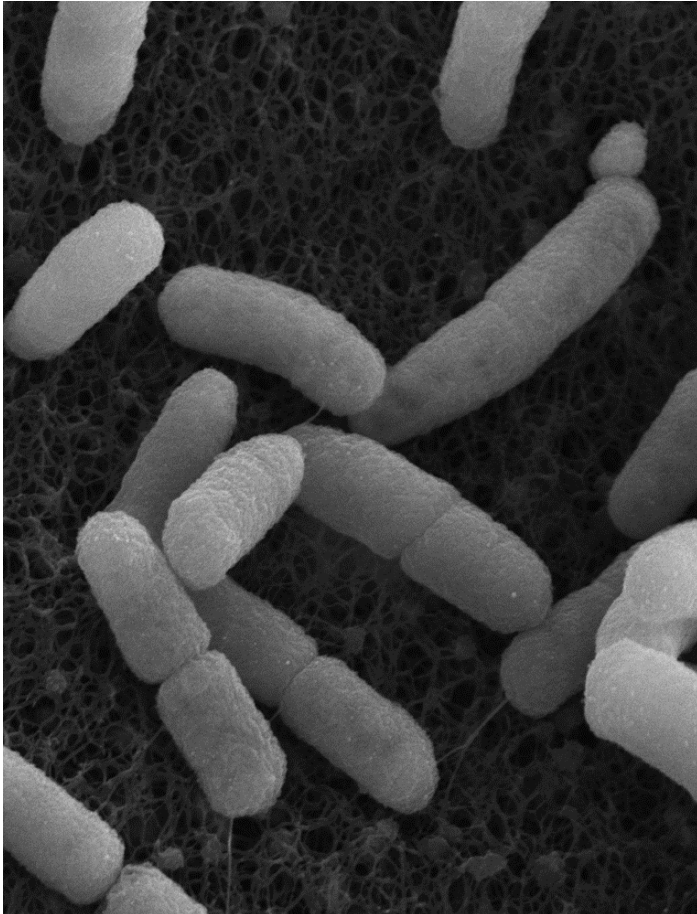




ROBERT KOCH INSTITUT



## Sequenziertechnologien & Public Health

Guido Werner

NRZ Staphylokokken und Enterokokken  
FG Nosokomiale Infektionserreger und  
Antibiotikaresistenzen  
Abteilung Infektionskrankheiten  
Robert Koch Institut, Bereich Wernigerode

Berlin, 30.03.201, Fortbildung für den ÖGD

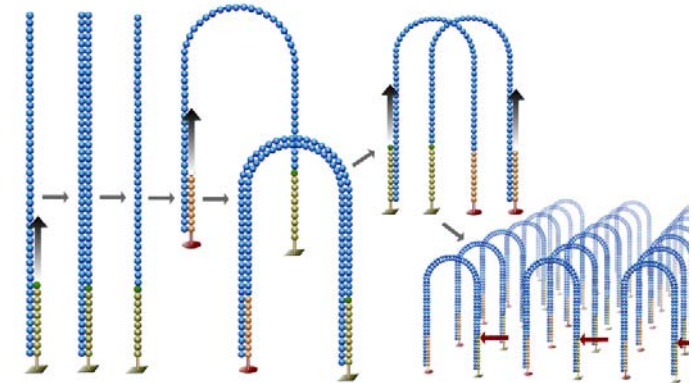
## Agenda

- Kurze Vorstellung der Sequenziertechnologien
- Auswertestrategien mit generierten Genom(roh)daten
- Anwendungsbeispiele im Bereich Public

Health/Krankenhausinfektionen

## Nächste Generation an Sequenziertechniken

- Marktführer derzeit: **illumina** mit Solexa Technologie
- **Prinzip:** parallelisierte Sequenzierung durch Synthese mit „Brückenamplifikation“ auf Trägeroberfläche
- **Endprodukt:** Millionen kurze Einzelstränge
- **Fehler:** wenige, korrigiert durch vielfache Abdeckung pro Nukleotid („coverage“)
- **Vorteile:** vergleichsweise günstig (<200 Euro) und schnell („rapid run“), geeignet für hochparalleles Arbeiten:
  - Illumina Hiseq Geräte erlauben die **Sequenzierung von 100 – 200 Bakteriengenomen in**



1 Lauf



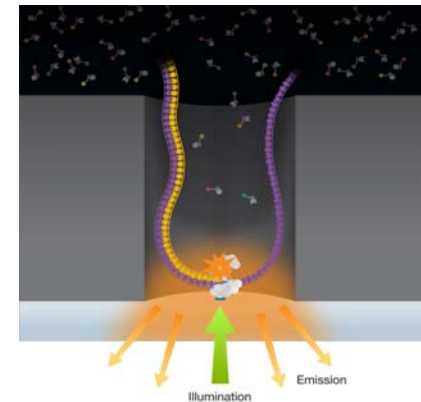
HiSeq2000

MiSeq



### 3. Generation an Sequenziertechniken

- Seit einigen Jahren am Markt
- Anbieter: z.B. Pacific Biosciences
- **Prinzip:** Einzel-Molekül-Echtzeit-Sequenzierung (SMRT)
- **Endprodukt:** Lange DNS-Stränge bis zu 40 kbp
- **Fehler:** hoch (PacBio, ca. 15%), korrigiert durch mehrfache Abdeckung pro Nukleotid („coverage“)
- **Vorteil:** Generierung langer DNS Fragmente, ideal zu Rekonstruktion neuer und komplexer Genome und mobiler Elemente; Spezialanwendungen (Methylierung)
- **Nachteil:** vergleichsweise teuer, technisch anspruchsvoll, Daten!
- **Alternative:** Oxford Nanopore MinION



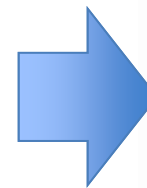
# Arbeiten mit Genomfragmenten



NGS



3<sup>rd</sup>GS/SMS



Bildquellen: fotopuzzle.de; 123rf.com; eurofinns.de; illumina.de;

## Sequenziertechnologie!




**KOSTEN! 90 - 130 Euro/Isolat**

**ZEIT! Wenige Tage**

**Multiplexing**




**NGS**



**KOSTEN! Ca. 2200 Euro/Isolat**

**ZEIT! Wochen**

**KEIN Multiplexing**



**3<sup>rd</sup>GS/SMS**

Bildquellen: fotopuzzle.de; 123rf.com; eurofinns.de; illumina.de;



## Von der Genomsequenz zur Verwandtschaft

- Erfassung der **gesamten Erbinformation** erlaubt **ultimative Informationstiefe**
  - **Phylogenie/Verwandtschaftsvergleich** – Public Health
  - **Diagnostische Aspekte** (Toxine, Resistenzen) – Therapie (Public Health)
- Genome sind nicht starr, sondern unterliegen einer **permanenten Veränderung**
- Ein Vergleich von **sich homogen ändernden Regionen** im Genom enthält ein zeitliches/evolutionäres Signal (Mutationen/Jahr; „**trace back**“);
- Bestätigung von **akuten Ausbrüchen** und Erkennen von „**diffusen**“ Ausbrüchen
- **Strategien**
  - **Mapping** (Einzelnukleotid-Unterschiede – SNP) vs. **Assembly** („Kerngenoms“ - cgMLST)



## Auswertestrategien – Variante 1 – „Mapping“ gegen Referenz

*Vorhandensein einer Referenz: Mapping* („puzzeln nach Vorlage“)



Ziel: Vergleich von Unterschieden zwischen den Isolaten  
(„Single Nucleotide Polymorphisms“ - SNPs)

→ Ausbruchsanalysen/Transmissionsgeschehen





## Auswertestrategien – Variante 1 – „Mapping“ gegen Referenz

CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG

iso01	CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG
iso02	CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAG <b>T</b> TTGG
iso03	CGATTAAAGATAGAAATACACGAT <b>C</b> GAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG
iso04	CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG
iso05	CGATTAAAGATAGAAAT-----TGCAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG
iso06	CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG
iso07	CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAG <b>G</b> CTTGG
iso08	CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG
iso09	CGATTAAAGATAGAAATA <b>TCC</b> GATGCGAGCAATTTTCATAA <b>A</b> ATCACCATGAGCTTGG
iso10	CGATT <b>T</b> AAGATAGAAATAC <b>C</b> GATGCGAGCAATTTTCATAACATC <b>G</b> CCATGAGCTTGG



## Auswertestrategien – Variante 1 – „Mapping“ gegen Referenz

iso01	AACACGAGCAGC
iso02	AACACGAGCAG <b>T</b>
iso03	AACACGA <b>C</b> CAGC
iso04	AACACGAGCAGC
iso05	A-----GCAGC
iso06	AACACGAGCAGC
iso07	AACACGAGCAG <b>C</b>
iso08	AACACGAGCAGC
iso09	AA <b>T</b> CCGAG <b>A</b> AGC
iso10	<b>T</b> AC <b>C</b> CGAG <b>C</b> GC

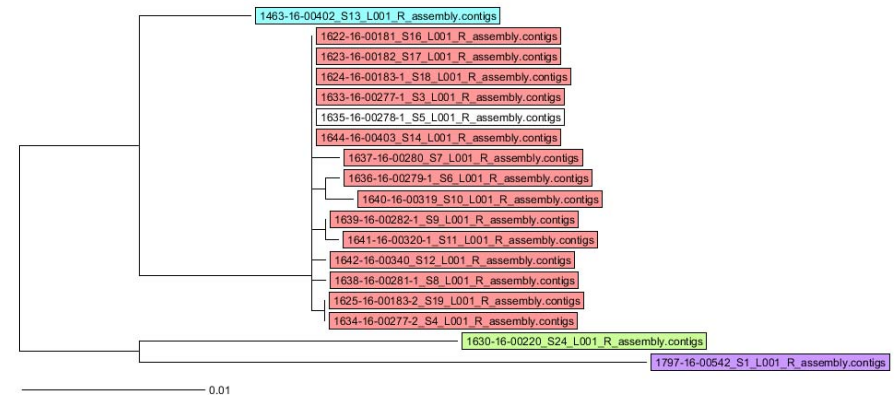
### Reduktion auf die unterscheidenden Anteile

