

SurvCARE Hessen – Ein Projekt der genomischen Surveillance

(Surveillance Carbapenem-resistenter gramnegativer Erreger in Hessen)



JUSTUS-LIEBIG-
 UNIVERSITÄT
GIESSEN

 **DZIF**
German Centre for Infection Research

Jane Falgenhauer

Institut für Hygiene und Umweltmedizin/
Institut für Medizinische Mikrobiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen
Deutsches Zentrum für Infektionsforschung

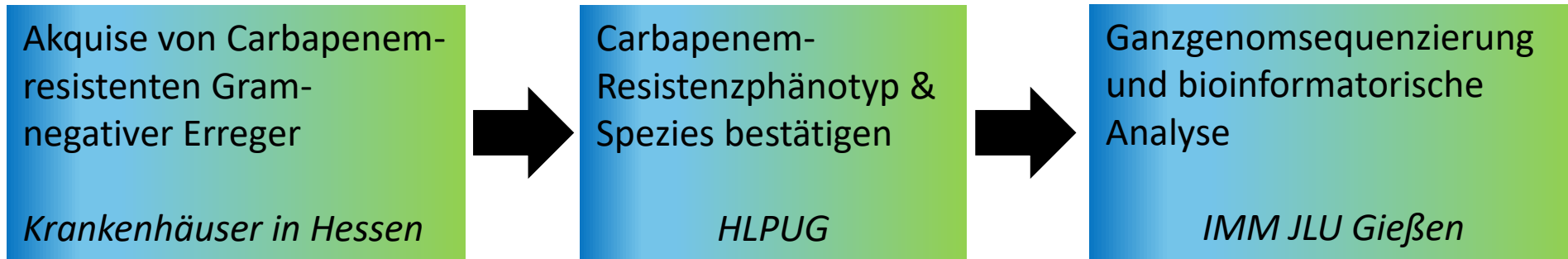
SurvCARE – Surveillance Carbapenem Resistenter Enterobakterien: Eine Pilotstudie zu Carbapenem-resistenten Isolaten in Hessen



Eine Zusammenarbeit von

HLPUG /Jetzt HfGP
Institut für Medizinische Mikrobiologie Gießen
Hessische Kliniken
Ministerium für Soziales und Integration
Hessische MRE-Netzwerke

2017-2019



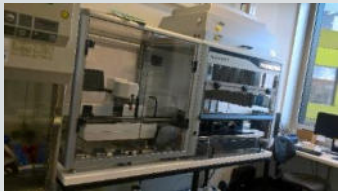
- **Insgesamt Genom-Sequenzierung von 661 Carbapenem-resistenten Isolaten**
- **Im Verlauf Erstellung spezifischer schneller Befunde für Einsender/ Epidemiologisches Assessment durch HLPUG z.B. zur Bewertung von Übertragung/ Ausbruch**
→ Hochauflösender Vergleich von Carbapenem-resistenten Isolaten in Hessen mittels Genomsequenzierung

Ganzgenomsequenzierung - Infrastruktur am Institut für Medizinische Mikrobiologie

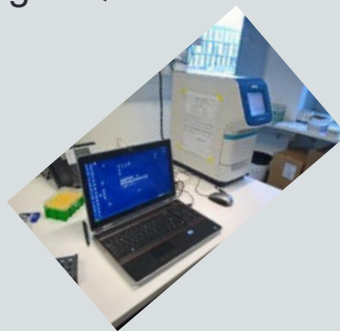
Infrastruktur für automatisierte Vorbereitung der Sequenzierung

Pipettierroboter für

- Automatisierte DNA-Isolation
- Automatisierte Library Preparation
- Automatisierte Kultivierung von Bakterien



