

Typisierung – Resistenzen auf der genetischen Spur

Dr. Linda Falgenhauer
Hessisches Landesamt für Gesundheit und Pflege
Abteilung II (Gesundheit- und Infektionsschutz, Dezernat I)

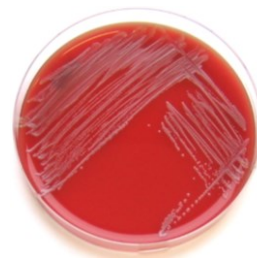
Dienstag, 19.11.2024

Eine mögliche Situation

„Auf Station XXX wurden 4MRGN *Escherichia coli*-Isolate in einem Abstand von 1 Woche bei zwei Patienten detektiert. Sie tragen beide eine KPC-2-Carbapenemase. Sind diese Isolate identisch?“

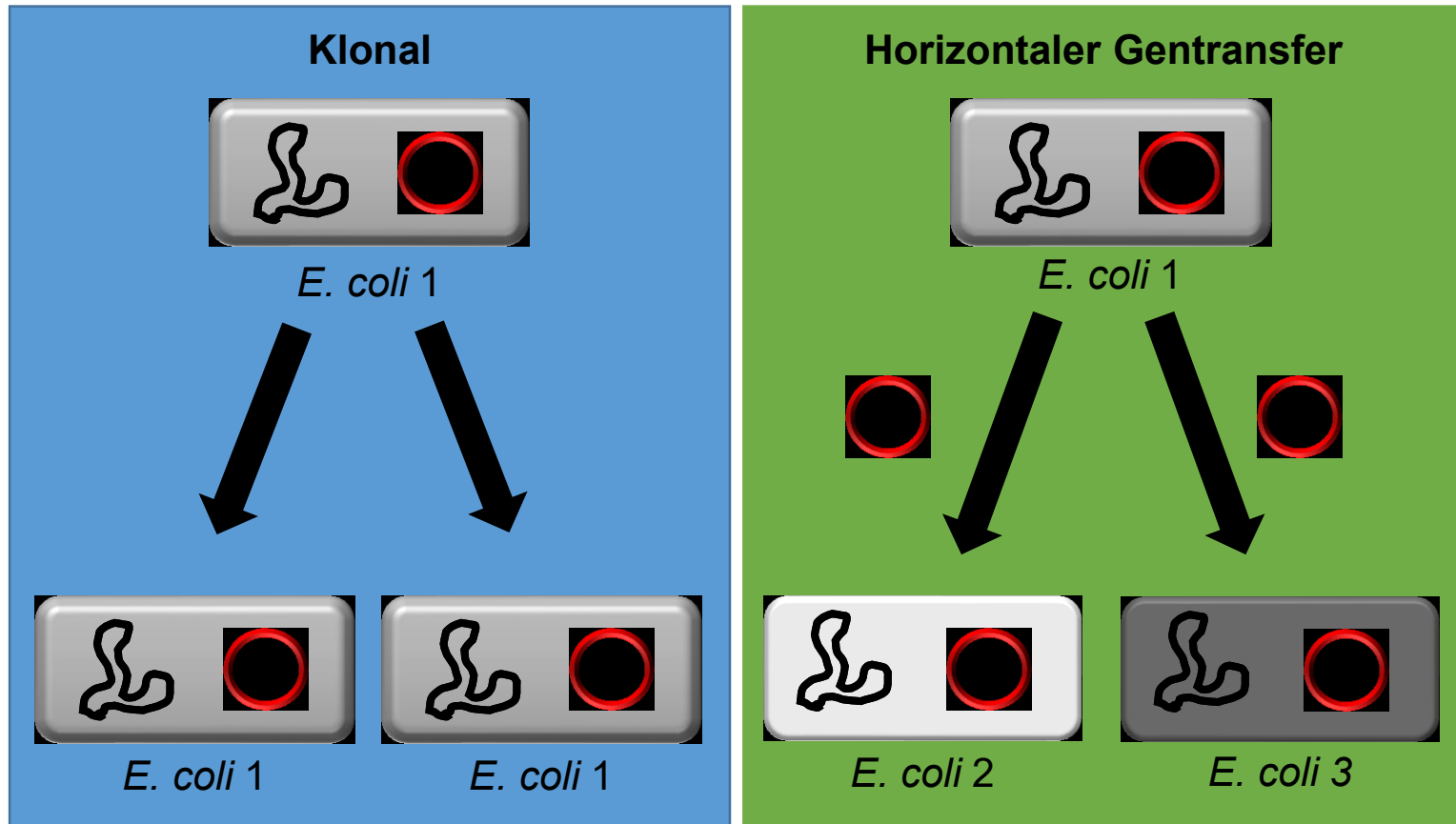


E. coli A



E. coli B

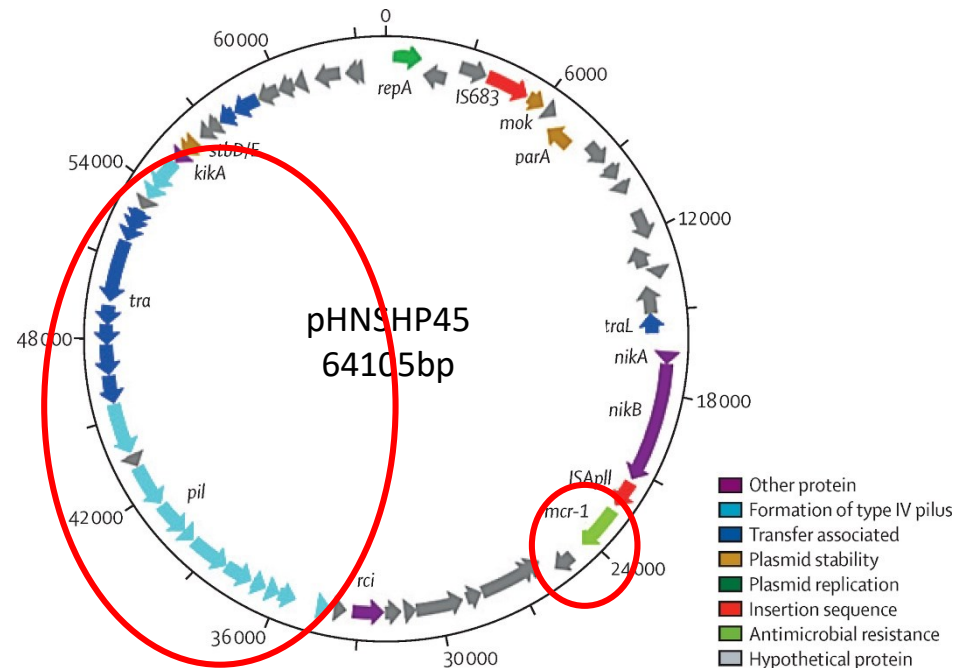
Mögliche Erklärungen für diese Situation:



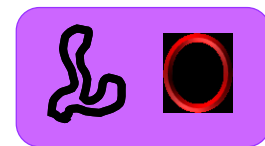
 = Chromosom  = Resistenzplasmid

Plasmide

- Können schnell und auch über Spezies-Grenzen hinweg übertragen werden
- Tragen häufig Antibiotikaresistenz- oder Virulenz-Gene