- Vorteil: schnelleres Rechnen
- Nachteil: Informationen gehen verloren
- Analysen abhängig von Anzahl der Isolate

### Beim Mapping keine Aussagen über

- Variable Elemente (Plasmide)
- Virulenzgenen (Toxine)
- Resistenzen

} z.T. diagnostisch wertvolle Informationen





## Auswertestrategien – Variante 1 – „Mapping“ gegen Referenz

### ■ Vorteile

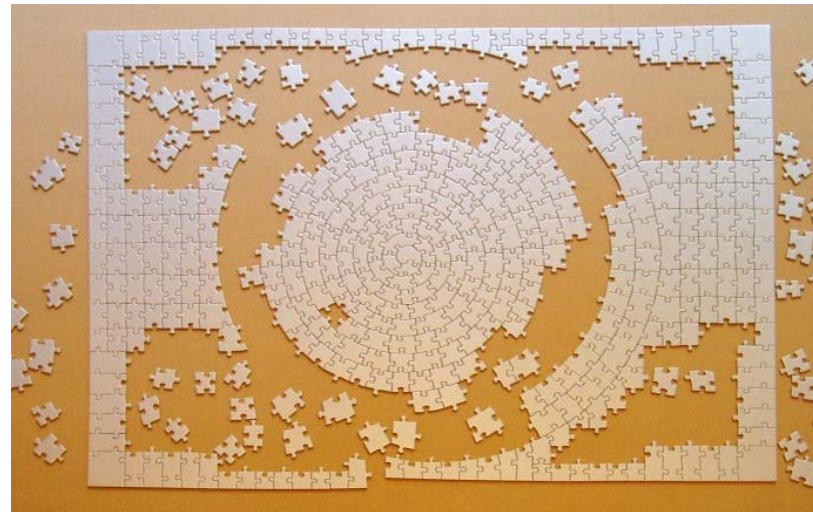
- Für die meisten Bakterien sind **hochwertige Referenzgenome verfügbar**
- **Reduktion der Rechenleistungen** nur auf genomische Unterschiede (**Zeit!**)

### ■ Nachteile

- „**what you get is what you see**“ – Abschnitte, die im Referenzgenom fehlen, fehlen grundsätzlich auch im Vergleich
- Linux-basiert – **Software/Analysen wenig „Kundenfreundlich“**
- Analysen in **konservierte Regionen des Genoms**, die gleichmäßig evolvieren – ein Einbeziehen von „**Mutations-hot spots**“ verschiebt komplett die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Stämmen

## Auswertestrategien – Variante 2 – ohne Referenz

*Ohne Referenz: de novo Assembly* („puzzeln ohne Vorlage“)



Ziel: 1. Vergleich von Unterschieden zwischen den Isolaten (cgMLST)

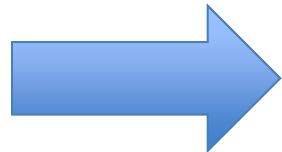
→ Ausbruchsanalysen/Transmissionsgeschehen

2. Ableitung von Resistenzgenen/Virulenzgenen



## Auswertestrategien – Variante 2 – ohne Referenz

AGATAGAAATACCG  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
AGATAGAAATACCG  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
CGAATTAA  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
AAAGATATA  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
AGATAGAAATACCG  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
AGATAGAAATACCG  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
AGATAGAAATACCG  
TACACGATGCGAATCAAATTT  
AGATAGAAATACCG  
TACACGATGCGAATCAAATTT

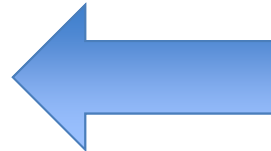
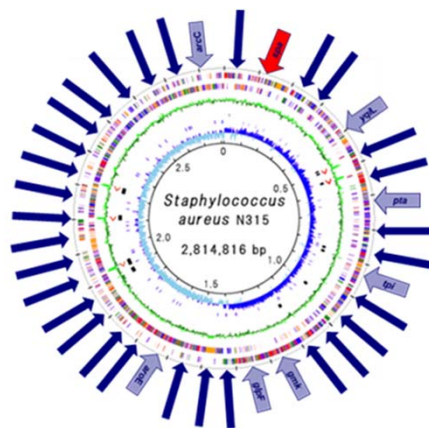


CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATTTTCATAACATCACCATGAGCTTGG  
GTTTAAACGCGTATGTATGATGTAAGGCTATTGGCCGATGATGCTGATCG  
GTTAGTCTGATCTACCTGACTTTAGGATCAACTCCAACCACTGCTTCAGCT

Generierung von consensus Sequenzen,  
je nach Seq-Technologie und Qualität 1 – 400 contigs



*spa*-Typ  
MLST (7 loci)  
cgMLST (max. 1861 loci)



### Annotation/Vorhersage von Genen

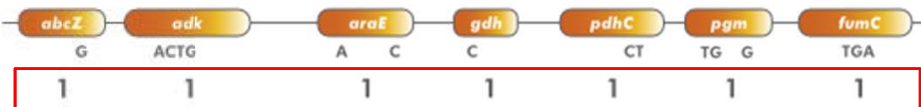
- Ableitung von MLST
- Ableitung von cgMLST
- Ableitung von Virulenzgenen
- Ableitung von Resistenzen



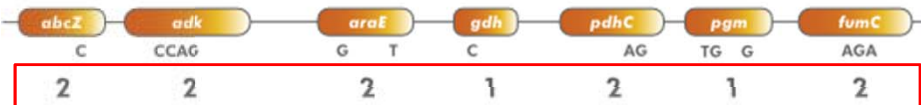
## Auswertestrategien – Variante 2 – ohne Referenz

*spa*-Typ  
MLST (7 loci)  
cgMLST (max. 1861 loci)

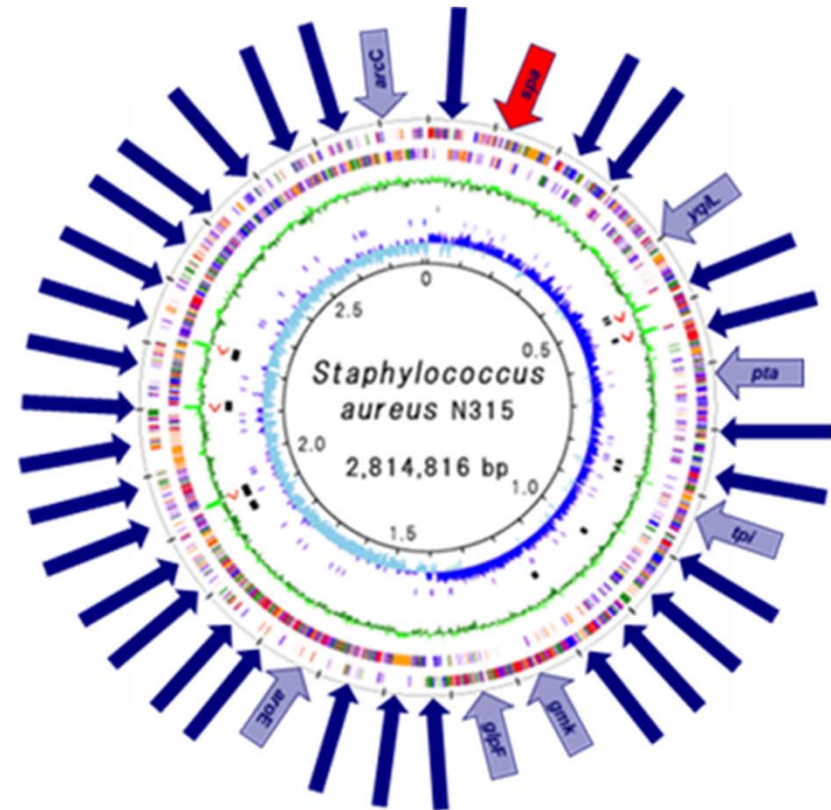
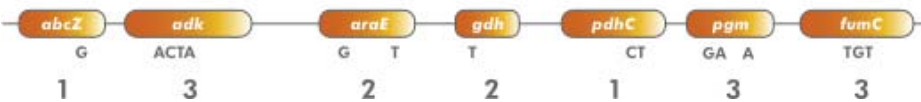
### Strain A



### Strain B



### Strain C



„Backward comparability“



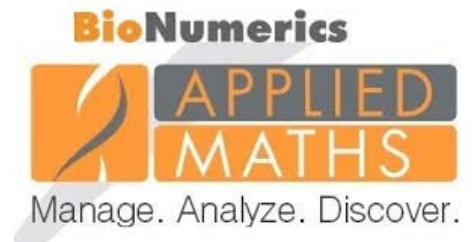
## Auswertestrategien – Variante 2 – ohne Referenz/cgMLST

### ■ Vorteile:

- Keine Referenz notwendig
- Software häufig „kundenfreundlich“
- Für viele Bakterien sind bereits Schemata entwickelt
- Ableitung einer Nomenklatur möglich

### ■ Nachteile

- Fragmente/Informationen gehen z.T. verloren („unassembled reads“)
- Kommerzielle Software, Datenbanken z.T. „Cloud-basiert“
- Nur kodierende Regionen werden herangezogen  
(mglw. weniger diskriminierend als Mapping)



## Beispiele

### *Staphylococcus aureus*

- NGS-basierte Analyse eines Ausbruchs mit MRSA auf einer neonatologischen ITS

### *Enterobacteriaceae*

- NGS-basierte Analyse eines Multispezies-Ausbruchs mit Carbapenemase-produzierenden *Enterobacteriaceae*-Isolaten – Verdacht auf „Plasmidhospitalismus“ (unpubl. Daten)

