Untersuchung von Infektionsausbrüchen und Identifizierung möglicher Infektionsquellen

Bei Verdacht auf einen Infektionsausbruch in medizinischen und gemeinschaftlichen Einrichtungen bietet das NLGA den niedersächsischen Gesundheitsämtern eine Ganzgenomsequenzierung der Isolate an, um den Ausbruch zu bestätigen und die dazugehörigen Fälle einzugrenzen. Die Ganzgenomsequenzierung (Whole Genome Sequencing, WGS) gilt dabei heutzutage als das Verfahren der Wahl für die Bestimmung der genetischen Verwandtschaft von verdächtigen Isolaten. Zusätzlich lassen sich durch bioinformatische Analyse der Genomdaten Antibiotikaresistenzgene, Virulenzfaktoren und anderen relevante genetische Marker nachweisen.
Bitte beachten Sie, dass Sequenzierungsergebnisse im Normalfall spätestens 14 Tage nach Eingang der Proben vorliegen. In der Zwischenzeit möchten wir Sie bitten, von Sachstandsanfragen abzusehen. Sollten Verzögerungen auftreten, werden wir Sie kontaktieren.

Zur Untersuchung der genetischen Verwandtschaft wird oft eine auf der Ganzgenomsequenzierung basierende cgMLST-Analyse (core genome Multilocus Sequence Typing) durchgeführt, die wegen ihrer deutlich höheren Auflösung langsam klassische Methoden wie MLST oder PFGE ablöst. So werden für die Feintypisierung im Unterschied zur MLST-Analyse nicht nur sieben, sondern meist über tausend Gene hinzugezogen (siehe Tabelle 1).
Für jedes dieser Gene wird aus den Sequenzdaten die entsprechende Sequenzvariante durch Abgleich mit einem öffentlich zugänglichen und validierten Referenzschema (cgMLST-Schema) ermittelt. Jeder bekannten Sequenzvariante ist eine eindeutige Nummer zugeordnet und somit ergibt sich, ähnlich wie bei der MLST-Analyse, für jede zu untersuchende Probe ein eindeutiger Zahlencode (Allelkombination). Mithilfe des Zahlencodes wird für jede Probe ein eindeutiger, zwischen verschiedenen Laboren identischer und damit leicht kommunizierbarer cgMLST-Complextyp (CT) ermittelt. Anders als bei MLST-Sequenztypen (ST) wird dabei nicht jeder Allelkombination ein eindeutiger CT zugewiesen, da fast jede Probe eine einzigartige Kombination aufweist. Daher werden Isolate mit sehr ähnlichen cgMLST-Profilen, ähnlich den klonalen MLST-Komplexen (CC), demselben CT zugeordnet.
cgMLST-Schemata sind üblicherweise speziesspezifisch. Bei wenigen, sehr nah verwandten Arten (z. B. *Mycobacterium tuberculosis*-Komplex) sind die Referenzschemata gattungsspezifisch. Spezies, für die öffentlich zugängliche cgMLST-Schemata zur Verfügung stehen, sind in Tabelle 1 gelistet (siehe auch www.cgmlst.org). Für Spezies ohne öffentlich zugängliche und validierte Referenzschemata können sogenannte *ad hoc* cgMLST-Schemata erstellt werden, welche jedoch nicht validiert sind und nur eine lokale Nomenklatur darstellen. Somit ist nur dann ein Vergleich zwischen verschiedenen Laboren möglich, wenn dasselbe *ad hoc* cgMLST-Schema für die Analyse verwendet wurde.

Dienstgebäude
Roesebeckstr. 4-6
30449 Hannover
Internet: www.nlga.niedersachsen.de
E-Mail: ngs-anfragen@nlga.niedersachsen.de

Telefon
0511 / 4505-201

Telefax
0511 / 4505-240

Bankverbindung
Norddeutsche Landesbank Hannover
IBAN: DE96 2505 0000 0106 0216 94
BIC: NOLADE2H

Tabelle 1: Spezies, für die cgMLST-Schemata unter www.cgmlst.org zur Verfügung stehen. Bitte beachten Sie, dass am NLGA nur Mikroorganismen der Risikogruppe 1, 2 und 3(**) aufgearbeitet und sequenziert werden können. Erreger, die der Risikogruppe 3 zugeordnet werden (z. B. *M. tuberculosis*), können am NLGA derzeit nicht für die NGS-Analyse aufgearbeitet werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, DNA von Mikroorganismen der Risikogruppe 3 einzusenden und mittels NGS analysieren zu lassen (siehe auch Dokument „Information - Probenversand für die NGS-Analyse“).