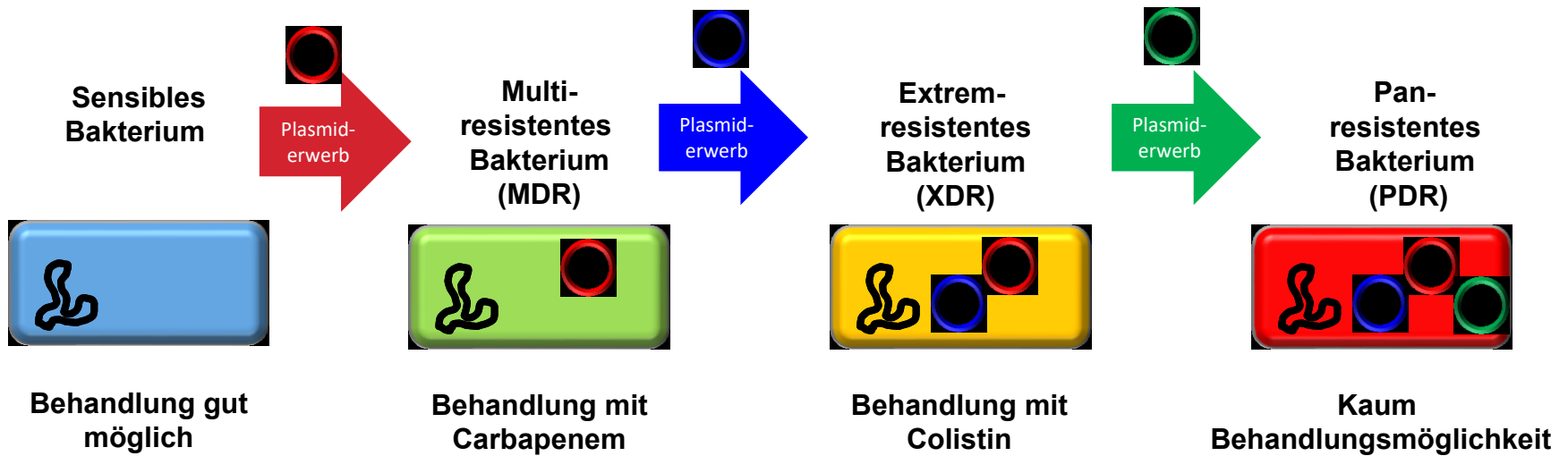


Klebsiella pneumoniae

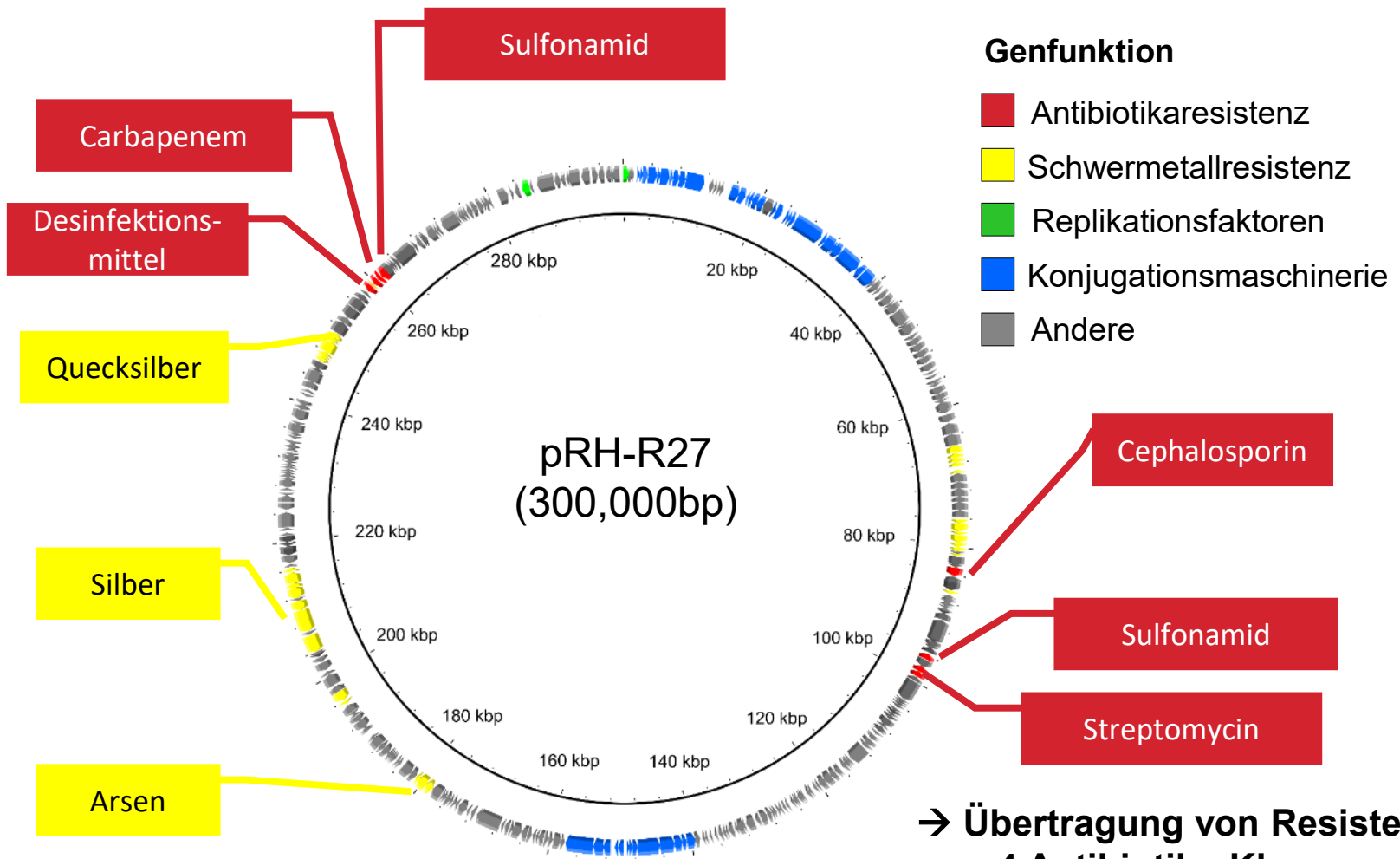


Escherichia coli

Besonderheit Plasmide bei Enterobacterales



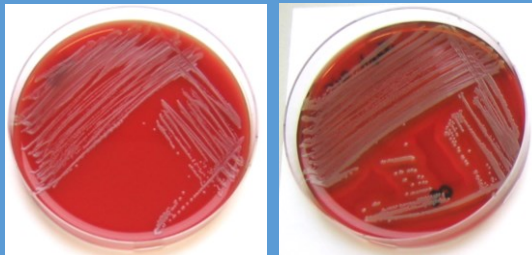
Plasmid-Phänomen 2: Multiresistenz



→ Übertragung von Resistenz
gegen 4 Antibiotika-Klassen und 3
Schwermetallen!

Methoden zur Typisierung von Bakterien

Spezies- Bestimmung



Bakterium A Bakterium B



Antibiotika-Resistenz- Bestimmung

Antibiotikum	Bakterium A	Bakterium B
Piperacillin	R	R
Piperacillin + Tazobactam	R	R
Cefotaxim	R	R
Imipenem	R	R
Aztreonam	R	R
Ciprofloxacin	R	R
Gentamicin	R	R
Trimethoprim + Sulfamethoxazol	S	S

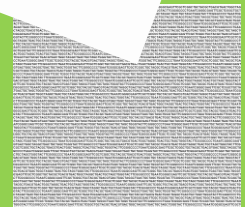
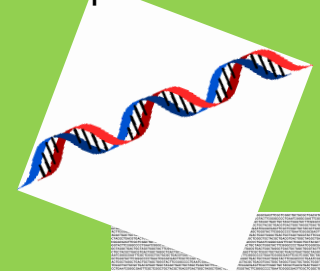


Genomsequenzierung = Dechiffrierung der gesamten DNA-Sequenz

Chromosom

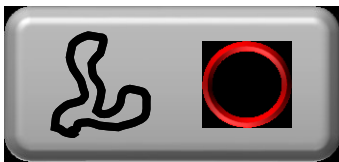


Plasmid



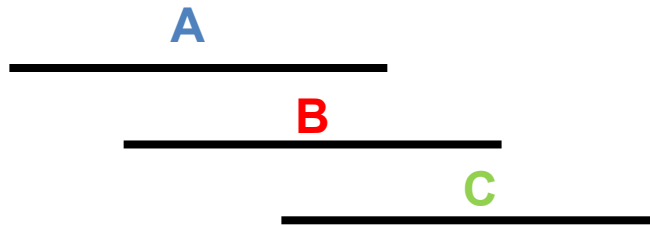
Genomsequenzierung Ablauf

1. DNA isolieren

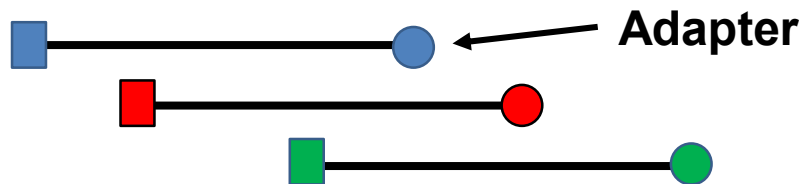


© 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved. This document is the property of Pearson Education, Inc. and is not to be distributed, copied, or reproduced in any form without the prior written permission of Pearson Education, Inc. This document is intended for personal use only. Any other use, including copying, distribution, or reproduction, is strictly prohibited. All other trademarks and registered trademarks are the property of their respective owners.