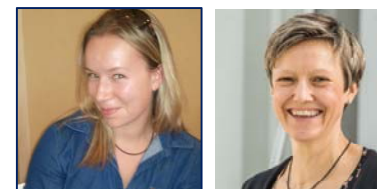




## Vermuteter MRSA Ausbruch auf einer neonatologischen ICU, 2016

Patientenalter	Bemerkung	Resistenzmuster, phänotypisch	spa Typ	Genom Clustertyp	RKI-Nr.
1	Frühgeborenes	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00181
1	Frühgeborenes	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00182
1	Frühgeborenes	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00183-1
1	Frühgeborenes	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00183-2
50	Personal	PEN, OXA, ERY, CLI, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2407	16-00220
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00277-1
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00277-2
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00278-1
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00278-2
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00279-1
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00279-2
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00279-3
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00280
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00281-1
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00281-2
1		PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00282-1
1		PEN, OXA, GEN, ERY, CIP, SXT, PHO, MFL, COX, OxaSu	S. haemolyticus	nd	16-00282-2
	Stillsessel	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00319
	Griffflächen	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00320-1
	Griffflächen	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00320-2
1	Index-Patient?	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00340
7	Bruder Index-Patient	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2490	16-00402
1	Zwilling Index-Patient	PEN, OXA, ERY, CIP, MFL, COX, OxaSu	t003	2404	16-00403
2		PEN, OXA, ERY, TET, COX, OxaSu	t223	nd	16-00499
1	Screening	PEN, OXA, ERY, CLI, MFL, COX, OxaSu	t003	nd	16-00542
1	Screening	PEN, OXA, CIP, MFL, COX, OxaSu	t032	nd	16-00543

- 26 Fälle, davon 23 x t003





## Vermuteter MRSA Ausbruch auf einer neonatologischen ICU, 2016

### *Hypothese 1:*

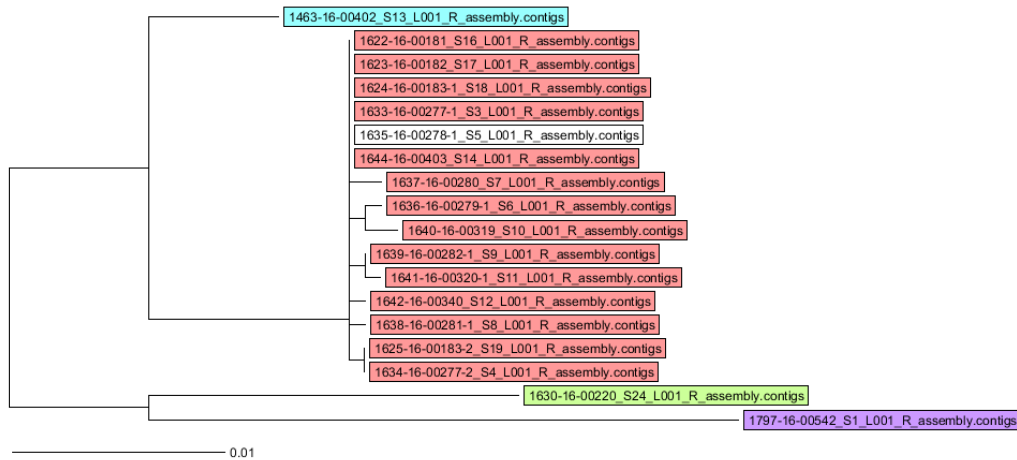
- Lässt sich der epidemiologisch vermutete Indexfall als solches durch Genomvergleiche bestätigen? Spielt der ältere Bruder und/oder der Zwilling des Indexfalls eine Rolle?

### *Hypothese 2:*

- Spielt die Krankenschwester eine Rolle bei der Weitergabe des Ausbruchsstamms?
- NGS von 18 Fällen/MRSA
  - cgMLST Phylogenie (Ridom® SeqSphere+)
  - Mapping Ansatz (BWA)



# Vermuteter MRSA Ausbruch auf einer neonatologischen ICU, 2016



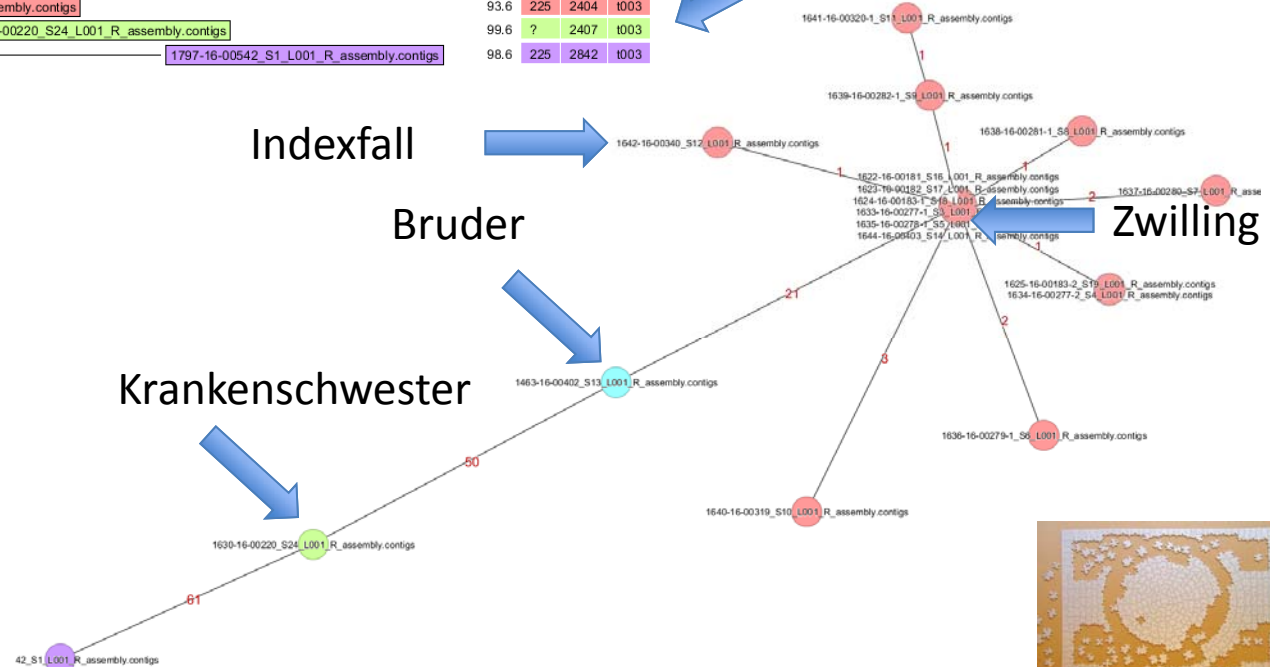
Perc. Good T...	ST	Cluster Type	spa
91.5	225	2490	1003
98.9	225	2404	1003
99.4	225	2404	1003
96.2	225	2404	1003
94.2	225	2404	1003
89.7	225	?	1003
93.9	225	2404	1003
96.1	225	2404	1003
95.4	225	2404	1003
95.5	225	2404	1003
94.1	225	2404	1003
97.3	225	2404	1003
95.3	225	2404	1003
95.8	225	2404	1003
99.4	225	2404	1003
93.6	225	2404	1003
99.6	?	2407	1003
98.6	225	2842	1003

← Bruder

← Zwilling

← Indexfall

← Krankenschwester



Indexfall

Bruder

Krankenschwester

Zwilling



## Vermuteter MRSA Ausbruch auf einer neonatologischen ICU, 2016

### **Hypothese 1:**

- Indexfall clustert mit Zwilling, aber nicht mit älterem Bruder

### **Hypothese 2:**

- Der MRSA der Krankenschwester lässt sich vom Ausbruch abtrennen; Teile des Personals haben andere MRSA (*spa* Typ) – Quelle bleibt fraglich



11.02.2016

# Wiesbadener Tagblatt

RHEIN MAIN PRESSE

## HSK Wiesbaden: Reinigungsdienst-Mitarbeiterin soll MRSA-Keim auf Frühgeborenen-Station gebracht haben



### ate: Keimbesiedlung auf der Frühgeborenen-Station der HELIOS HSK

Am 13. Januar 2016 bekannt gegebenen MRSA-Besiedlung von neun Frühgeborenen in der HELIOS HSK Wiesbaden liegen sowohl die Ergebnisse der Ursachenforschung als auch das Ergebnisprotokoll der externen Begehung vor. „Wir sind den Ursachen des Ausbruchs nachgegangen, haben mögliche Fehlerquellen aufgedeckt und Verbesserungspotenzial identifiziert“, sagt Prof. Dr. med. Markus Knuf, Direktor der Klinik für Kinder und Jugendliche an der HELIOS HSK Wiesbaden. Bei allen neun Kindern wurde derselbe MRSA-Stamm identifiziert, ebenso auf einer Stillliege, an einem Auffüllwagen und bei einem Mitarbeiter der Station. „Wir können mögliche, plausible Übertragungswege vermuten, letztendlich können wir sie nicht“, so Knuf.

Der Gutachter, Prof. Dr. med. Arne Simon, Klinik für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes und Zweiter Vorsitzender der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert-Koch-Institut, hat die Station im Rahmen einer externen strukturierten Begehung beurteilt. Im Ergebnisprotokoll bescheinigt er der Neonatologie der HELIOS HSK ein einwandfreies Hygienekonzept. „Es konnten keine gravierenden Mängel in der Krankenhaushygiene und in der Infektionsprävention auf Seiten des Behandlungsteams festgestellt werden, die als ursächlich für die nosokomiale Transmission von MRSA benannt werden können“, so der Experte im Ergebnisprotokoll.

Dr. Simon bestätigte zudem, dass die in der Neonatologie vom Behandlungsteam in Zusammenarbeit mit der Krankenhaushygiene durchgeführten Maßnahmen mit den Empfehlungen des Robert-Koch-Institutes übereinstimmen. „Die Krankenhaushygiene und die Infektionsprävention sind in der neonatologischen Intensivmedizin der HELIOS HSK sowohl organisatorisch als auch personell gut aufgestellt. Das Behandlungsteam der Neonatologie leistet ausgezeichnete Arbeit“, so Simon.