DNA/RNA Quantifizierung & Qualitätskontrolle



NGS-Sequencing Facility

Short-read



MiSeq



NextSeq



NovaSeq

Long-read



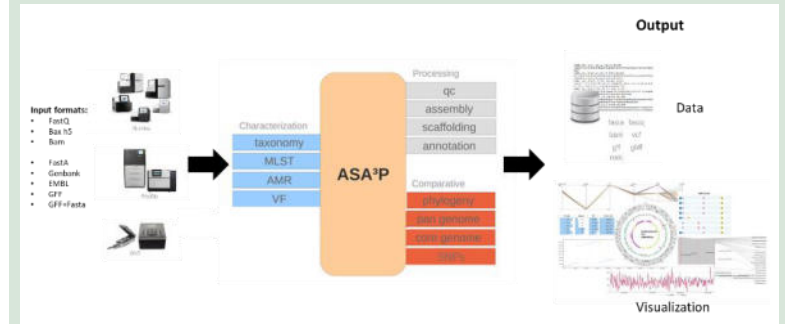
MinION



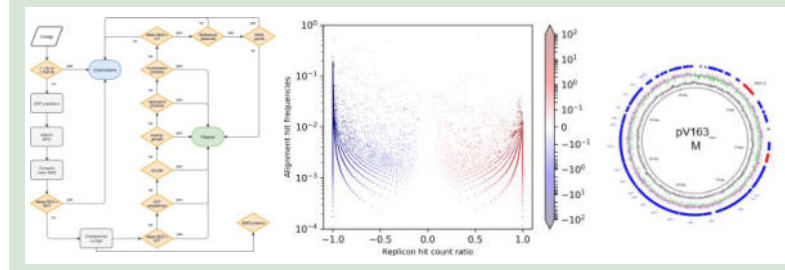
Sequel II

Entwicklung von bioinformatischen Post- Sequencing Analyse-Tools

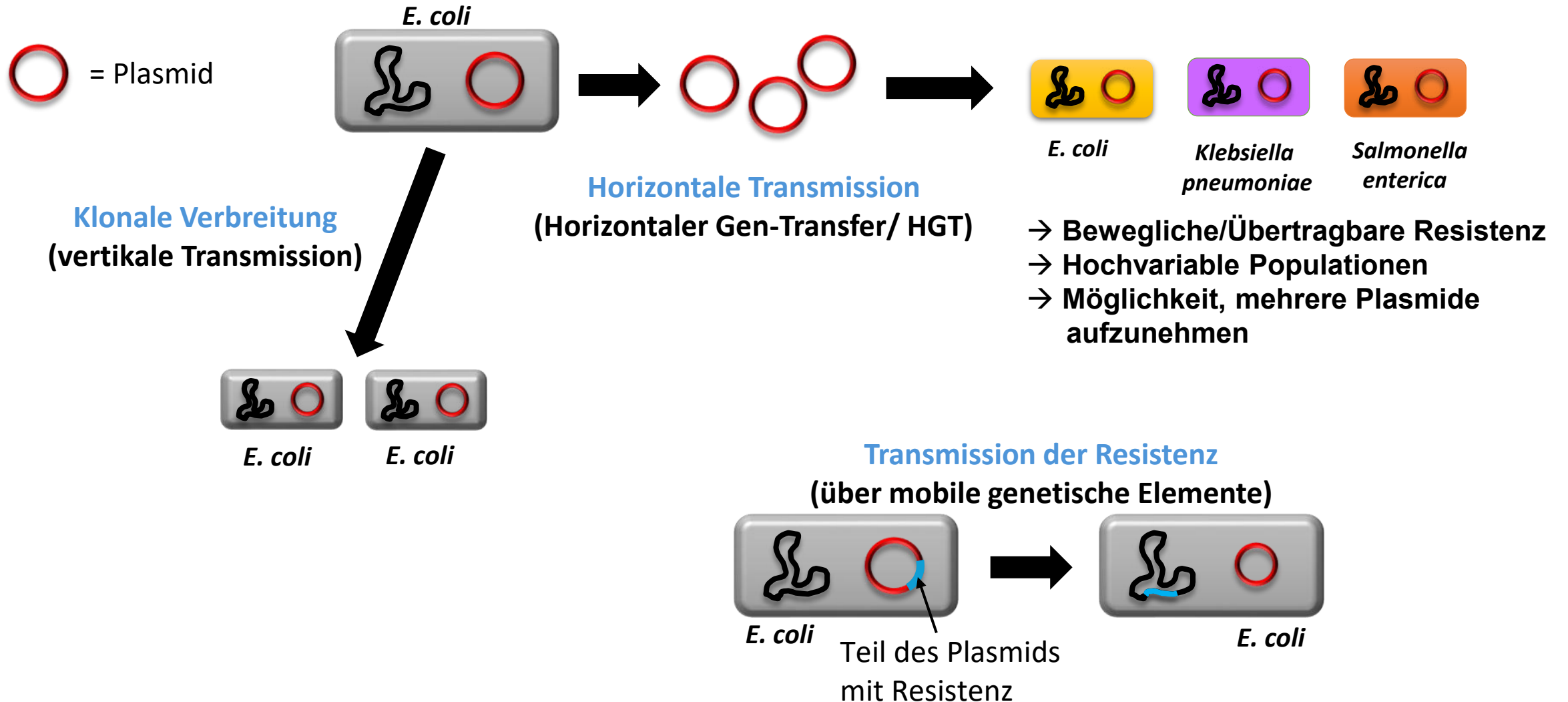
ASA³P



PLATON