2. Sequenzierbibliothek erstellen



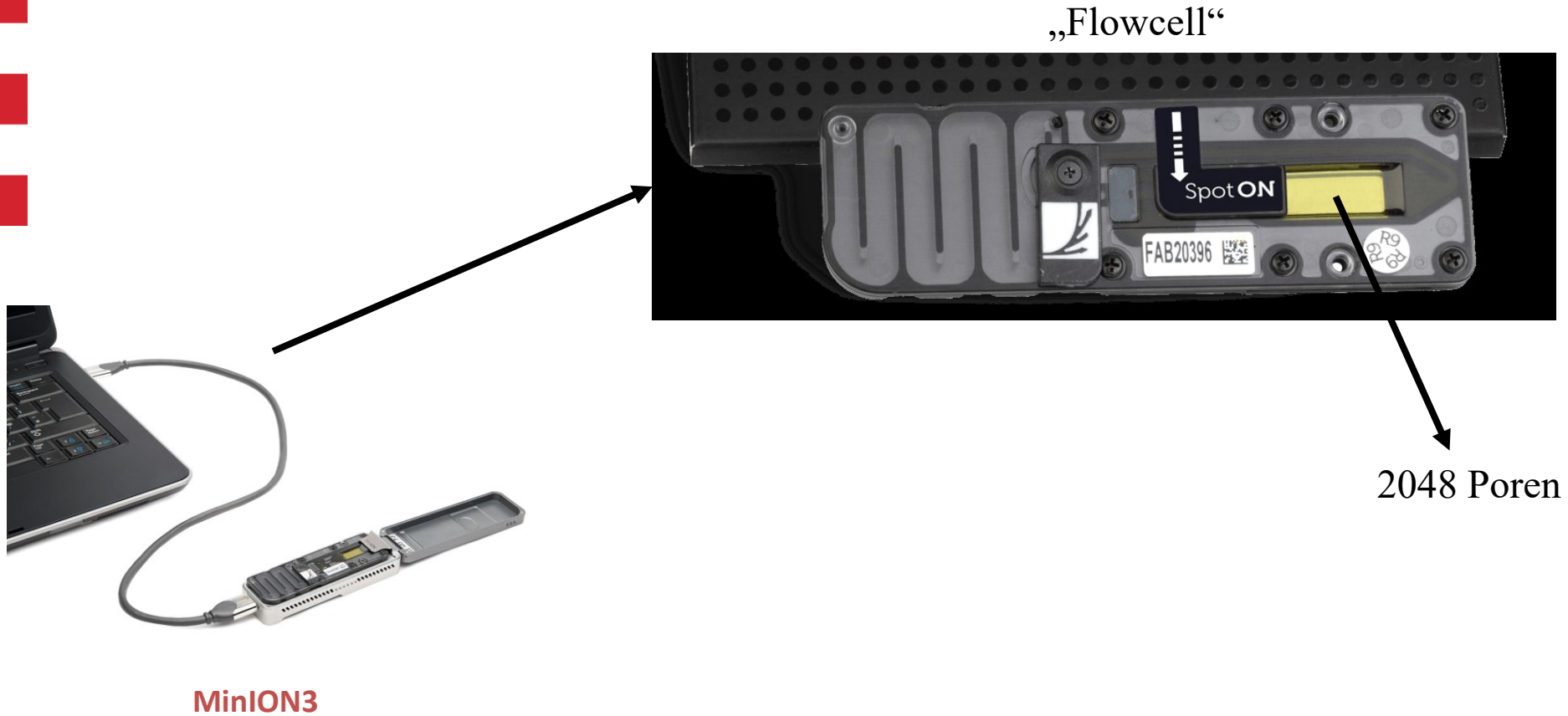
Adapter
ligieren



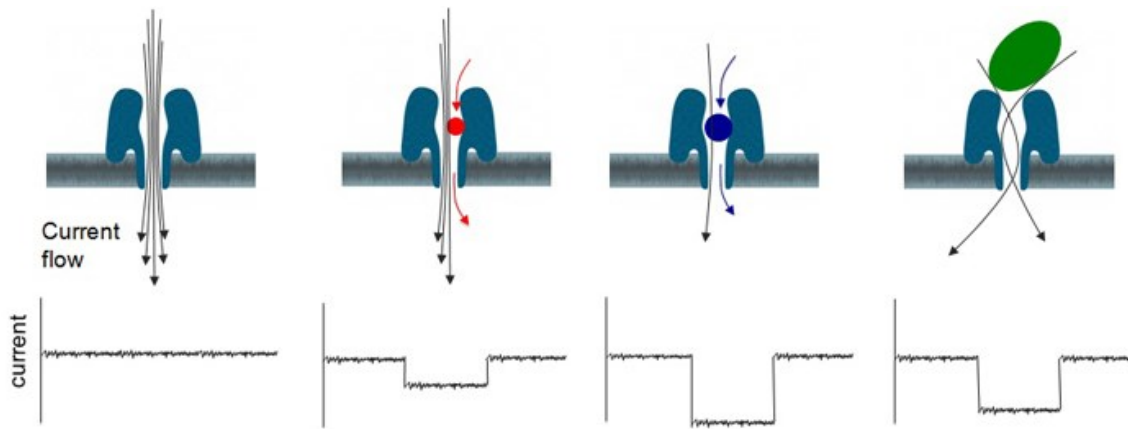
3. Sequenzieren

1.	A	1.	A	1.	A
2.	T	2.	T	2.	T
3.	C	3.	C	3.	C
4.	G	4.	G	4.	G
5.	T	5.	T	5.	T
6.	T	6.	T	6.	T
7.	T	7.	T	7.	T
8.	T	8.	T	8.	T
9.	A	9.	A	9.	A
10.	T	10.	T	10.	T
11.	C	11.	C	11.	C
12.	G	12.	G	12.	G
13.	T	13.	T	13.	T

Nanopore – Echtzeit-Sequenzierung



Nanopore-Sequenzierung - Funktionsweise



- „long read sequencing“
(1 Million Basenpaare möglich)
- Methode geeignet für Plasmidsequenzanalyse