In Zusammenarbeit mit dem Team der Station und dem Hygienefachpersonal wurde in der Station eine Weiterentwicklung des bestehenden Konzepts der Infektionsprävention vereinbart. Die Konsequenz aus der Begehung hat die Klinik das regelmäßige, wöchentliche Hygienescreening um MRSA erweitert. Der Gutachter empfiehlt, die bereits bestehenden Hygienestandards zur Infektionsvermeidung, z.B. bei invasiven Maßnahmen wie Beatmung, Katheteranlage schriftlich festzuhalten und allen Mitarbeitern zur Verfügung zu stellen. Darüber hinaus schlägt der Experte Verbesserungsmaßnahmen im Bereich der Reinigung vor, wie die Bildung spezieller Reinigungsteams und Schulungen für den sensiblen Bereich der Frühgeborenenstation. Andere neu etablierte Maßnahmen betreffen die dezentrale Hygienefachpersonenvorhaltung sowie technische Verbesserungen im Desinfektionsprozess. „Wir sind sehr froh, dass bei den Familien unserer kleinen Patienten Sorgen, Ängste und Fragen entstanden sind. Dafür möchten wir uns entschuldigen“, sagt Kristian Gäbler, Geschäftsführer der HELIOS HSK Wiesbaden. „Insgesamt haben wir alle erforderlichen und hinausgehenden Maßnahmen ergriffen, damit sich Früh- und Neugeborene und deren Familien an unseren Stationen und in unserer Klinik wieder sicher fühlen können. Dafür danke ich den Mitarbeitern, die sich konstruktiv und mit großem Engagement für die Bewältigung der Aufgaben eingesetzt haben“, so Gäbler.

Die Frühgeborenenstation soll bald wieder teileröffnet werden. Die genauen Modalitäten werden in Zusammenarbeit mit dem Gesundheitsamt abgestimmt.

#### Kontakt:

Doba  
 Unternehmenskommunikation & Marketing  
 +49 611 43 9007  
 +49 152 225 038 66  
 ✉ [honorata.doba@helios-kliniken.de](mailto:honorata.doba@helios-kliniken.de)

[Anmeldung als PDF zum Herunterladen](#)

#### SO ERREICHEN SIE UNS



**Simone Koch**  
 Regionalleiterin  
 Unternehmenskommunikation  
 und Marketing  
 HELIOS Region Mitte-West

Ludwig-Erhard-Str. 100  
65199 Wiesbaden

Telefon +49 611 43-9007  
Mobil +49 160 972 500 74

✉ E-Mail

#### SO ERREICHEN SIE UNS



**Kirsten Feldmann**  
 Referentin  
 Unternehmenskommunikation  
 und Marketing  
 HELIOS Dr. Horst Schmidt  
 Kliniken Wiesbaden

Ludwig-Erhard-Str. 100  
65199 Wiesbaden

Telefon +49 611 43-9649

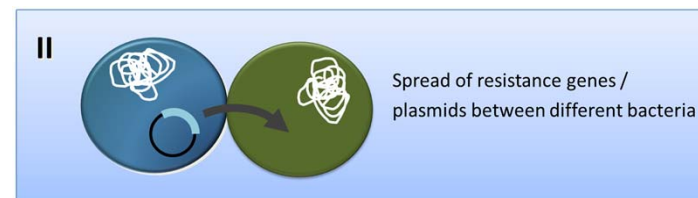
✉ E-Mail



## Setting 2 - Prävalenz von NDM-1 in *Enterobacteriaceae*-Isolaten

- Seit 09/2015 - Häufung von  $bla_{NDM-1}$  - positiven *Enterobacteriaceae* unterschiedlicher Spezies
- N= 18;  
11 *Escherichia coli*, 1 *Klebsiella pneumoniae*, 3 *Citrobacter freundii*,  
2 *Morganella morganii*, 1 *Providencia stuartii*
- Carbapenem-resistent (NDM-1) → geringe Prävalenz von NDM-1 in DE
- Typisierung ergab 3 *E.coli* Stammvarianten (ST405, ST410, **ST744**)

➔ Eingangsvermutung: horizontaler Gentransfer; „Plasmidhospitalismus“





## Prävalenz von NDM-1 in *Enterobacteriaceae*-Isolaten

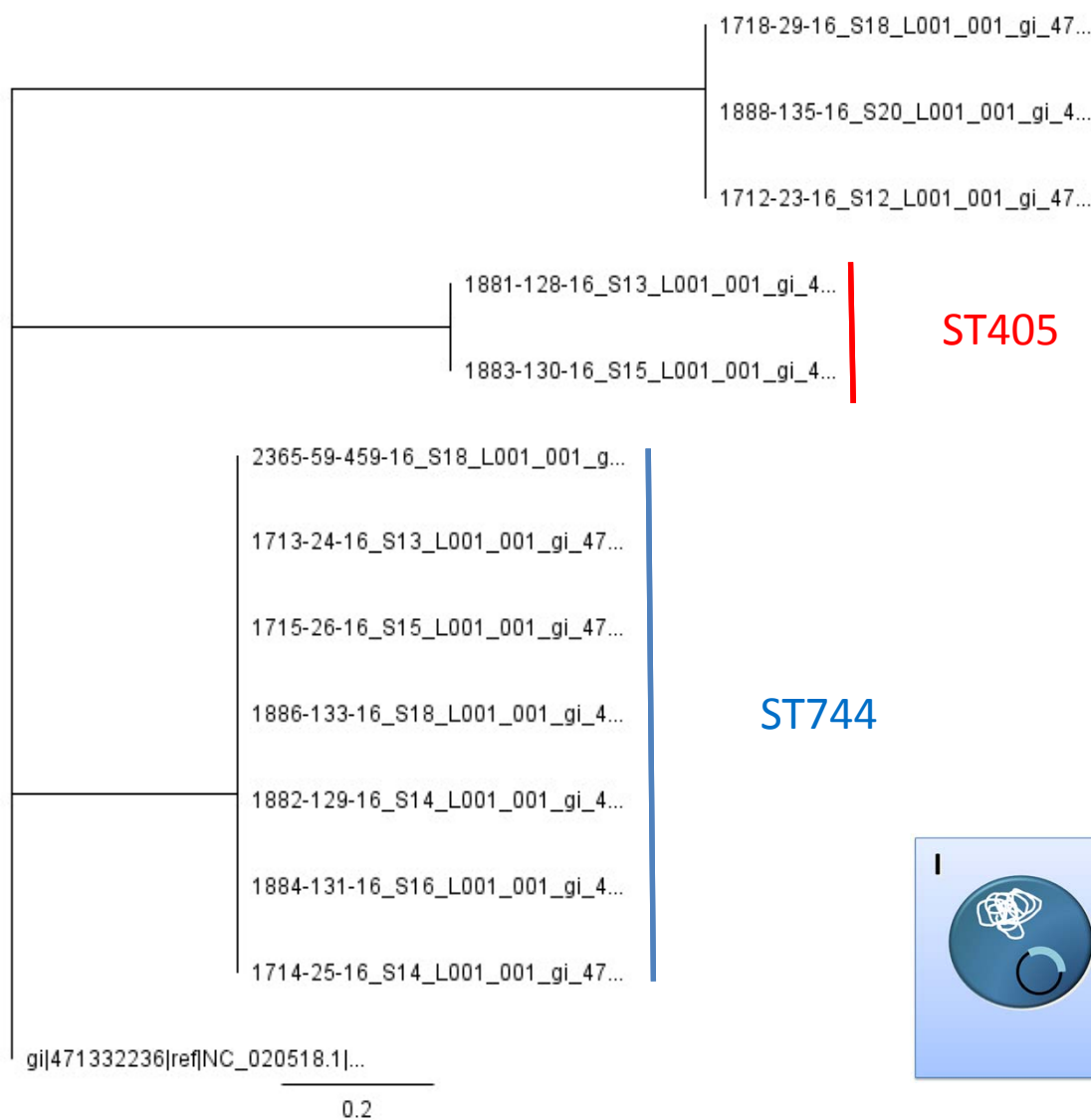


RKI-Nr.	Entnahme	Spezies	MLST	beta-lactamase ( <i>Resfinder</i> )	replicon Typen ( <i>Plasmidfinder</i> )
20/16	2015-09-23	cifrc	0	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-1	<b>IncA/C2</b> , IncR
21/16	2015-09-23	prst**	0	NDM-1+OXA-10	<b>IncA/C2</b>
22/16	2015-12-30	klpn**	ST15	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+SHV-28	IncR, IncFIB/FIIK
23/16	2015-12-30	ecol	ST410	NDM-1	<b>IncN</b>
24/16	2015-12-30	ecol	ST744	NDM+TEM-1+CTX-M-15+OXA-1+OXA-9nf	<b>IncA/C2</b> , IncR, IncFIA(HI1), IncI1, IncX1, IncQ1
25/16	2015-12-30	ecol	ST744	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-9nf	<b>IncA/C2</b> , IncR, IncFIA(HI1), IncI1, IncX1, IncQ1
26/16	2015-12-30	ecol	ST744	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-9nf	<b>IncA/C2</b> , IncR, IncFIA(HI1), IncI1, IncX1, IncQ1
27/16	2015-12-30	momo	0	NDM-1+DHA	<b>IncN</b>
28/16	2016-01-04	momo	0	NDM-1+CTX-M-1+DHA	<b>IncN</b>
29/16	2016-01-07	ecol	ST410	NDM-1+TEM-1+OXA-1	<b>IncN</b> , IncX1, IncFIA, IncFIB/FII
128/16	2016-02-24	ecol	ST405	NDM-1+TEM-1+TEM116+CTX-M-15+OXA-1	<b>IncA/C2</b> , IncFIA, IncQ1, IncY, IncFII(p14), IncFIB(AP001918)
129/16	2016-02-24	ecol	ST744	NDM-1+CTX-M-15+ TEM-1+OXA-1+OXA-9	<b>IncA/C2</b> , IncI1, IncFIA(HI1), IncQ1, IncX1, IncR
130/16	2016-02-24	ecol	ST405	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-1	<b>IncA/C2</b> , IncFIA, IncQ1, IncFII(p14), IncY, IncFIB(AP001918)
131/16	2016-02-24	ecol	ST744	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-1OXA-9	<b>IncA/C2</b> , IncI1, IncFIA(HI1), IncX1, IncQ1, IncR
132/16	2016-02-24	cisp	0	NDM-1+CMY-80+OXA-9+TEM-1+OXA-1	<b>IncN</b> , IncR, IncFIA(HI1)
133/16	2016-02-26	ecol	ST744	NDM-1+CTX-M-15+TEM-1+OXA-9+OXA-1	<b>IncA/C2</b> , IncI1, IncFIA(HI1), IncX, IncQ1, IncR
134/16	2016-02-26	cisp	0	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-9+OXA-1	<b>IncA/C2</b> , IncR, IncFIA(HI1)
135/16	2016-03-21	ecol	ST410	NDM-1+TEM-1+CTX-M-15+OXA-1	<b>IncN</b> , IncFIA, IncX1, IncFII, IncFIB(AP001918), IncFII