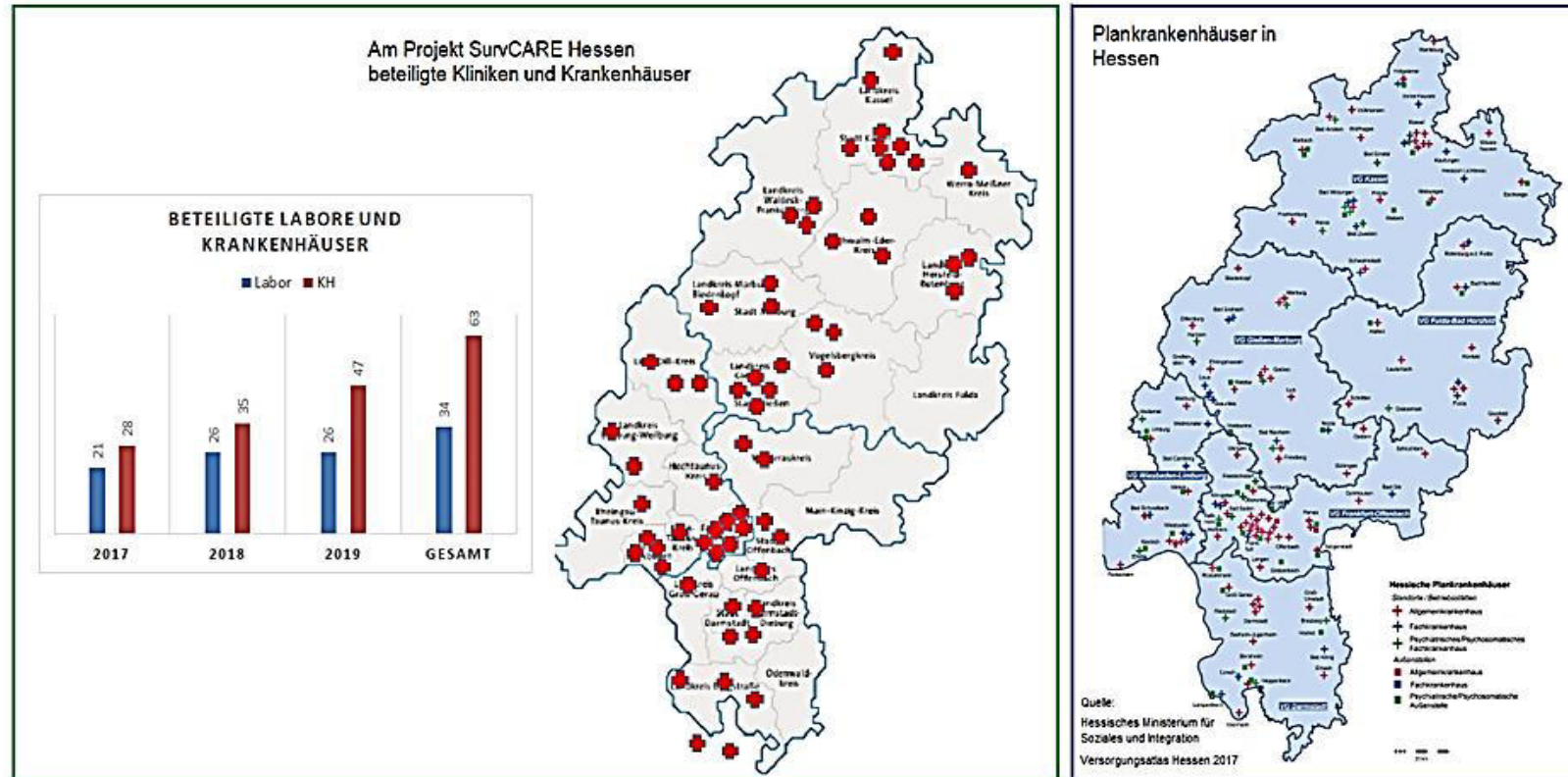
Grundlagen: Mobilom-lokalisierte Antibiotikaresistenzen sind unterschiedlich transferierbar



- allgemeine Ergebnisse der Studie
- Beispiele unterschiedlicher Übertragungen
- Epidemiologie und Ausbruchsuntersuchungen

SurvCARE Hessen

Einsender im Verlauf der Studie

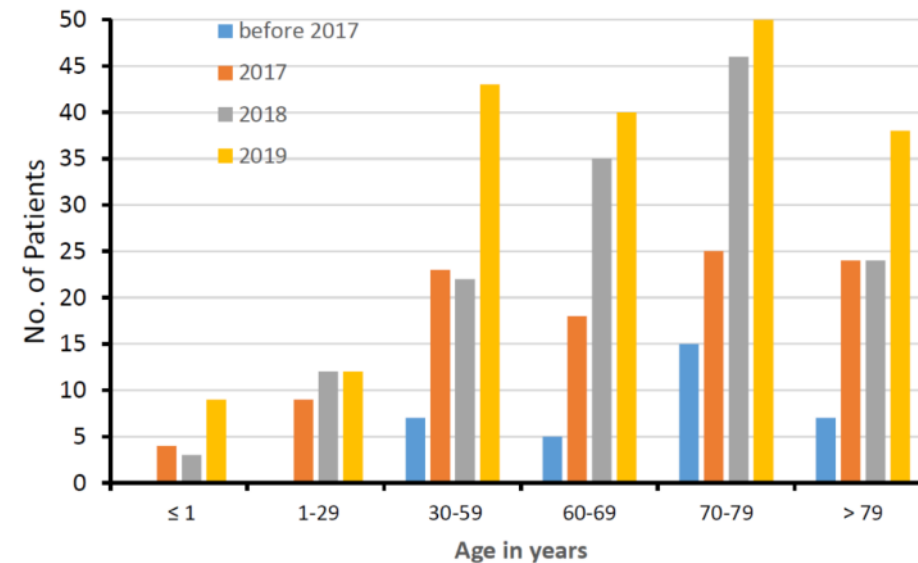
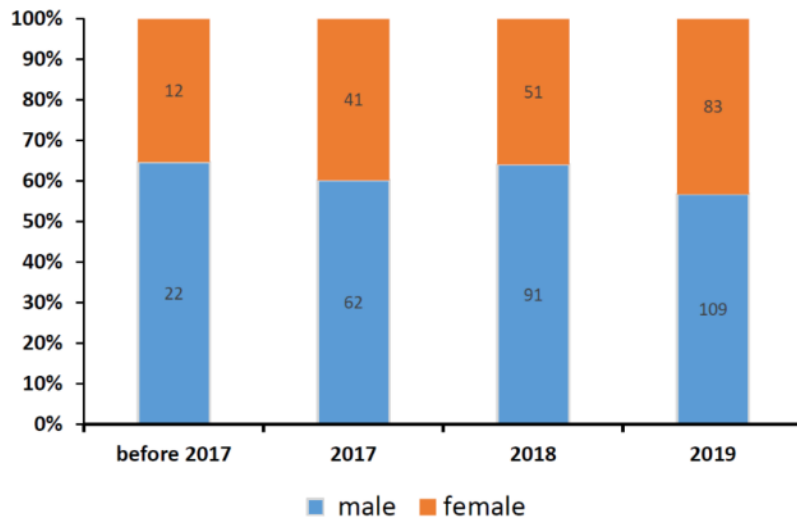


