

Überwachung von Nosokomial- infektionen mithilfe der Sequenzierung von Bakterien- genomen

Umfassende Identifikation
pathogener Isolate mit
Illumina-Sequenzierung und
der SRST2 BaseSpace™-App

illumina®

Einleitung

Nosokomialinfektionen (HAIs, Healthcare-associated Infections) sind ein ernstzunehmendes Problem in der Gesundheitsversorgung, insbesondere bei schwerkranken und immungeschwächten Patienten. HAIs gefährden nicht nur die Gesundheit und das Leben der Patienten, sondern bringen auch zusätzliche wirtschaftliche Belastungen für die Patienten und das Gesundheitssystem mit sich, beispielsweise durch direkte wirtschaftliche Verluste und längere Krankenhausaufenthalte.^{1,2} Die Überwachung pathogener Bakterienstämme in der Umgebung von Gesundheitseinrichtungen kann helfen, die Auswirkungen von HAIs zu minimieren. Labormethoden wie qPCR und Massenspektrometrie ermöglichen die schnelle Identifikation von Pathogenen und damit zeitnahe Entscheidungen hinsichtlich der Behandlung. Diese Methoden reichen jedoch nicht aus, um Ausbrüche zu verfolgen oder Übertragungsuntersuchungen durchzuführen.

NGS (Next- Generation Sequencing, Sequenzierung der nächsten Generation) ermöglicht eine vollständige Charakterisierung bakterieller Genome. Sie liefert Informationen für die Subtypisierung, die Unterscheidung zwischen Isolaten, die Hervorhebung von Isolaten in einem Cluster sowie für antimikrobielle Resistenz (AMR)- und Virulenzmarker.³ Durch die schnelle Analyse und Interpretation von Sequenzierungsdaten kann das Infektionskontrollpersonal schnell auf potenzielle Ausbrüche reagieren und sie zur Quelle zurückverfolgen, um eine weitere Übertragungen und Infektionen zu verhindern. Nach einem umfassenden WGS-Workflow (Whole-Genome Sequencing, Genomsequenzierung), der lediglich zwei Tage in Anspruch nimmt, kann die Ausbreitung der für HAIs verantwortlichen Pathogene effizient überwacht und angemessen gehandelt werden.

Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist ein multiresistenter Erreger mit höheren Morbiditäts- und Mortalitätsraten als bei Methicillin-sensitiven *S. aureus*-Stämmen. Infektionen, die durch krankenhausessoziierte Methicillin-resistente *S. aureus* (HA-MRSA)-Stämme verursacht werden, erfordern längere Krankenhausaufenthalte als solche, die durch krankenhausessoziierte Methicillin-sensitiven *S. aureus*-Stämme verursacht werden. Sie sind in der Regel resistent gegen Nicht- β -Lactam- sowie β -Lactam-Antibiotika.

Zur Charakterisierung von Isolaten von HA-MRSA oder anderen Bakterienspezies bietet Illumina die SRST2*-App als Teil einer umfassenden WGS-Lösung an, die die Bibliotheksvorbereitung und Sequenzierung von Illumina umfasst (Abbildung 1). Die in BaseSpace Sequence Hub verfügbare SRST2-App meldet das Vorhandensein von in einer Multi-Locus-Sequenztypisierungsdatenbank (MLST)⁴ vorhandenen Sequenztypen (STs) sowie von Referenzgenen aus einer Datenbank mit Sequenzen für Virulenzgene, Resistenzgene und Plasmidreplikone mit Proben-zu-Proben-Vergleich über mehr als 150 bakterielle Genera und Spezies hinweg. Die SRST2-App wurde aktualisiert und umfasst nun neben ResFinder die Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) und die ARG-Annot-Datenbank.

Dieser Anwendungshinweis zeigt die Funktionen der aktualisierten SRST2-App zur Identifikation und Charakterisierung pathogener Isolate, sodass die HAI-Überwachung von Laboren ohne vorherige NGS-Erfahrung durchgeführt werden kann.

*Short-Read-Sequenztypisierung



Abbildung 1: Workflow bei der HAI-Überwachung: Die SRST2 BaseSpace-App ist Teil eines umfassenden NGS-Workflows zur Überwachung von HAIs, der die Bibliotheksvorbereitung sowie die Sequenzierung von Illumina umfasst.