Pseudomonas aeruginosa

~ 6 Millionen Buchstaben

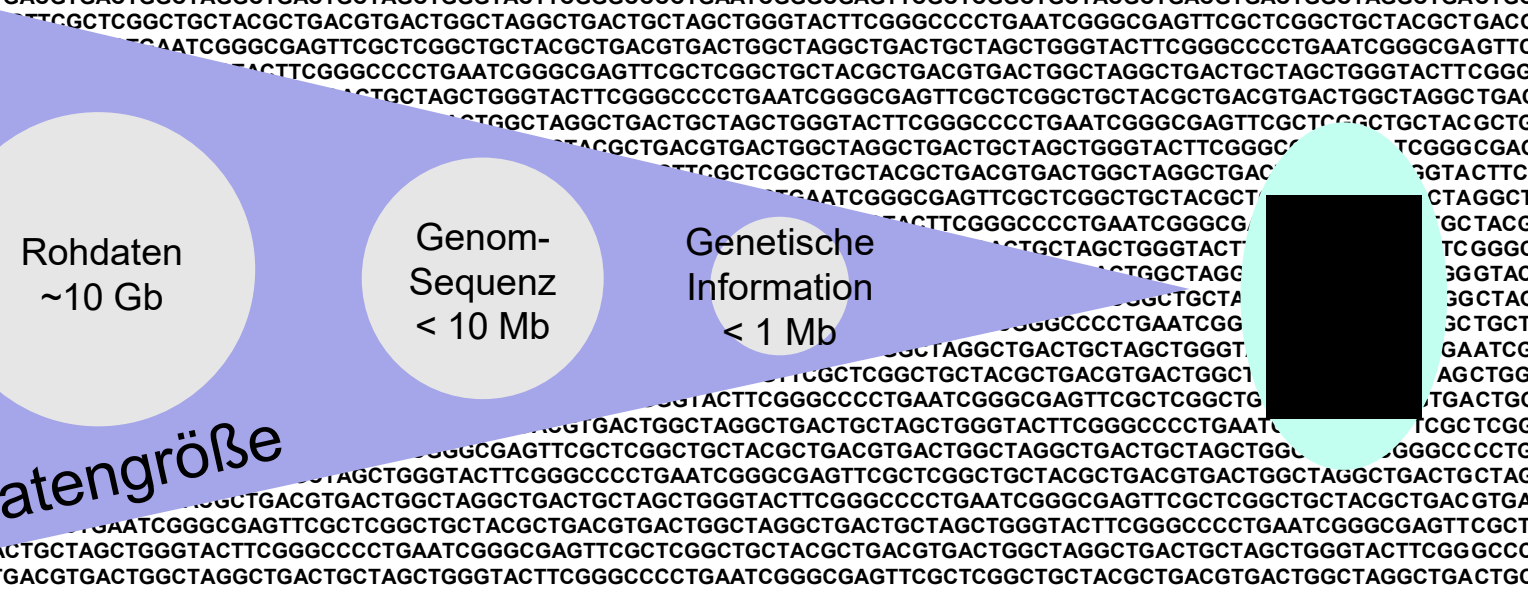
Escherichia coli

~ 5 Millionen Buchstaben

Acinetobacter baumannii

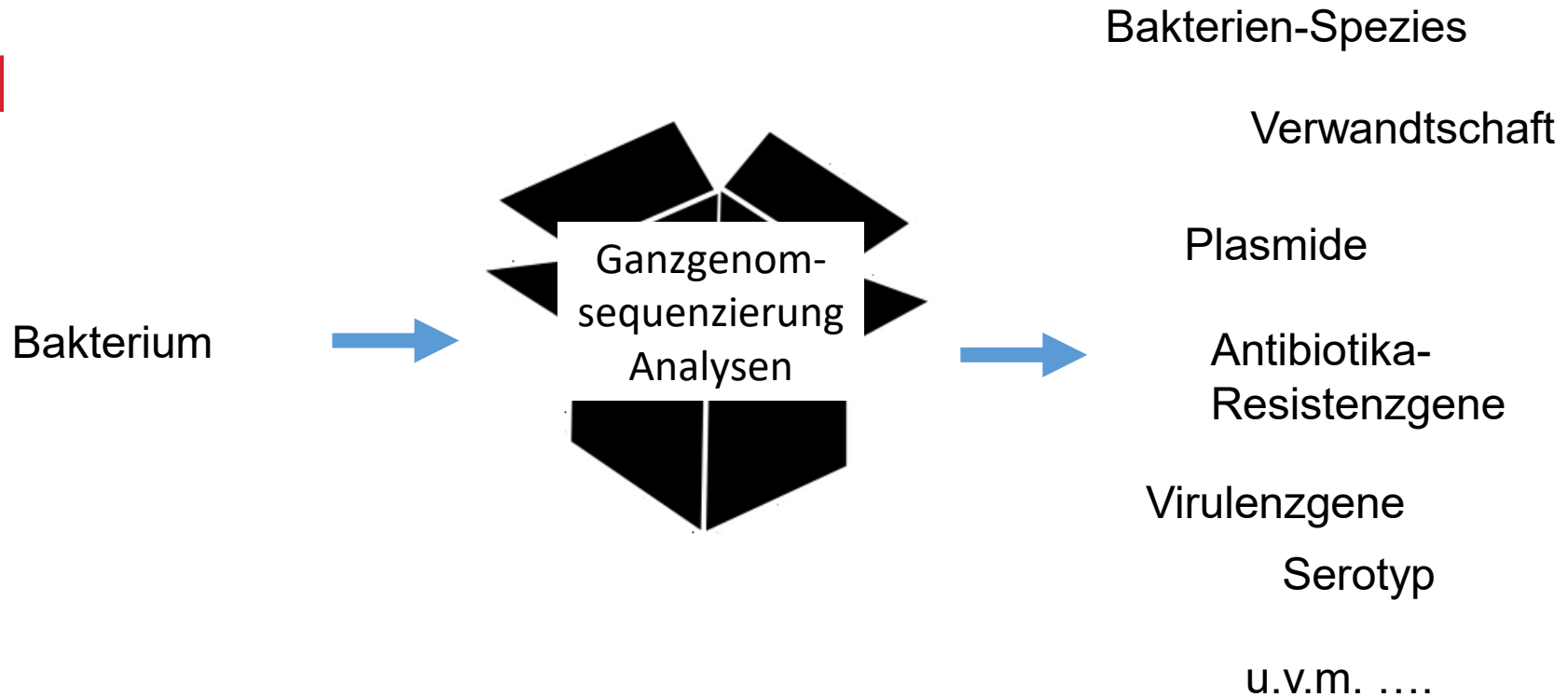
~ 4 Millionen Buchstaben