\*\* prst und klpn epidemiologisch abzugrenzen

→ Verschiedene Plasmidtypen inkl. IncA/C2 und IncN → kein einzelnes „Ausbruchplasmid“

# Analyse der *E. coli* Stammvarianten

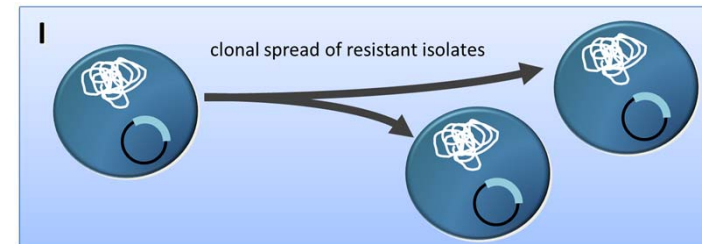


ST410



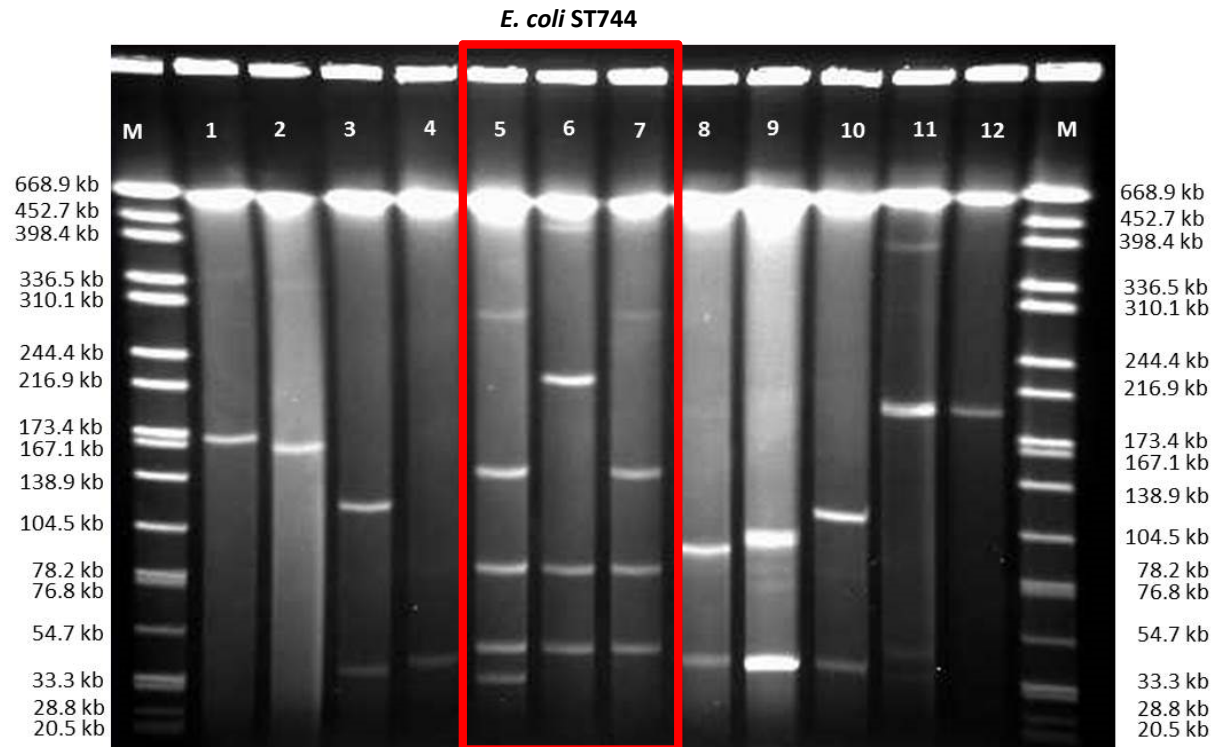
ST405

ST744





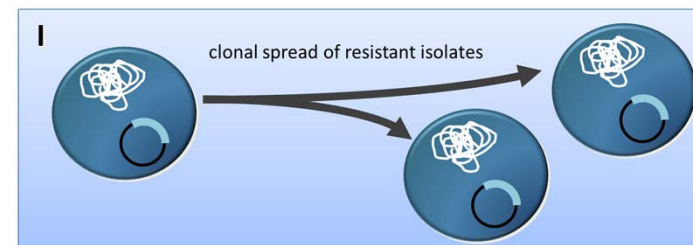
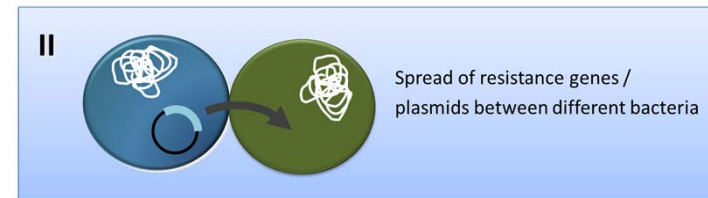
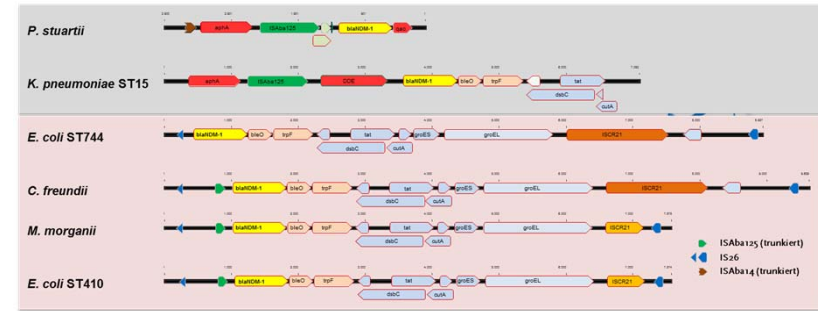
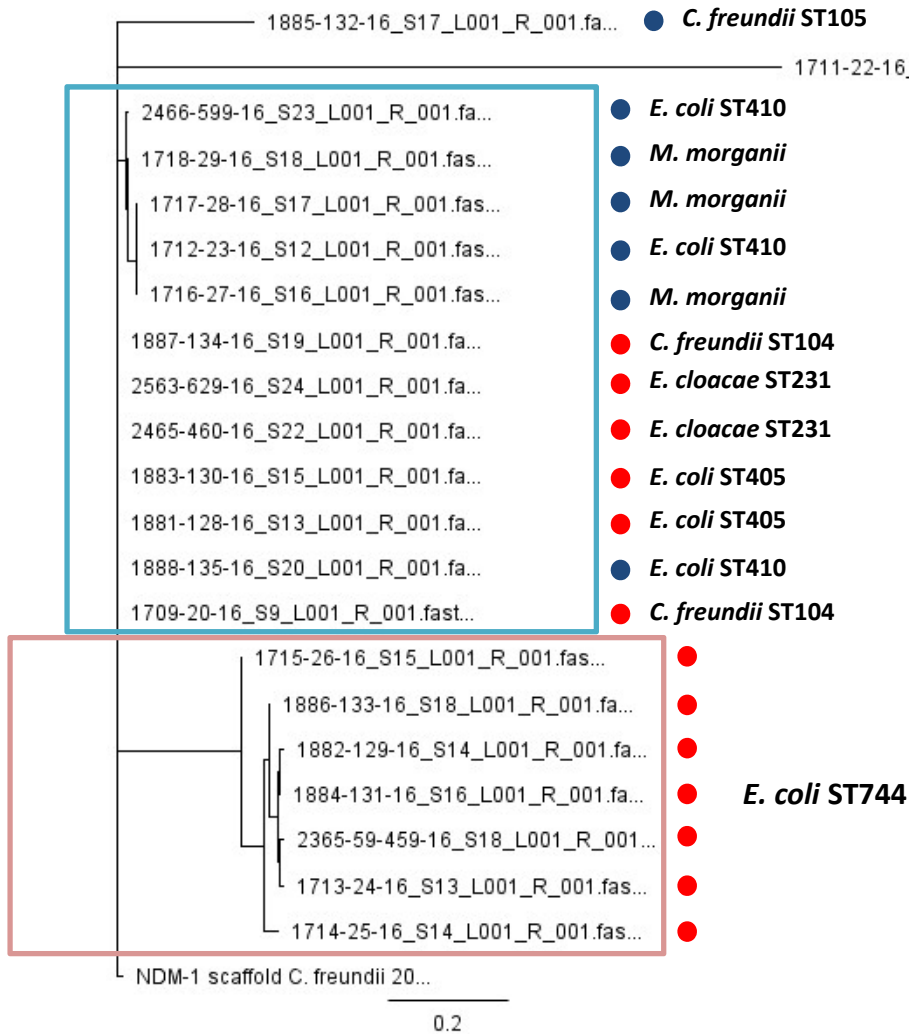
## S1 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) zeigt Plasmiddiversität