Spezies	Anzahl cgMLST-Targets
Acinetobacter baumannii	2390
Bacillus anthracis	3803
Bordetella pertussis	2983
Brucella melitensis	2704
Brucella spp.	1764
Burkholderia mallei (FLI)	2838
Burkholderia mallei (RKI)	3328
Burkholderia pseudomallei	4221
Campylobacter jejuni/coli	637
Clostridioides difficile	2147
Clostridium perfringens	1431
Corynebacterium diphtheriae	1553
Corynebacterium pseudotuberculosis	1577
Cronobacter sakazakii/malonaticus	2831
Enterococcus faecalis	1972
Enterococcus faecium	1423
Escherichia coli	2513
Francisella tularensis	1147
Klebsiella oxytoca/grimontii/michiganensis/pasteurii	2536
Klebsiella pneumoniae/variicola/quasipneumoniae	2358
Legionella pneumophila	1521
Listeria monocytogenes	1701
Mycobacterium tuberculosis/bovis/africanum/canettii	2891
Mycobacteroides abscessus	2904
Mycoplasma gallisepticum	425
Paenibacillus larvae	2419
Pseudomonas aeruginosa	3867
Salmonella enterica	3002
Serratia marcescens	2692
Staphylococcus aureus	1861
Staphylococcus capitis	1492
Streptococcus pyogenes	1095
Yersinia enterocolitica	2582

Die Ergebnisse einer cgMLST-Analyse werden meist in phylogenetischen Bäumen und Epidemiekurven veranschaulicht (Abbildung 1). Die mittels dieser Methodik aufgestellten Hypothesen über mögliche Infektionsquellen und Transmissionsketten müssen jedoch durch epidemiologische und zeitliche Untersuchungen bestätigt werden, da sich durch die Bestimmung des CTs allein kein direkter epidemiologischer Zusammenhang ableiten oder ausschließen lässt.