A
C
T
G

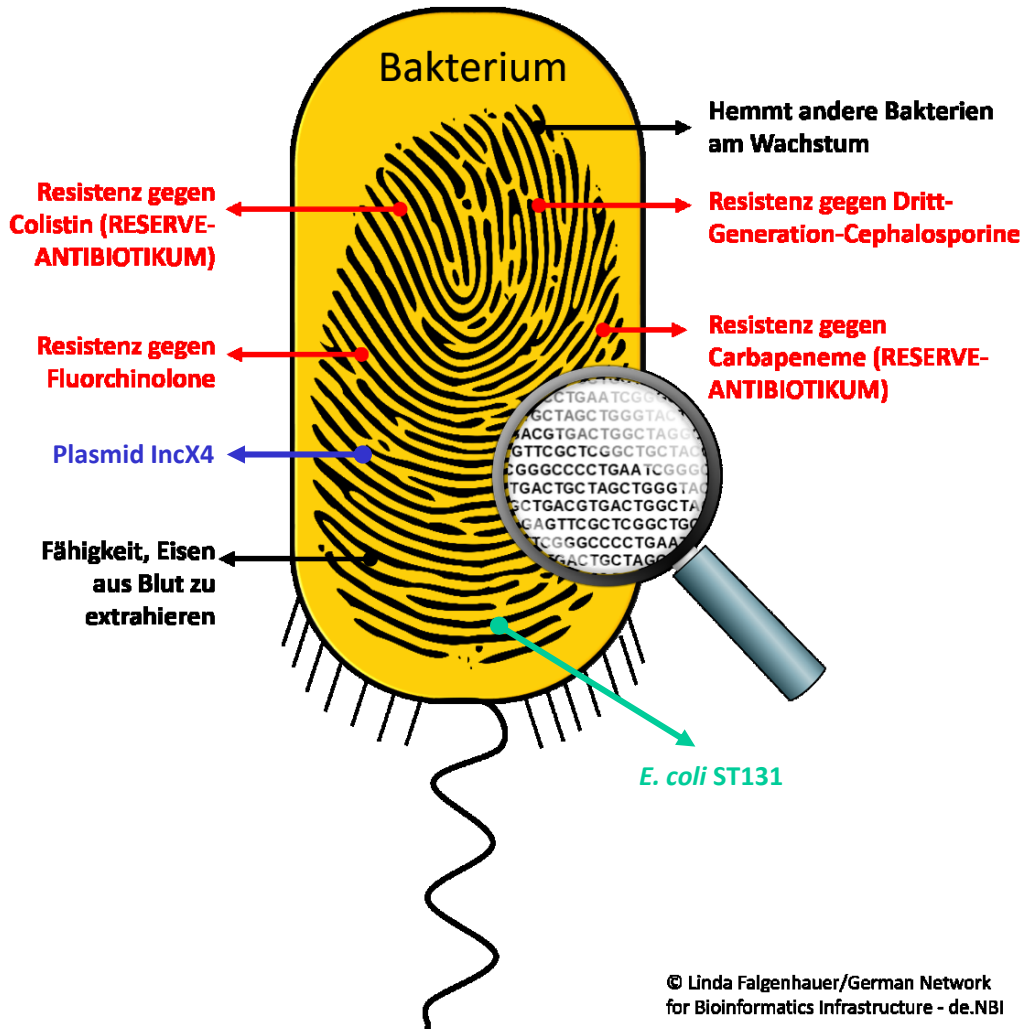


→ Erstellen eines genetischen Fingerabdruckes

Beispiele möglicher Analysen



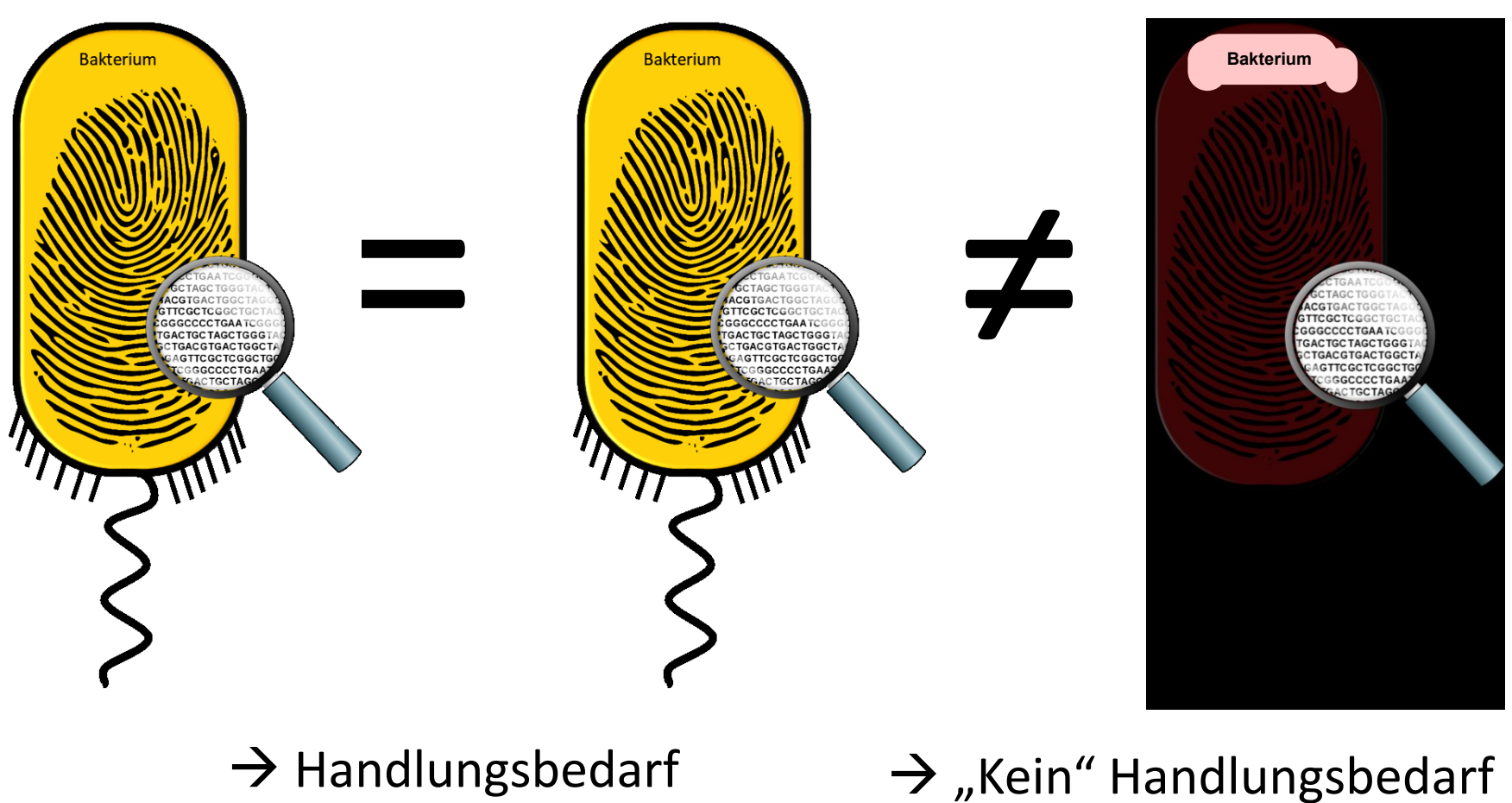
Beispiel eines genetischen Fingerabdruckes