Methoden

Proben

Für diese Studie wurden *S. aureus*-Isolate (je eines aus Pleuraflüssigkeit, Hüftflüssigkeit, Knochen und unbenannter Körperflüssigkeit sowie 23 aus Blut) im Rahmen der normalen Überwachung durch das Minnesota Department of Health (MDH) im Jahr 2016 (an mehreren klinischen Standorten in Hennepin und den Ramsey-Bezirken in Minnesota) entnommen.⁵

Probenvorbereitung

Isolate wurden kryokonserviert aus dem MDH überführt, auf Standard-Blutagarschalen aufgebracht und bei 37 °C inkubiert, um einzelne Kolonien zu erhalten, die über Nacht bei 37 °C in tryptischer Soja-Bouillon inokuliert und gezüchtet wurden. Die genomische DNA wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Katalog-Nr. 51304) isoliert, wobei der AL-Puffer mit Lyostaphin ergänzt wurde. Die Konzentration und Qualität der DNA wurden mit einem NanoDrop 2000-Spektralphotometer und einem Qubit Flex Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Katalog-Nr. Q33327) bestimmt.

Bibliotheksvorbereitung und -sequenzierung

Sequenzierungsbibliotheken wurden mit dem Nextera™ XT DNA Library Preparation Kit, 24 samples (Illumina, Katalog-Nr. FC-131-1024) vorbereitet und mit dem Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, Katalog-Nr. FC-131-2001) multiplexiert. Die WGS wurde auf einem Illumina MiSeq™ System mit einem Paired-End-Lauf mit 2 × 300 bp durchgeführt.

Datenanalyse

Die Sequenzierungsdateien wurden mit der SRST2-App in BaseSpace Sequence Hub analysiert.

Ergebnisse

Die auf mehreren Datenbanken aufbauende SRST2-App zeigte, dass sich die Isolate in zwei verschiedene Cluster gruppieren lassen (Abbildung 2). Diese beiden Hauptcluster unterscheiden sich durch mehrere MLST-Allele, die diese in kleinere Cluster eng verwandter Isolate unterteilen (Abbildung 3). Mit der CARD werden von der SRST2-App mehrere Resistenzgene wie *ErmA* erkannt, das mit einer Resistenz gegen Makrolidantibiotika assoziiert ist, einer der in den USA am häufigsten verschriebenen Klassen oraler Antibiotika (Abbildung 4).⁶

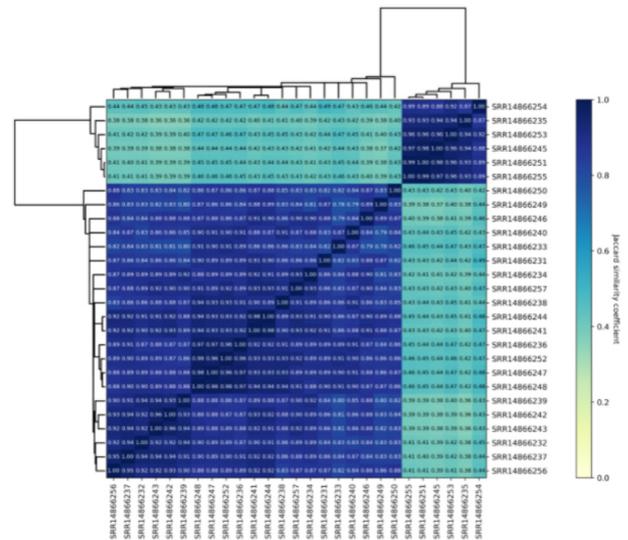
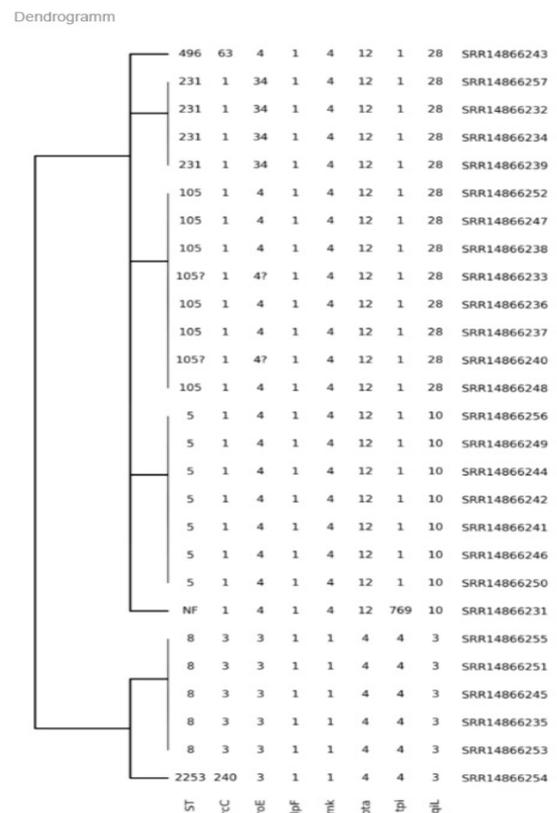


Abbildung 2: Isolat-Clustering mit der SRST2-App: Analyse von WGS-Datenclustern ähnlicher Isolate (dunkelblau) basierend auf nachgewiesenen Allelen in mehreren Datenbanken.