- zunehmende Anzahl an einsendenden Krankenhäusern und Praxen im Verlauf der Studie (2017-2019)
- Insgesamt großer Teil der Krankenhäuser beteiligt

SurvCARE Hessen

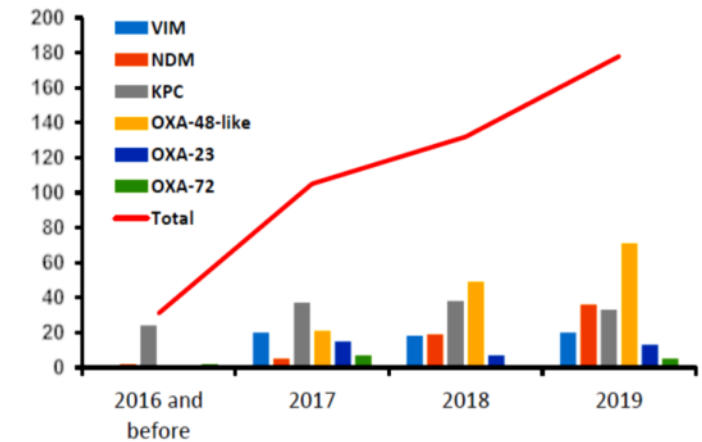
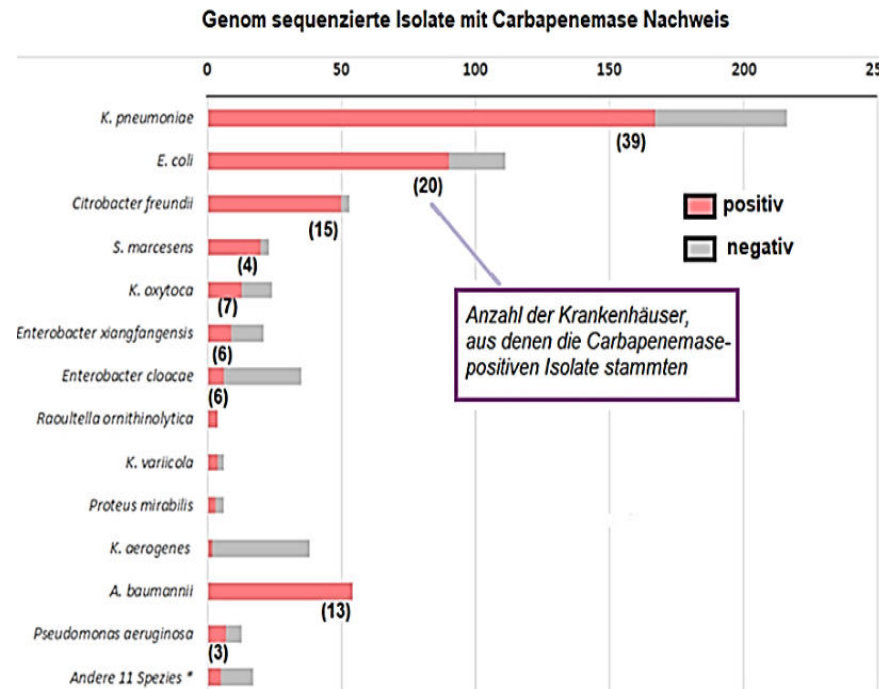
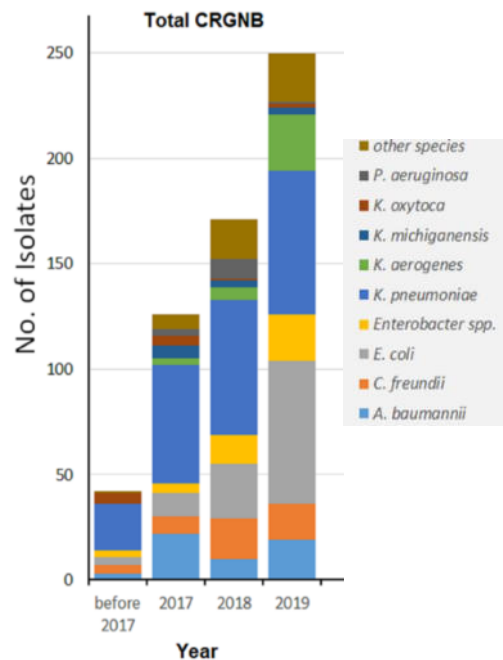
Patienten und Isolate

- Die Anzahl der **eingesendeten Isolate** ist kontinuierlich von **135 in 2017** auf **300 in 2019** angestiegen
- Insgesamt wurden im Laufe der Projektzeit **661 Isolate** eingesendet. Hiervon stammen **392 Isolate von männlichen** und **248 von weiblichen Patienten**. Die Verteilung der Isolate nach Geschlecht (m:w) ist somit 61%:39%.
- Weitere **12 Isolate** stammen aus **der Umwelt bzw. der Krankenhausumgebung** und 9 Isolate sind bisher ohne Quellenangabe.