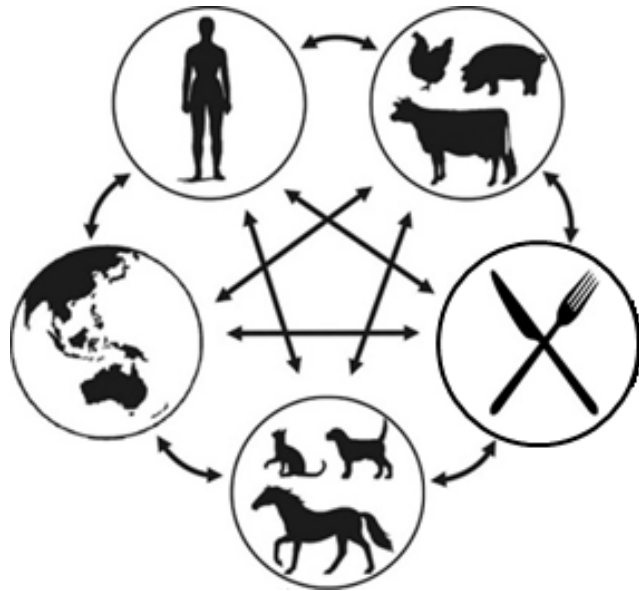
Legende

- Verwandtschaft
- Virulenz-Eigenschaften
- Resistenz-Eigenschaften
- Plasmide

Genetische Fingerabdrücke können verglichen werden



Fall 1: ESBL-Produzenten im One Health Kontext



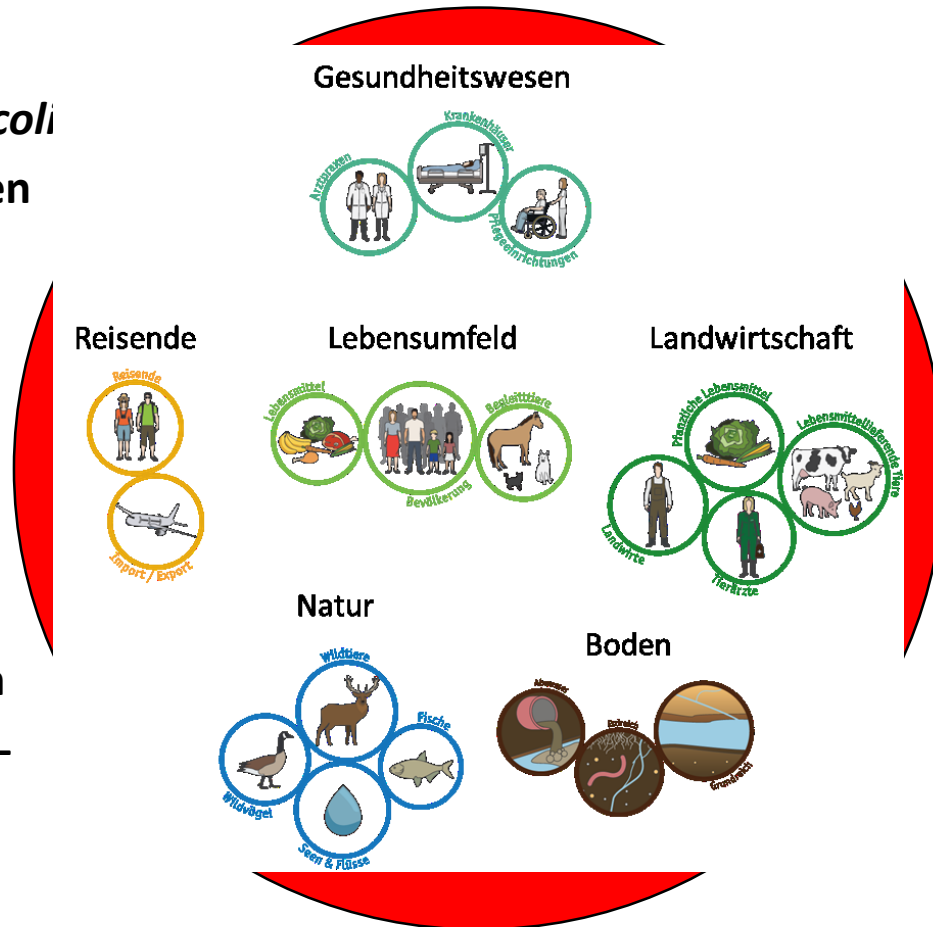
Interdisziplinäre Partner

- Humanmedizin
- Umweltmedizin
- Veterinärmedizin
- Lebensmittel

Ergebnisse RESET

ESBL-kodierende *E. coli*
sind in allen Quellen
vorhanden

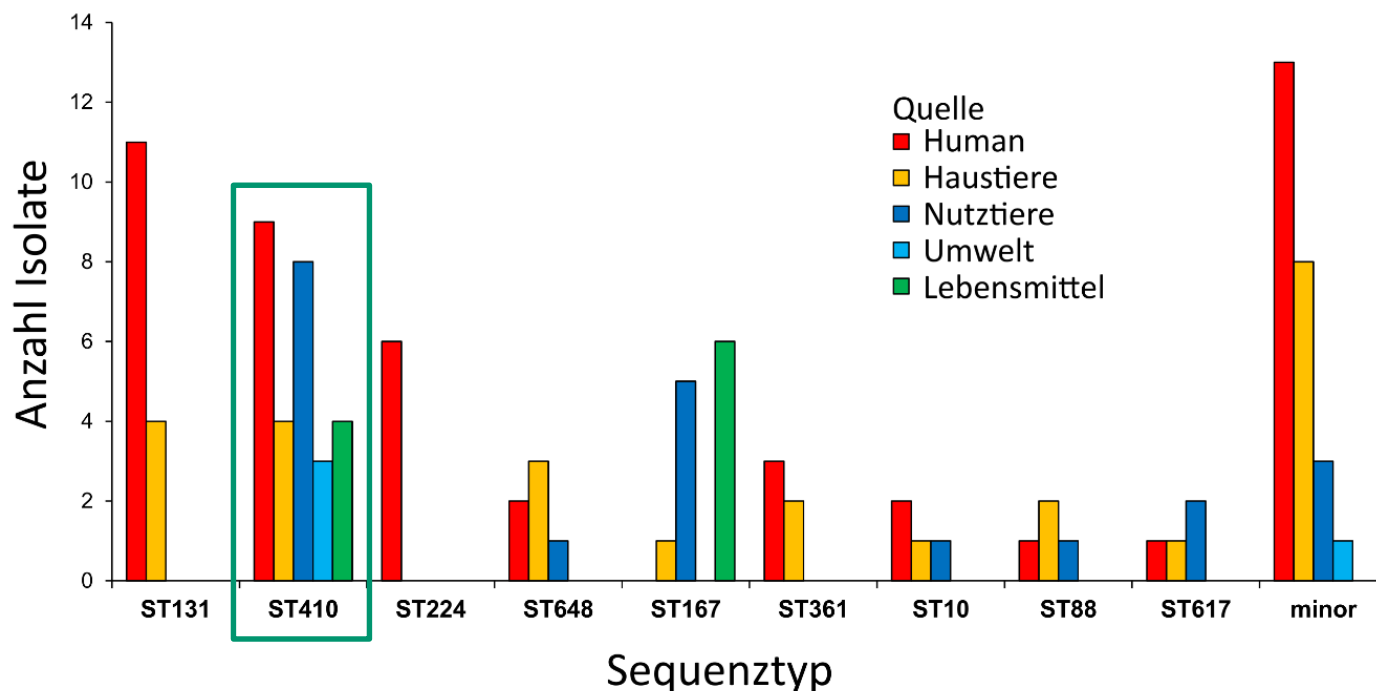
Isolate aus
unterschiedlichen
Quellen tragen
identische ESBL-Gene



8% der

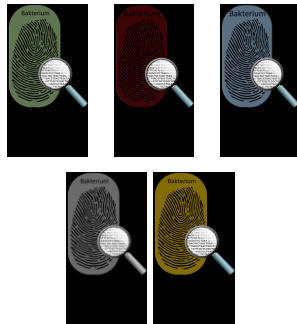
Allgemeinbevölkerung in
Deutschland tragen ESBL-
kodierende *E. coli*

Genauere Untersuchung der *E. coli* CTX-M-15-Produzenten

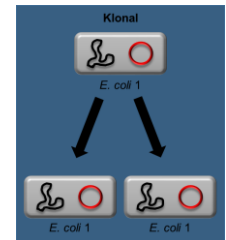
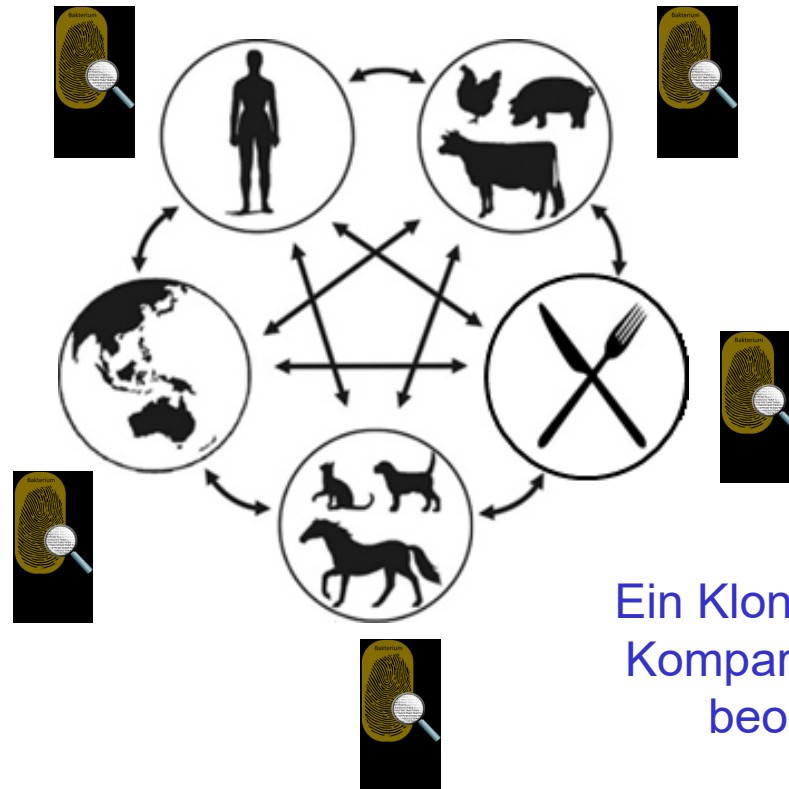


- Sequenztyp ST410 in allen fünf Kompartimenten beobachtet
- Genomsequenzierung zur Überprüfung der Klonalität