„NF“ wird verwendet, um Allelkombinationen anzugeben, die in der MLST-Datenbank nicht gefunden wurden.
 (?) wird verwendet, um auf Unsicherheiten bei aufgerufenen Sequenztypen hinzuweisen.
 (*) wird verwendet, um auf ungenaue Übereinstimmungen bei aufgerufenen Sequenztypen hinzuweisen.

Abbildung 3: Anhand von WGS bestimmte MLST-Allelprofile: Die SRST2-App gruppiert Isolate anhand der Anzahl gemeinsamer Allele.

Resistance Gene Database - CARD

Show 25 entries

Sample	ANT4_Agly	APH3_Agly	erm_MLS	FosB_Fcyn	MphC_MLS	MsrA_MLS	NoriA_Flg
SRR14866231	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866232	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866233	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866234	ant4-Id_128*	-	ermA_2135*	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866235	-	aph3-IIIa_153	ermC_v1_2138*	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866236	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866237	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866238	ant4-Id_128*	aph3-IIIa_153	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866239	ant4-Id_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866240	ant4-Id_128*	aph3-IIIa_153	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866241	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866242	ant4-Id_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866243	ant4-Id_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866244	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866245	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866246	ant4-Id_128*	-	ermC_v1_2138	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866247	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866248	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866249	-	-	ermC_v1_2138	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866250	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866251	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866252	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866253	-	aph3-IIIa_153	ermC_v2_2139*	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866254	-	-	ermC_v2_2139*	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866255	-	aph3-IIIa_153	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*

Showing 1 to 25 of 27 entries

Abbildung 4: Befund zu Resistenzgenen: Die SRST2-App enthält eine interaktive Tabelle, die angibt, welche Allele aus der CARD in jedem Isolat nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

HAIs sind ein schwerwiegendes Problem im Gesundheitswesen. Sie erhöhen die Morbidität und Mortalität sowie die Kosten für die Versorgung der Patienten. Mithilfe eines NGS-Workflows mit Datenanalyse in der SRST2-App lassen sich das Vorhandensein von Genen nachweisen, die mit klinisch relevanten Phänotypen assoziiert sind, darunter Virulenzgene, AMR-Gene oder Serotyp-Determinanten. Mit der schnellen Bibliotheksvorbereitung von Illumina und dem MiSeq System können bakterielle Genome innerhalb von zwei Tagen vollständig sequenziert und analysiert werden, was eine zeitnahe HAI-Überwachung ermöglicht.



1 800 8094566 (USA, gebührenfrei) | +1 858 2024566 (Tel. außerhalb der USA)
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Inhaber. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-01570 DEU v1.0

Weitere Informationen

SRST2 BaseSpace-App

Quellen

- Henderson A, Nimmo GR. [Control of healthcare- and community-associated MRSA: recent progress and persisting challenges.](#) *Br Med Bull.* 2018;125(1):25-41. doi:10.1093/bmb/ldx046.
- Jia H, Li L, Li W, et al. [Impact of Healthcare-Associated Infections on Length of Stay: A Study in 68 Hospitals in China.](#) *Biomed Res Int.* 2019;2019:2590563. Veröffentlicht am 18. April 2019. doi:10.1155/2019/2590563.
- Mirande C, Bizine I, Giannetti A, Picot N, van Belkum A. [Epidemiological aspects of healthcare-associated infections and microbial genomics.](#) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(5):823-831. doi:10.1007/s10096-017-3170-x.
- Huang W, Wang G, Yin C, et al. [Optimizing a Whole-Genome Sequencing Data Processing Pipeline for Precision Surveillance of Health Care-Associated Infections.](#) *Microorganisms.* 2019;7(10):388. Veröffentlicht am 24. September 2019. doi:10.3390/microorganisms7100388.
- Khan SA, Gudeta DD, Aljahdali N, et al. [Draft Genome Sequences of 27 Hospital-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated in Minnesota.](#) *Microbiol Resour Announc.* 2022;11(2):e0118621. doi:10.1128/mra.01186-21.
- Centers for Disease Control and Prevention. [Outpatient antibiotic prescriptions — United States, 2021.](#) [cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html](https://www.cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html). Aktualisiert am 4. Oktober 2022. Aufgerufen am 25. Januar 2023.