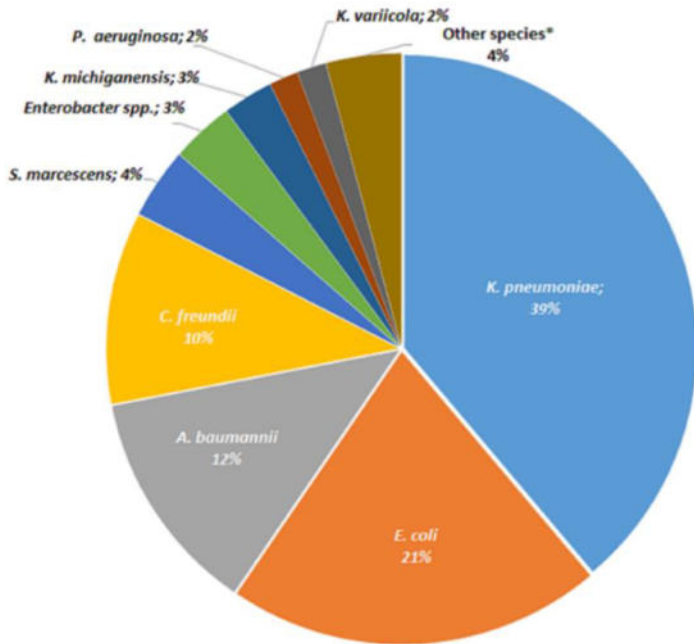


SurvCARE Hessen Isolate und Spezies

- Etwa **15%** der Isolate stammen von Patienten mit **gesicherter Infektion** und **85%** aus Patienten ohne Infektionssymptome (Bakterien-Besiedlung/ **Kolonisierung**).
- Die Spezies *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter spp.* und *Enterobacter spp.* sind die häufigsten unter den insgesamt **24 identifizierten unterschiedlichen Spezies** und nehmen einen Anteil von ca. 80% ein, mit unterschiedlichem Anteil an Carbapenemasen.

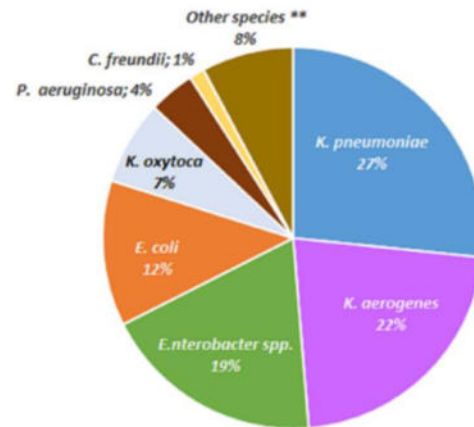


SurvCARE Hessen Spezies und Carbapenemase-Typen



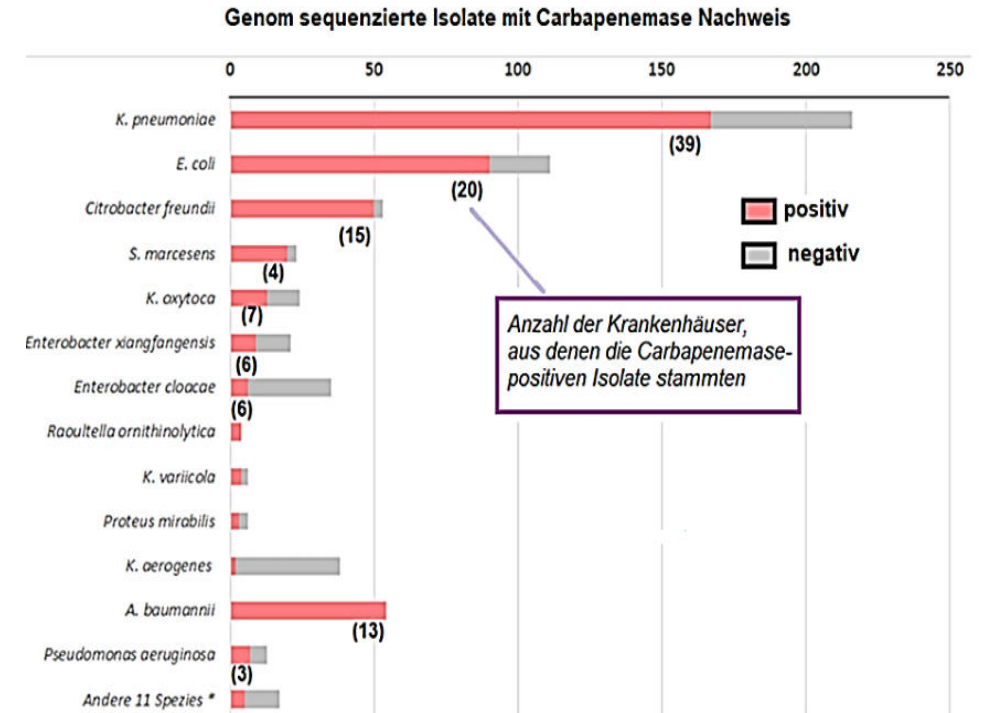
* *C. braakii*, *C. koseri*, *C. portucalensis*, *K. oxytoca*, *K. aerogenes*, *Proteus mirabilis*, *R. ornithinolytica* and *R. planticola*.