Lane	RKI-Nr.	Spezies	Plasmidgröße [kb]	Replikontypen (bestätigt, PCR-based replicon typing [Caratolli et al.]
1	20/16	<i>C. freundii</i>	170	IncA/C2, IncR
2	21/16	<i>P. stuartii</i>	165	IncA/C2
3	22/16	<i>K. pneumoniae</i> ST15	40, 125	IncR, IncFIB/FIIK
4	23/16	<i>E. coli</i> ST410	40	IncN
5	24/16	<i>E. coli</i> ST744	43, 50, 80, 140, 290, 440	IncA/C2, IncR, IncFIA(HI1), IncI1, IncX1, IncQ1
6	25/16	<i>E. coli</i> ST744	50, 80, 225, 440	IncA/C2, IncR, IncFIA(HI1), IncI1, IncX1, IncQ1, IncFII
7	26/16	<i>E. coli</i> ST744	50, 80, 140, 290, (440)	IncA/C2, IncR, IncFIA(HI1), IncI1, IncX1, IncQ1
8	27/16	<i>M. morgani</i>	40, 90	IncN
9	28/16	<i>M. morgani</i>	40, 95, 100	IncN
10	29/16	<i>E. coli</i> ST410	40, 110	IncN, IncX1, IncFIA, IncFIB/FII



# Der „NDM-1-Transposonbaum“

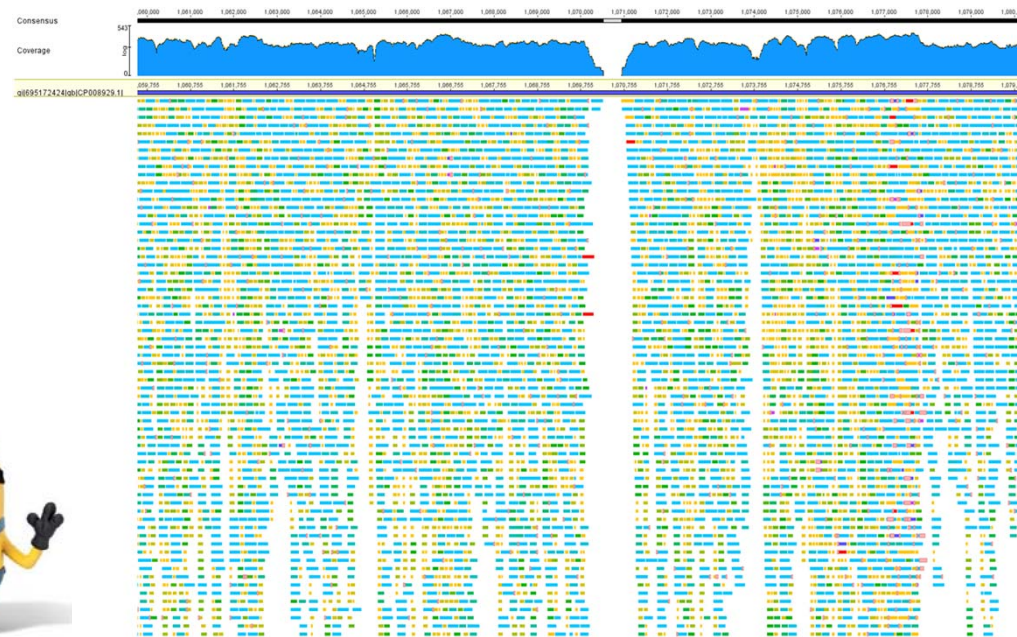


IncA/C2 ●

IncN ●

## Verbesserte Auflösung durch „Long Read“ Sequenzierung (ongoing)

- Ein *E.coli* Isolat ST744 wurde mittels MinION sequenziert
- Plasmidsequenz konnte vollständig rekonstruiert werden
- Vergleich der NGS-Sequenzen gegen die Nanopore Sequenz als Referenz



Kooperation mit RKI/ZBS1, Dr. Nitsche, Dr. Radonic



## Zusammenfassung

- WGS-Daten enthalten ein **evolutionäres Signal**, was für **Untersuchungen von Transmissionsereignissen** herangezogen werden kann (Bsp. MRSA; gutes Sampling!!)
- WGS-Analysen zur **Abklärung epidemiologisch-abgeleiteter Hypothesen** verwenden
- in **endemischen Situationen** können WGS-Analysen Isolate diskriminieren, die **mit klassischen Typisierverfahren nicht unterscheidbar** sind
- Viele (Ausbruchs)Situationen lassen sich mit **guter Epidemiologie** und **klassischen Typisierverfahren** zufriedenstellend aufklären
- **Sensible Vorläufer-Isolate** helfen häufig komplexe Szenarien besser aufzulösen, stehen aber meist nicht zur Verfügung (Bsp NDM-1; frühes Sampling!!)
- Bei **komplexen Szenarien** (Multi-Spezies-Ausbrüche; Bsp NDM-1) kommen auch NGS-Verfahren an die Grenzen ihrer Aussagefähigkeit => **Long Read Sequencing**

„NGS oder nicht NGS, das ist hier die Frage“



### ***Fragestellung***

Was ist die konkrete Frage, ist ein Mehrwert durch NGS erkennbar?

### ***NGS Technologie***

Ressourcen, Zugang zur Technik, Kosten, Computer-Power, .....?

### ***Auswertestrategie***

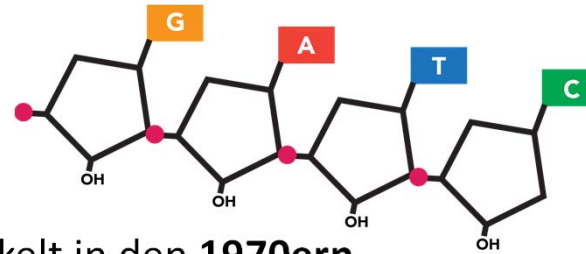
IT-Infrastruktur, Verfügbarkeit von Software und Expertise (Linux), ...

***Assembly/cgMLST etc***

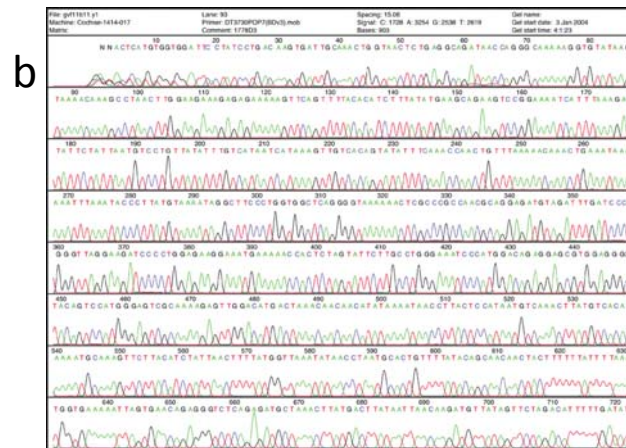
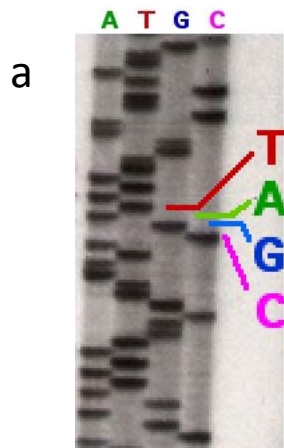


***Mapping/SNP***

## DNS Sequenzierung



- **SANGER Sequenziermethode** entwickelt in den **1970ern**
- Methodik einer Synthese und „Kettenabbruchreaktion“ (ddNTPs)
- Ermittlung der Basenfolge durch Gele (a) und später Fluoreszenz (b)
- SANGER-Seq ermittelt ca 1000 bp/Lauf
- Parallelisierung in zB 96er Kapillarsequenzierer (96 Sequ. parallel) (c)
- Plasmid  $\leq 300$  kbp; Bakterium  $\leq 5$  Mbp; Mensch 3 Gbp, Weizen 17 Gbp(!)
- **Nachteil SANGER:** aufwendige Vorbereitung, Stückelung in 1000 bp Fragmente



## Nächste Generation an Sequenziertechniken I

- Entwicklung der Pyrosequenzierungstechnologie (**454 Roche**)
- **Prinzip:** hochparallelisierte Sequenzierung durch Synthese, Einfangen des Einbaus jedes Nukleotids durch Lichtsignal (Freisetzung von PPi)
- **Endprodukt:** viele kurze Einzelstränge
- **Fehler:** systematisch in Wiederholungsregionen (AAAAAAA oder GGGGGG)
- Anfangs Nischenprodukt; durch verbesserte Computerpower und neue Algorithmen geeignet für Ganzgenomsequenzierung – 2014 wieder vom Markt
- Technologie ist leicht geänderter Form im **Ion Torrent** verfügbar



# Arbeiten mit Genomsequenzen





## Phylogenie von 3 NDM-1-positiven *C. freundii* Isolaten

1885-132-16\_S17\_L001\_001\_GCF\_0...  
**Isolat 132-16 *C. freundii***  
**Abt. A, 15.02.2016**

	NZ_CP007557.1	20-16	132-16	134-16
NZ_CP007557.1		1269	54	1272
20-16	1269		1314	5
131-16	54	1314		1317
134-16	1272	5	1317	

1709-20-16\_S9\_L001\_001\_GCF\_000...  
**Isolat 20-16 *C. freundii***  
**Abt. E, 15.08.2015**

1887-134-16\_S19\_L001\_001\_GCF\_0...  
**Isolat 134-16 *C. freundii***  
**Abt. A, 22.02.2016**

NZ\_CP007557.1

0.5



→ Sehr wahrscheinlich, dass *C. freundii* 20-16 und 134-16 epidemiologisch verlinkt sind



**VIelen DANK!**

- ❖ **Charité University Medical Centre, Institute of Hygiene and Environmental Medicine & Department of Neonatology**

Prof. Petra Gastmeier  
Dr. Ann-Christin Breier  
Prof. Hans Proquitté  
Prof. Christoph Bühner

- ❖ **Community Health Office City of Berlin Mitte, Department of Infectious Disease Prevention and Control**

Dr. Karl Schenkel

- ❖ **State Office for Health and Social Affairs, Federal State of Berlin, Department of Infectious Disease Epidemiology and Environmental Health Protection**