Vergleich der genetischen Fingerabdrücke der ST410-Isolate



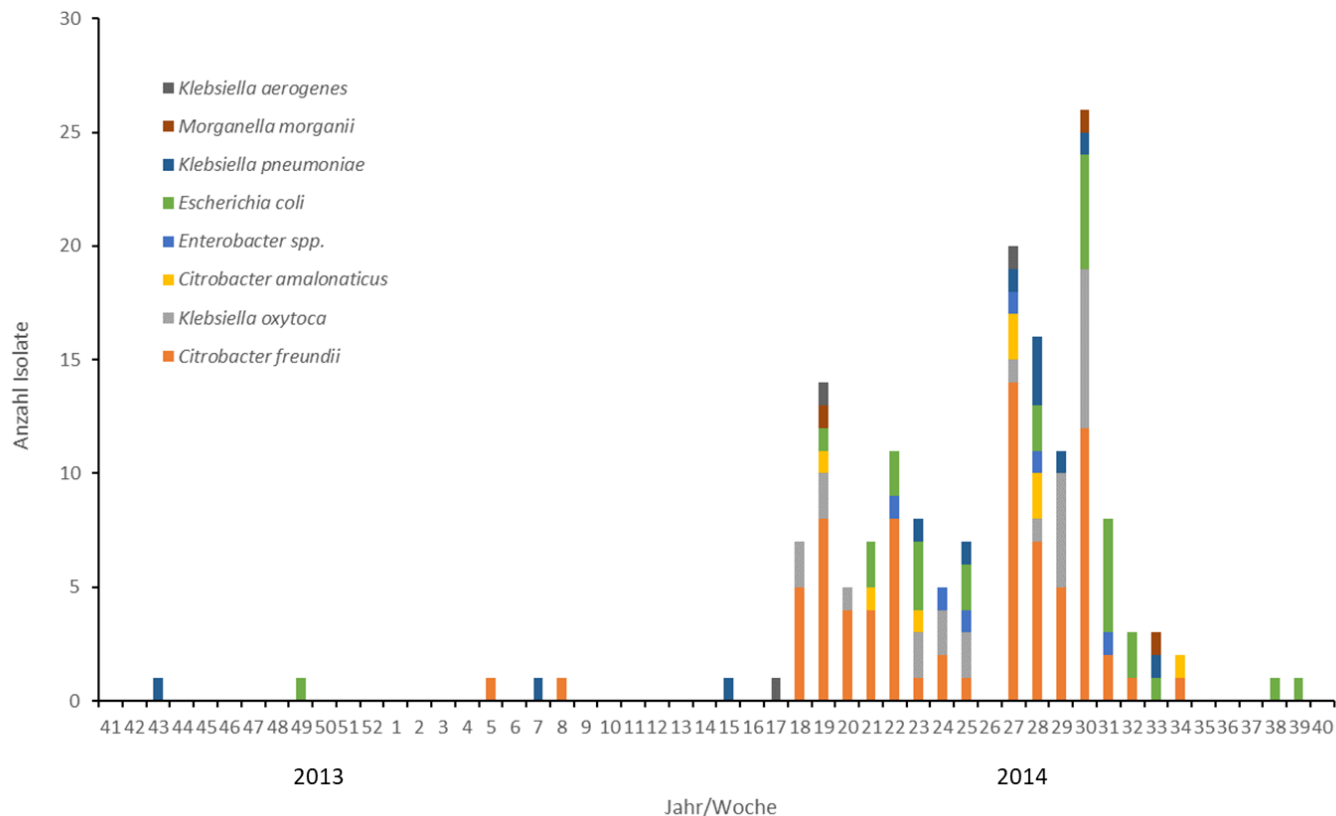
Fünf
Klone



Ein Klon in allen fünf
Kompartimenten zu
beobachten

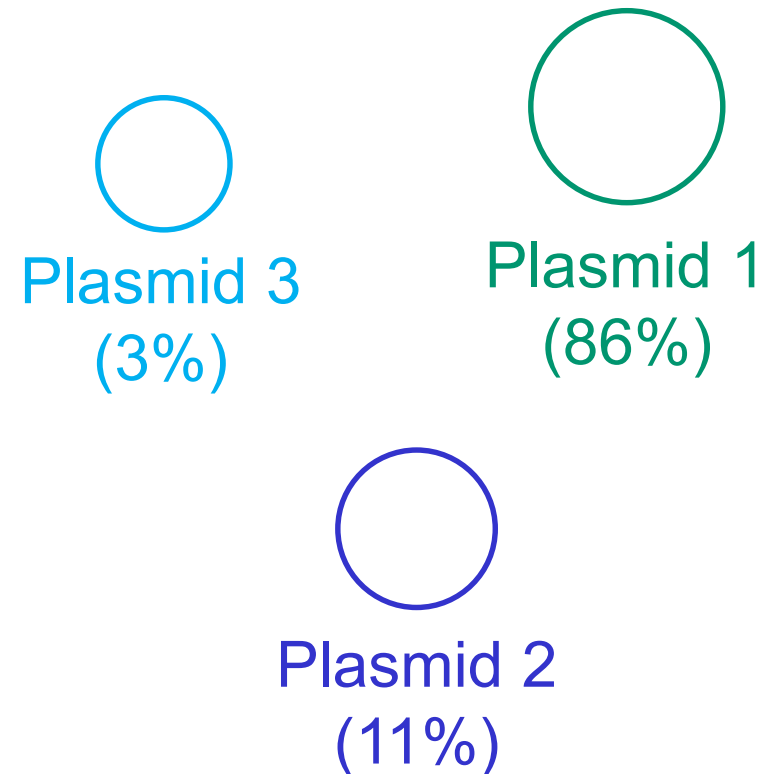
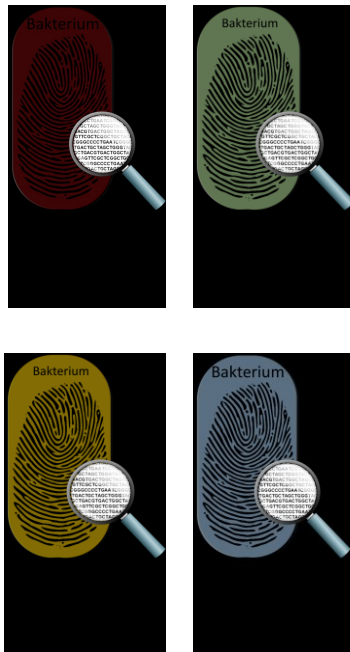
- Klonale Übertragung eines ESBL-Produzenten zwischen unterschiedlichen Kompartimenten
- Offene Frage: Welche Richtung?

Fall 2: KPC-2-Ausbruch in Südhessen (2014)



- Sehr viele unterschiedliche Gram-negative Spezies
- Alle tragen identische Carbapenemase (KPC-2)
- Plasmidübertragung?

Vergleich der genetischen Fingerabdrücke von KPC-2-Ausbruch in Südhessen



Genauere Plasmidanalyse

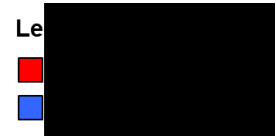
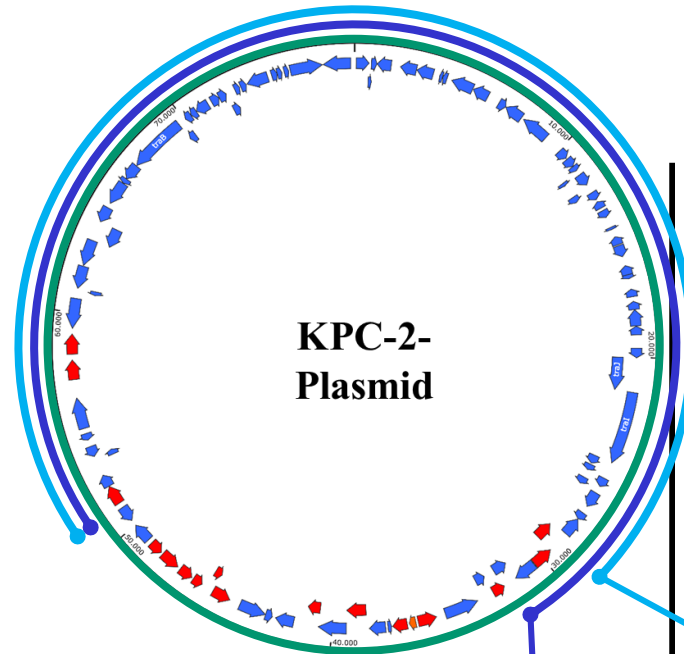
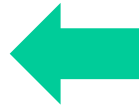
Muster	Beta-Lactam			Streptomycin		Fluorchinolon		Aminoglykosid	Erythromycin	Chloramphenicol	Rifampicin	Sulfonamid	Trimethoprim	Desinfektionsmittel
	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>qnrB2</i>	<i>aac(3)-IId</i>	<i>mph(A)</i>	<i>catB3</i>	<i>AAR-3</i>	<i>sul1(1-2x)</i>	<i>dfrA19</i>	<i>qacEA-1</i>
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+		+	+			+						
3	+	+						+						
	+	+						+						

→ Plasmide weisen unterschiedliche Resistenzmuster auf, aber identischen Plasmid-MLST-Typ (IncN/ST15)