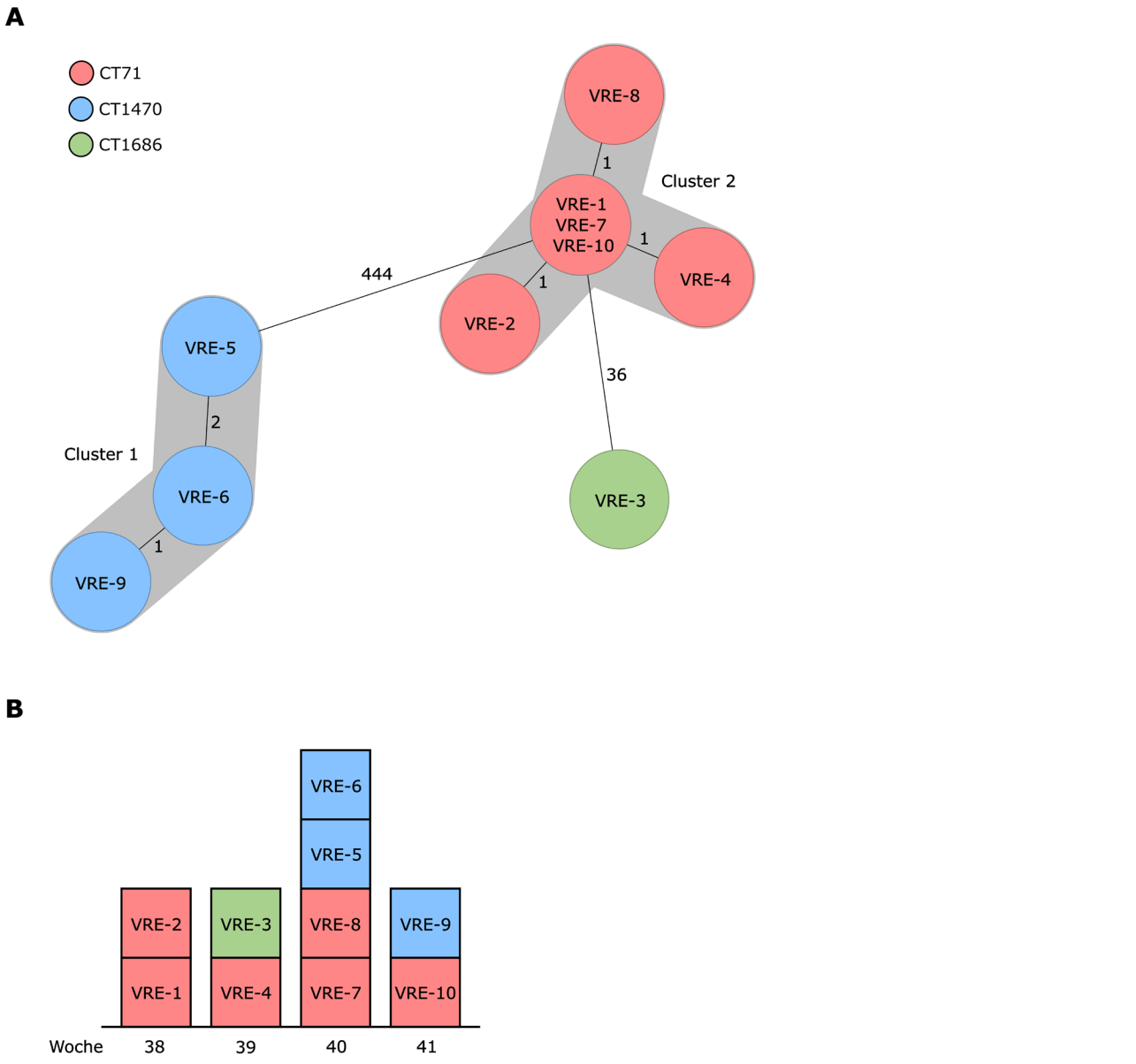

Abbildung 1: Minimum Spanning Tree (MST) basierend auf den cgMLST-Allelprofilen von 10 VRE-Isolaten (A) und Epidemiekurve (B). Es wurde das öffentlich zugängliche und validierte Referenzschema für *Enterococcus faecium* verwendet. Der MST stellt die relativen Verwandtschaftsverhältnisse im paarweisen Vergleich dar. Jeder Kreis repräsentiert ein Allelprofil basierend auf einer Sequenzanalyse von 1423 cgMLST-Targets. Die Zahlen auf den Verbindungslinien zeigen die Anzahl der cgMLST-Targets mit unterschiedlichen Allelen. Eng verwandte Isolate (≤ 4 Alleldifferenz), die demselben CT zugeordnet werden, sind grau unterlegt.

Im fiktiven Beispiel in Abbildung 1A können die Isolate drei unterschiedlichen CTs zugeordnet werden: CT71, CT1470 und CT1686. Neun der zehn Isolate werden einem von zwei Clustern zugeordnet. Isolate, die dem CT1470 zugeordnet werden, unterscheiden sich in 1-3 cgMLST-Targets (Cluster 1), während Isolate, die dem CT71 zugeordnet werden, sich in 0-2 cgMLST-Targets zueinander unterscheiden (Cluster 2). Isolate, die demselben Cluster zugeordnet werden, weisen folglich ein identisches oder nahezu identisches cgMLST-Profil auf und sind genetisch eng miteinander verwandt. Das Einzelisolat VRE-3 wird dem CT1686 zugeordnet und grenzt sich eindeutig von den Isolaten der beiden Cluster ab. Die Epidemiekurve (Abbildung 1B) zeigt, dass alle Isolate in einem kurzen Zeitraum von vier Wochen nachgewiesen wurden.

In Zusammenschau mit den vorliegenden epidemiologischen und zeitlichen Informationen deuten die molekularen Ergebnisse in diesem Beispiel darauf hin, dass der Nachweis von VRE mit identischem oder nahezu identischem cgMLST-Profil in einem kurzen Zeitraum von vier Wochen sehr wahrscheinlich auf Transmissionen innerhalb der Einrichtung zurückzuführen ist. Diese Hypothese kann durch weitergehende epidemiologische und zeitliche Informationen bestätigt werden: Die Personen, deren Isolate dem Cluster 1 zugeordnet wurden, waren zeitgleich im selben Zimmer untergebracht. Die Personen, deren Isolate dem Cluster 2 zugeordnet wurden, waren in drei benachbarten Zimmern untergebracht, zum Teil auch zeitgleich. Dementsprechend deuten die derzeitigen Ergebnisse an, dass es sich um zwei parallel existierende VRE-Häufungen handelt. Bei dem Isolat VRE-3 handelt es sich um einen sporadischen Fall, der keinem der beiden Häufungen zugeordnet werden kann.

Zusammenfassung: cgMLST-Analyse am NLGA

- Im Normalfall liegen Sequenzierergebnisse spätestens 14 Tage nach Eingang der Proben vor. In der Zwischenzeit möchten wir Sie bitten, von Sachstandsanfragen abzusehen. Sollten Verzögerungen auftreten, werden wir Sie kontaktieren.
- Durch die Bestimmung des Complextyps alleine lässt sich kein direkter epidemiologischer Zusammenhang ableiten oder ausschließen.
- Hypothesen über mögliche Transmissionsketten müssen immer durch epidemiologische und zeitliche Untersuchungen bestätigt werden.
- Gerne diskutieren wir mit Ihnen mögliche Hypothesen. Für eine detaillierte Auswertung möchten wir Sie bitten, folgende Information zu den einzelnen Proben möglichst vollständig auszuarbeiten:

Wo wurde der Erreger nachgewiesen (welche Station, Zimmer usw.)?
Wie lange (gibt es mehrere Isolate derselben Person)?
Wann wurde der Erreger nachgewiesen?
Weitere Informationen (z. B. vorangegangene Besiedlung bekannt)?