Dr. Jörg Bätzing-Feigenbaum

- ❖ **Institut für Infektionsprävention und Klinikhygiene, SLK Kliniken**

Dr. Maria Martin  
Dr. Dirk Luft

- ❖ **NRZ für Gram-negative Krankenhauserreger, Abt. für Med. Mikrobiologie der Ruhr-Universität Bochum**

Dr. Niels Pfennigwirth  
Dr. Martin Kaase  
Prof. Dr. Sören Gatermann

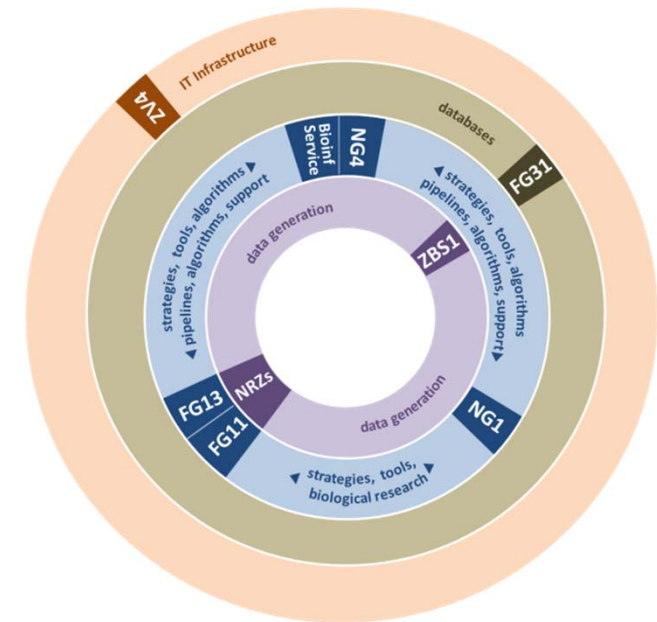
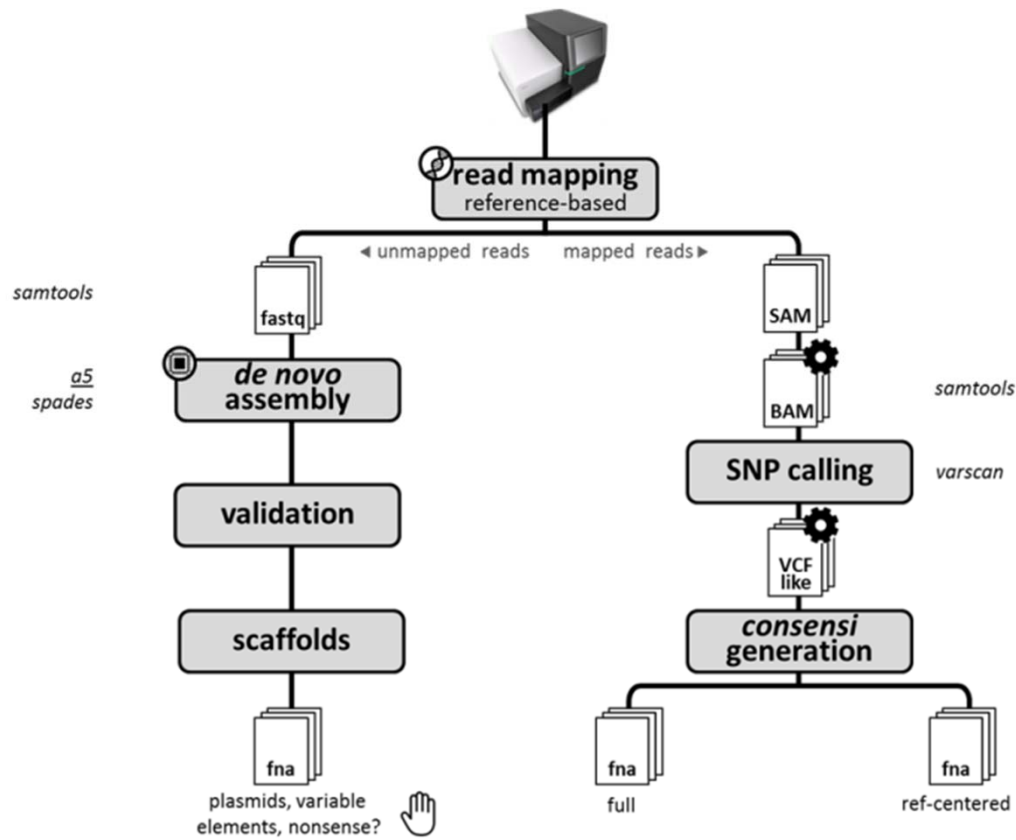
- ❖ **Robert Koch Institute, Department of Infectious Diseases, Department for Infectious Disease Epidemiology**

Technicians  
Andrea Sanchini (EUPHEM-Fellow)  
Dr. Benedikt Greutelaers  
Dr. Birgit Strommenger  
Dr. Franziska Layer  
Dr. Tim Eckmanns  
Dr. Stephan Fuchs  
Andre Frühauf  
Prof. Mielke

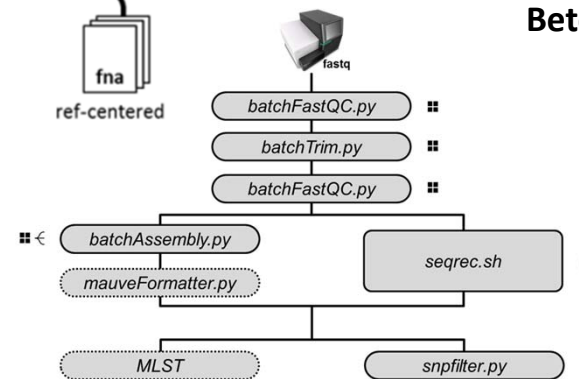
- ❖ **Leibniz Institute German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, DZIF Group "Microbial Genome Research"**