Carbapenemase-producing CRGNB



** *A. pittii*, *Cedecea lapagei*, *K. variicola*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri*, *Pseudomonas stutzeri* and *S. marcescens*

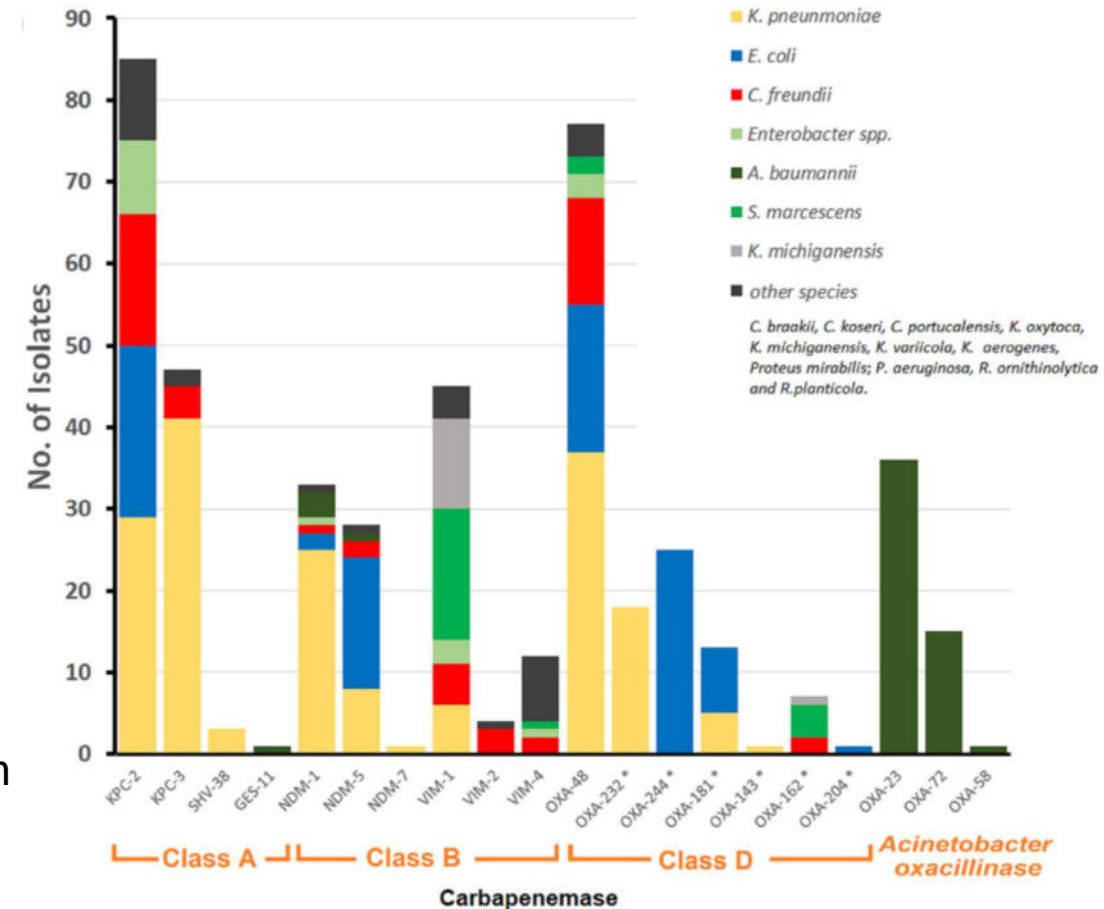
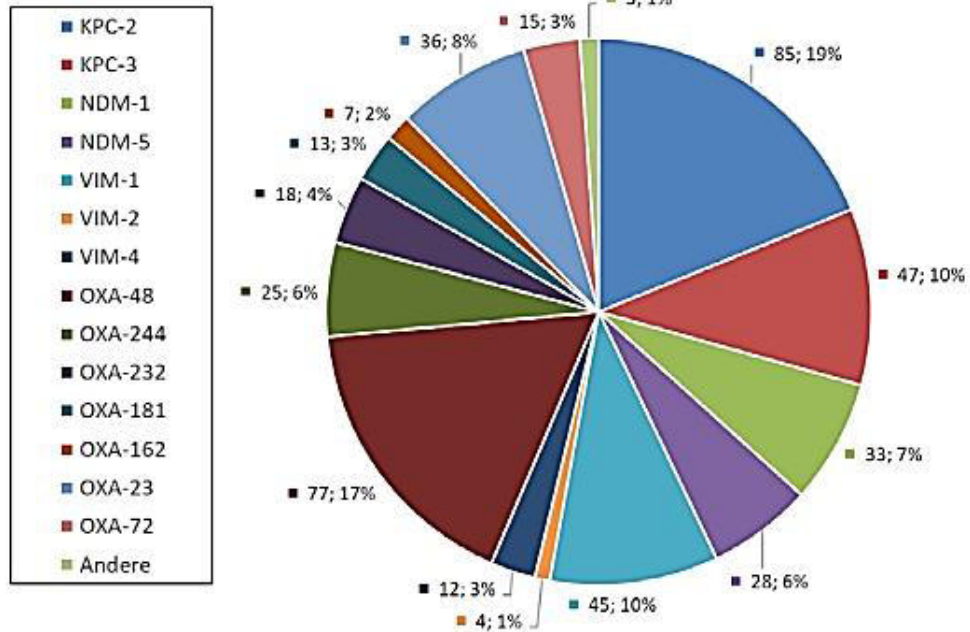
Non-carbapenemase-producing CRGNB