Variabilität des IncN/ST15-KPC-2 -Plasmides

Muster	<i>bla</i> _{KPC2}	Beta-Lactam			Streptomycin		Fluorchinolone		Aminoglykosid	Erythromycin	Chloramphenicol	Rifampicin	Sulfonamid	Trimethoprim	Desinfektionsmittel
	<i>bla</i> _{KPC2}	<i>bla</i> _{TEM-1B}	<i>bla</i> _{OXA-1}	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aac(6')</i> - <i>lb-cr</i>	<i>qnrB2</i>	<i>aac(3)-IIa</i>	<i>mph(A)</i>	<i>catB3</i>	AAR-3	<i>sulI</i> (1-2x)	<i>dfrA19</i>	<i>qacEA-1</i>	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

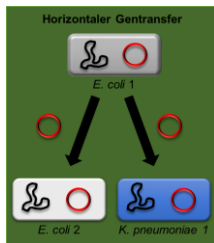
Spezifischer Bereich
= PCR-Primer



Muster 1

Muster 2

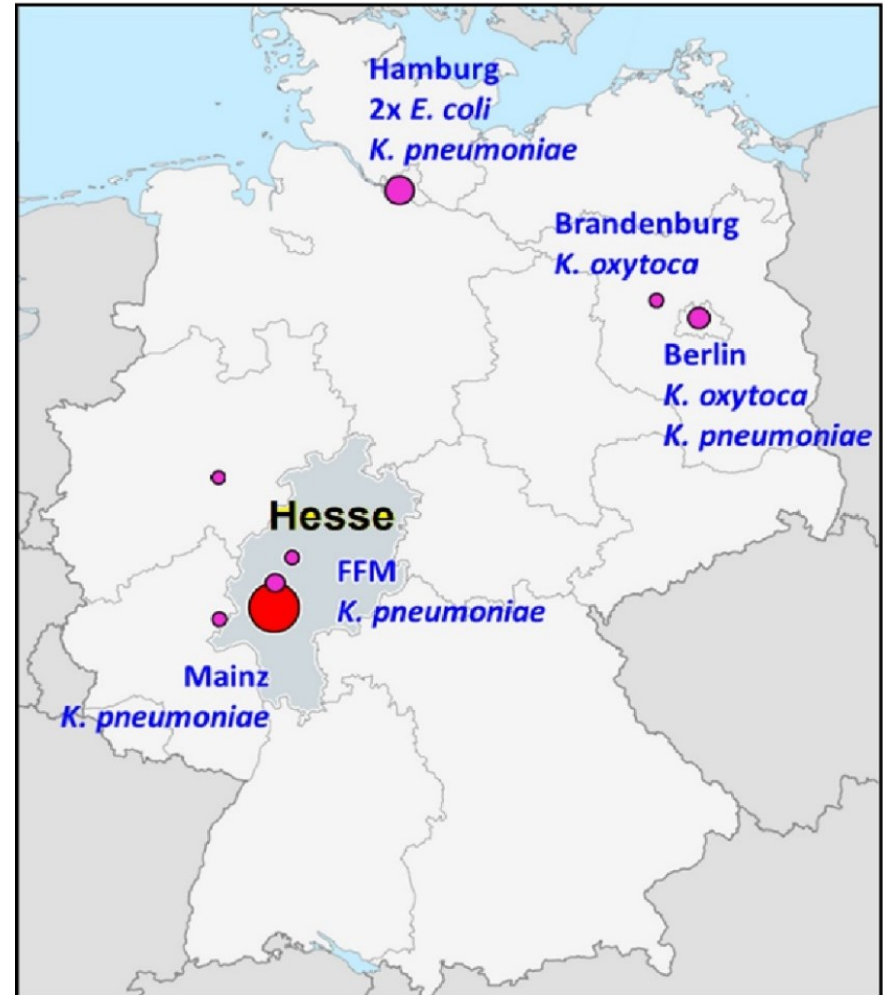
Muster 3



IncN/ST15/KPC-2 in Deutschland

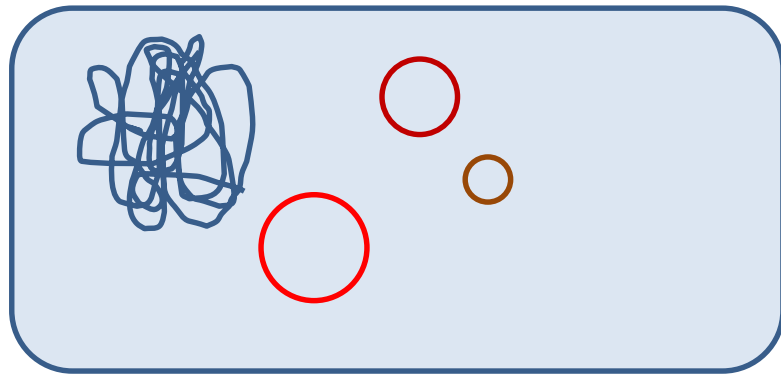
- PCR-Primer auf spezifischen Bereich des Plasmides
- NRZ für gramnegative Krankenhauserreger (Bochum) analysiert Isolate aus Stammsammlung

→ Weitere Isolate mit IncN/ST15/KPC-2-Plasmiden in Deutschland gefunden



Beispiel eines Extrem-resistenten Bakteriums

E. coli NRZ14408



3 Plasmide tragen 35 Antibiotika-Resistenzgene gegen
9 Antibiotikaklassen

Antibiogramm:

Antibiotikaklasse	Phenotyp	Bemerkung
Penicilline	R	
Carbapeneme	R	
Fluorchinolone	R	
Monobactame	R	
Colistin	R	
Rifampicin	R	
Sulfonamide	R	
Phenicol	R	
Trimethoprim	R	
Aminoglykoside	R	Sensitiv gegen Amikacin
Tetrazyklin	R	Sensitiv gegen Tigecyclin
Fosfomycin	S	

Projekt „SurvCARE“

Genombasierte Charakterisierung Carbapenemase-Produzenten in Hessen (2017-2019)

- Initiiert von Koordinator der hessischen MRE-Netzwerke Dr. Michael Frowein (HLfGP, damals HLPUG)
- Koordiniert durch MRE-Netzwerk Mittelhessen
- Anzahl untersuchter 4MRGN-Isolate: 567

Beteiligte:

- HLfGP (damals HLPUG)
- MRE-Netzwerke Hessen
- Hessische Krankenhäuser (n= 61) und Praxen (n=15)
- Medizinische Mikrobiologie JLU Gießen



Zusammenfassung

- Resistenzübertragung kann klonal oder über horizontalen Gentransfer stattfinden
 - ESBL-Klon (*E. coli* ST410/CTX-M-15) in unterschiedlichen One Health Kompartimenten detektiert
 - IncN/ST15/KPC-2-Plasmid in Hessen weit verbreitet
- Genomsequenzierung bietet hohe Auflösungskraft
 - Auflösung auf Einzelnukleotid-Ebene (SNPs)
 - Long read Sequenzierung für Detektion Plasmid-basierter Ausbrüche geeignet

Danksagung

HLfGP Dillenburg

- Dr. Michael Frowein
- Dr. Anja Hauri
- Dr. Petra Heinmüller
- Gudrun Bettge-Weller
- Susanne Winter
- Bettina Scholl
- Vera Martin
- Jana Lotz

MRE-Netzwerk Mittelhessen

- Dr. Martin Just

NRZ Gramnegative Krankenhauserreger Bochum

- Prof. Dr. Sören Gatermann
- Dr. Martin Kaase
- Dr. Niels Pfennigwerth

... den hessischen MRE-Netzwerken

... allen Teilnehmern der Studie!

... Kolleginnen und Kollegen aus RESET und DZIF!

DSMZ

- Prof. Dr. Jörg Overmann
- Dr. Boyke Bunk
- Dr. Cathrin Spröer

Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen

- Prof. Trinad Chakraborty
- PD Dr. Can Imirzalioglu
- Prof. Dr. Eugen Domann
- Dr. Yancheng Yao
- Dr. Jane Falgenhauer
- Christina Gerstmann

Bioinformatik und Systembiologie, JLU Gießen

- Prof. Dr. Alexander Goesmann
- Dr. Oliver Schwengers
- Dr. Rolf Hilker

HESSEN



Hessisches Ministerium
für Soziales und Integration



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung

**VIELEN DANK FÜR IHRE
AUFMERKSAMKEIT!**