Prof. Ulrich Nübel

# Automatisierung der Auswertevorgänge – “Pipelines”



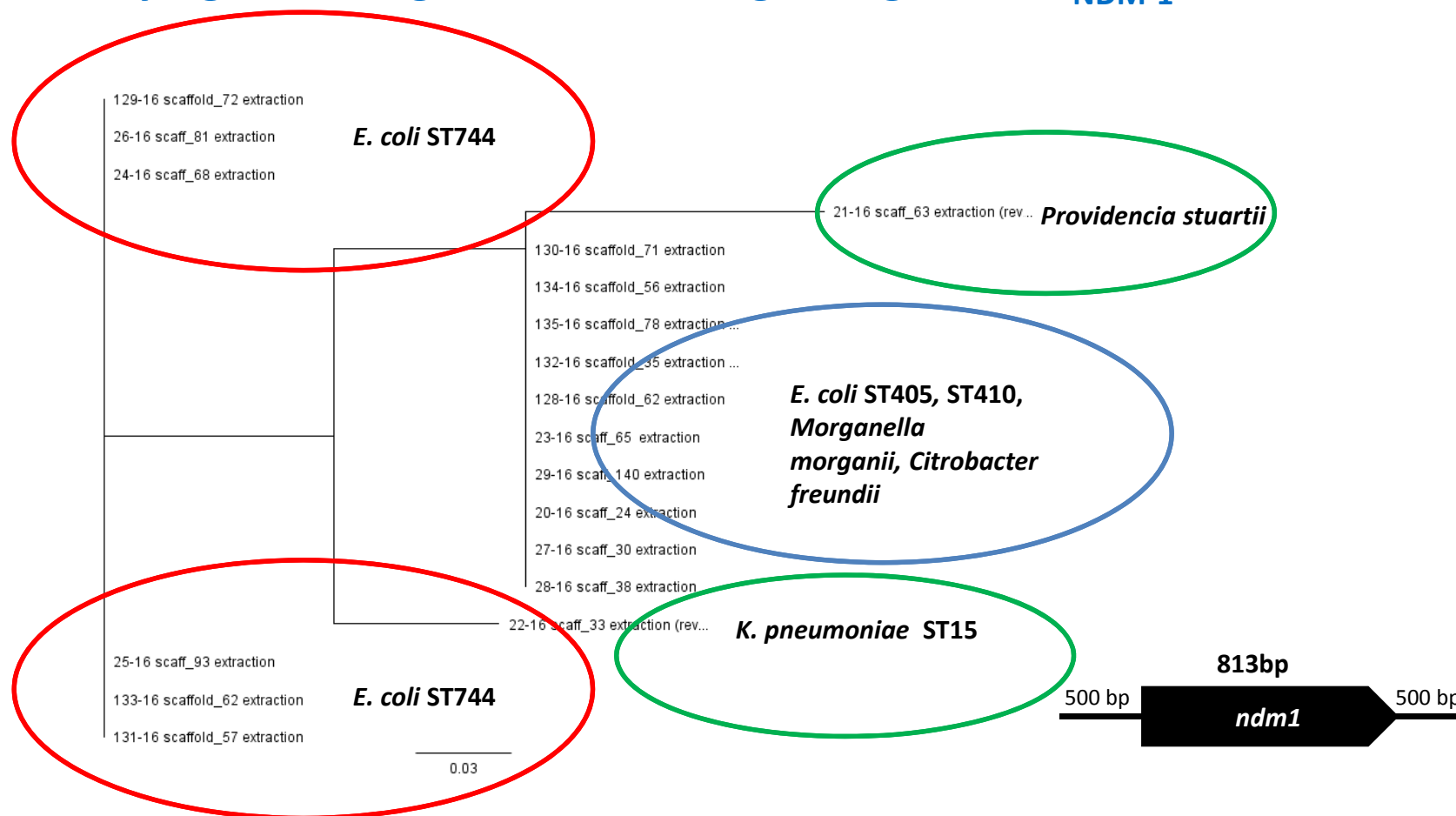
Beteiligte AGs am RKI



Dr. Stefan Fuchs

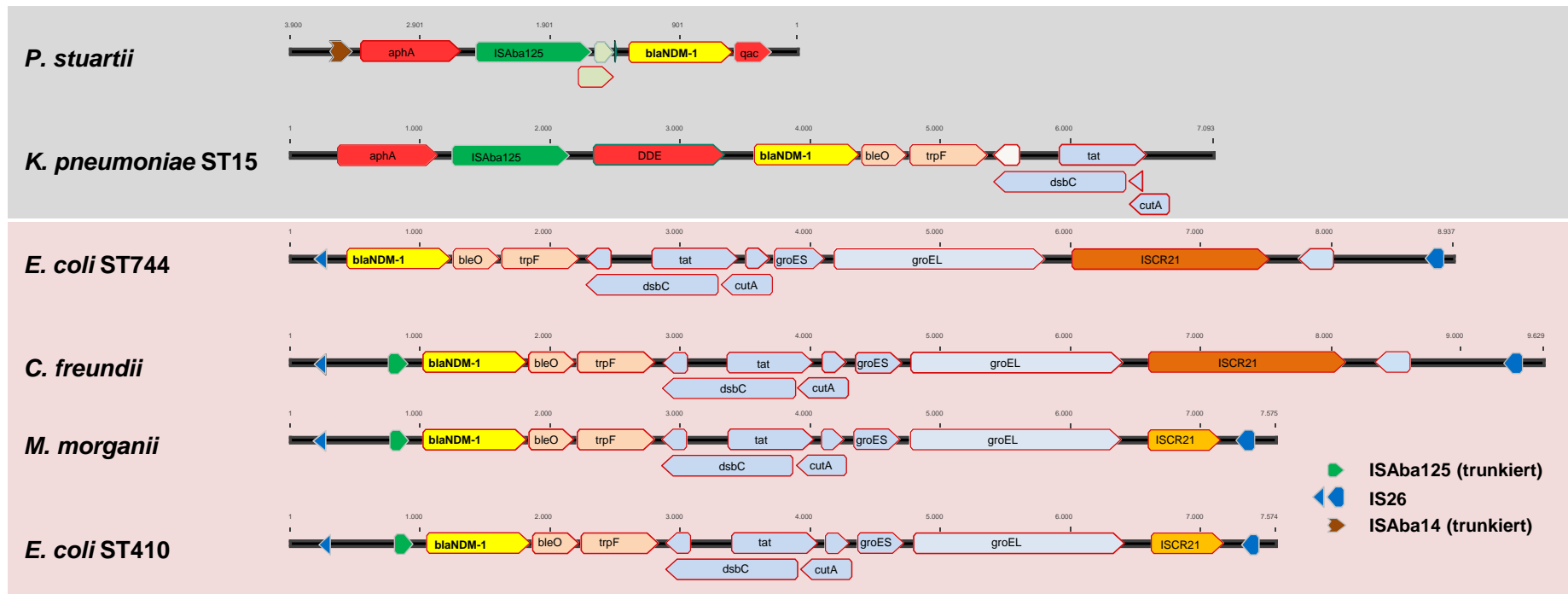


## Phylogenie der genetischen Umgebung von *bla*<sub>NDM-1</sub>



- Cluster 1: *E. coli* ST744
- Cluster 2: *E. coli* ST410, ST405, *M. morganii*, *C. freundii* Isolate
- Cluster 3&4: nichtverwandte Isolate *P. stuartii* & *K. pneumoniae* ST15 (Patienten aus Ausland)

## NDM-1-Gencluster von verschiedenen IS Elementen flankiert



IS26 und ISAbal25





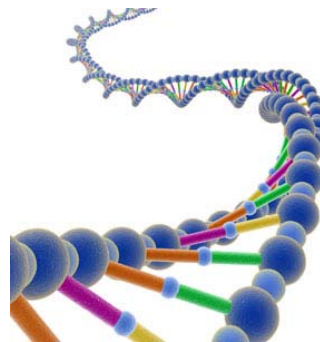
## Evolutionrate

- Integration der Isolations-Zeitpunkte
- Der Ausbruchsstamm akkumuliert  **$2,8 \times 10^{-6}$**  Mutationen pro Nukleotid pro Jahr

*S. aureus* ST22:  $2,4 \times 10^{-6}$  (Nübel *et al.*, 2013)

*S. aureus* ST225:  $2 \times 10^{-6}$  (Nübel *et al.*, 2010)

*S. aureus* ST239:  $3 \times 10^{-6}$  (Harris *et al.*, 2010; Smyth *et al.*, 2010)



- Basierend auf diesen Daten wurde der letzte gemeinsame Vorfahre (most recent common ancestor - MRCA) des Ausbruchsstammes berechnet

# Sequenzrekonstruktion

AGATAGAAATACACG  
CGATTAAA  
TACACGATGCGAGCAATCAAATTT  
GATAGAAATACACGAT  
TCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
CCATGAGTTTGG  
GAGG  
CGAGCAATCAAATTTCAAATTT  
TCACCATGAGTTTGG  
AAAGATAGAAATA  
ATAACATCACCATGAGTTTGG  
ATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
GATAGAAATA  
TTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
AATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
TTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
AATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
TTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
AATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
ATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
TAAACATCACCATGAGTTTGG  
CACGATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
TCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
GATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
CACCATGAGTTTGG  
CACCATGAGTTTGG  
AATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG  
TAGAAATAC  
AATACACGATGCGAGCAATCAA

# Sequenzrekonstruktion

## Mapping



```
CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG
CGTTTAAA          TACACGATGCGAGCAAT-----TT ATAACATCACCATGAGCTTGG
      AAAGATAGAAATA                                     GAGCTTGG
      AGATAGAAATACACG          AAT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      CACGATGCGAGCAAT-----TTCATA          CCATGAGCTTGG
AAAGATAGAAATA                                     TCACCATGAGCTTGG
      TAGAAATACACGATGCGA          TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
      AATACACGATGCGAGCAAT          TAACATCAGCATGAGCTTGG
      ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCACC          CACCATGAGCTTGG
GATAGAAATACACGAT          ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCA          CATGAGCTTGG
      GATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCA          ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCAGC
      ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCAGC          GATAGAAATACACGAT          CACCATGAGCTTGG
GATAGAAATACACGAT          T-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      AAT-----TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
      TCACCATGAGCTTGG
      CACCATGAGCTTGG
      TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      CATCACCATGAGCTTGG
      CCATGAGCTTGG
CGAGCAAT-----TTCATAACATCAGCATGAGC
      AT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
```



# Sequenzrekonstruktion

## Mapping



```

CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG
CGTTTAAA          TACACGATGCGAGCAAT-----TT ATAACATCACCATGAGCTTGG
      AAAGATAGAAATA                                     GAGCTTGG
      AGATAGAAATACACG          AAT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
              CACGATGCGAGCAAT-----TTCATA          CCATGAGCTTGG
AAAGATAGAAATA                                     TCACCATGAGCTTGG
      TAGAAATACACGATGCGA          TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
              AATACACGATGCGAGCAAT          TAACATCAGCATGAGCTTGG
                                          CACCATGAGCTTGG
              ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCACC
GATAGAAATACACGAT
              GATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCA
                                          CATGAGCTTGG
              ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCAGC
GATAGAAATACACGAT          CACCATGAGCTTGG
              T-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
              AAT-----TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
                                          TCACCATGAGCTTGG
                                          CACCATGAGCTTGG
                                          TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
                                          CATCACCATGAGCTTGG
                                          CCATGAGCTTGG
              CGAGCAAT-----TTCATAACATCAGCATGAGC
              AT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
    
```

■ Deletionen (*gap*)

# Sequenzrekonstruktion

## Mapping



```

CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG
CGTTTAAA          TACACGATGCGAGCAAT-----TT ATAACATCACCATGAGCTTGG
      AAAGATAGAAATA                                     GAGCTTGG
      AGATAGAAATACACG          AAT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      CACGATGCGAGCAAT-----TTCATA          CCATGAGCTTGG
AAAGATAGAAATA                                     TCACCATGAGCTTGG
      TAGAAATACACGATGCGA          TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
      AATACACGATGCGAGCAAT          TAACATCAGCATGAGCTTGG
      CACCATGAGCTTGG
      ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCACC
GATAGAAATACACGAT
      GATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCA
      CATGAGCTTGG
      ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCAGC
GATAGAAATACACGAT          CACCATGAGCTTGG
      T-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      AAT-----TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
      TCACCATGAGCTTGG
      CACCATGAGCTTGG
      TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      CATCACCATGAGCTTGG
      CCATGAGCTTGG
CGAGCAAT-----TTCATAACATCAGCATGAGC
      AT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
  
```

- Deletionen (*gap*)
- Einfacher Nukleotidaustausch(*SNP*)

# Sequenzrekonstruktion

## Mapping



```

CGATTAAAGATAGAAATACACGATGCGAGCAATCAAATTTTCATAACATCACCATGAGTTTGG
CGTTTAAA          TACACGATGCGAGCAAT-----TT ATAACATCACCATGAGCTTGG
      AAAGATAGAAATA                                GAGCTTGG
      AGATAGAAATACACG          AAT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      CACGATGCGAGCAAT-----TTCATA          CCATGAGCTTGG
AAAGATAGAAATA                                TCACCATGAGCTTGG
      TAGAAATACACGATGCGA          TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
      AATACACGATGCGAGCAAT          TAACATCAGCATGAGCTTGG
      CACCATGAGCTTGG
      ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCACC
GATAGAAATACACGAT
      GATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCA
      CATGAGCTTGG
      ATGCGAGCAAT-----TTCATAACATCAGC
GATAGAAATACACGAT          CACCATGAGCTTGG
      T-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      AAT-----TTCATAACATCACCATGAGCTTGG
      TCACCATGAGCTTGG
      CACCATGAGCTTGG
      TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
      CATCACCATGAGCTTGG
      CCATGAGCTTGG
CGAGCAAT-----TTCATAACATCAGCATGAGC
      AT-----TTCATAACATCAGCATGAGCTTGG
  
```

- Deletionen (*gap*)
- Einfacher Nukleotidaustausch(*SNP*)
- Fragwürdige SNPs

# Sequenzrekonstruktion

## Mapping