Bei insgesamt **24,3%** der eingesendeten Isolate wurden in ihren Genomen **keine derzeit bekannten Carbapenemase-kodierenden Gene identifiziert** (v.A. *K. aerogenes* und *Enterobacter spp.*)

→ Größtenteils werden Mutationen im Zusammenhang mit Efflux-Pumpen als Ursache für Carbapenem-Resistenz ohne nachgewiesene Carbapenemase vermutet

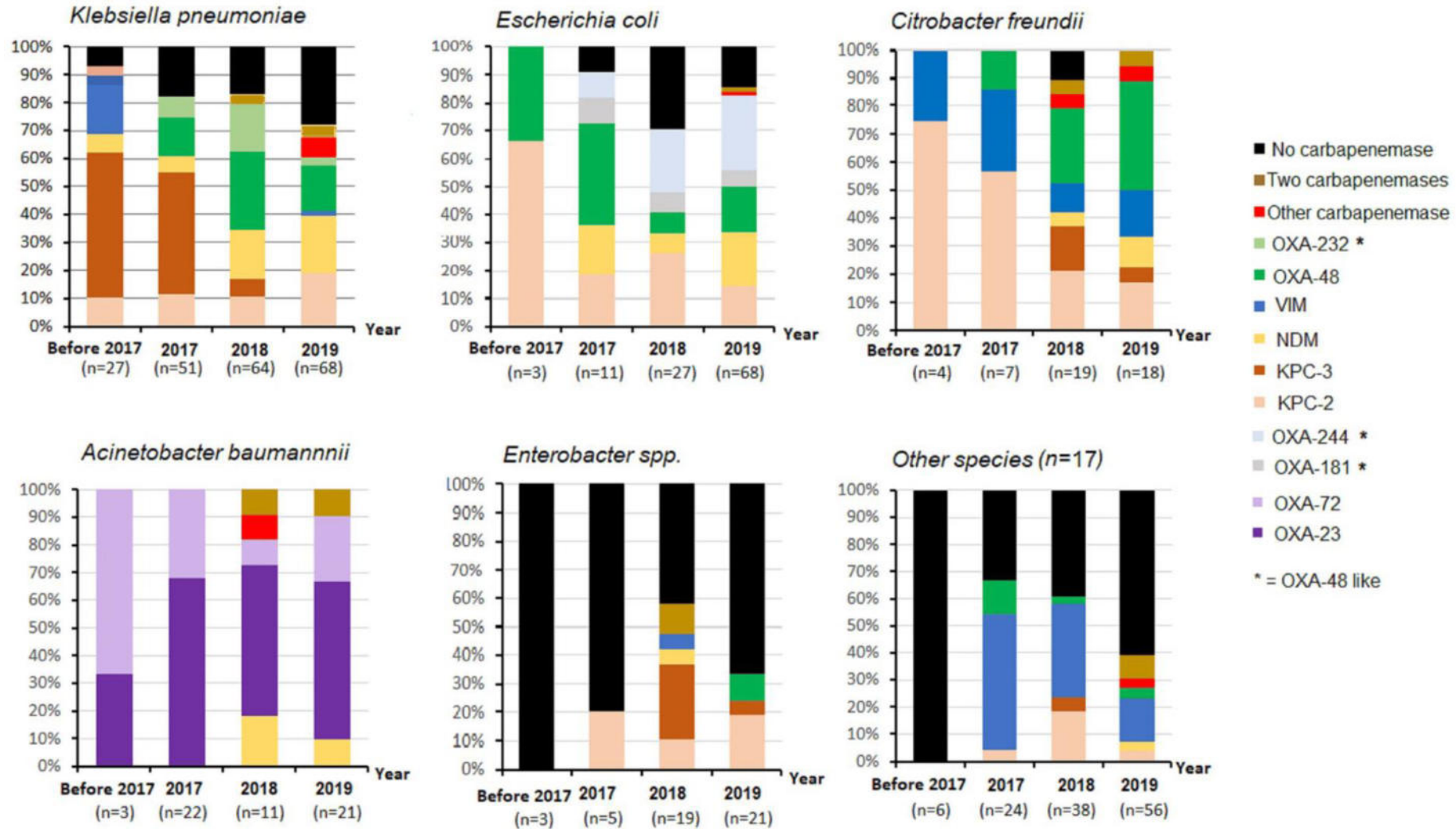
Identifizierte Carbapenemase-kodierende Gene



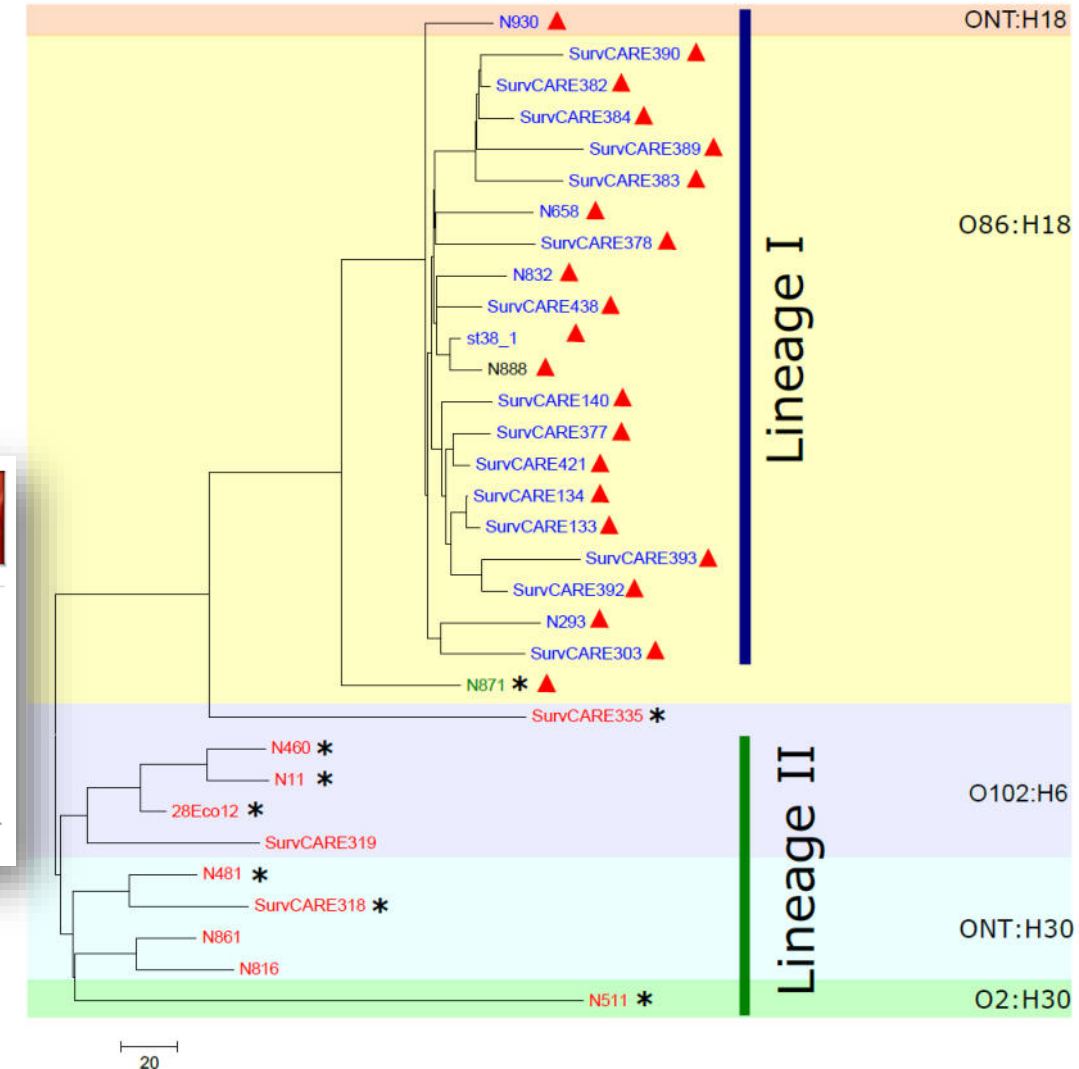
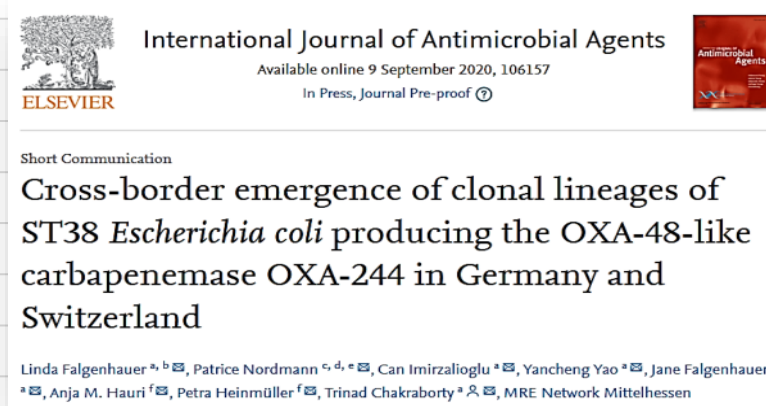
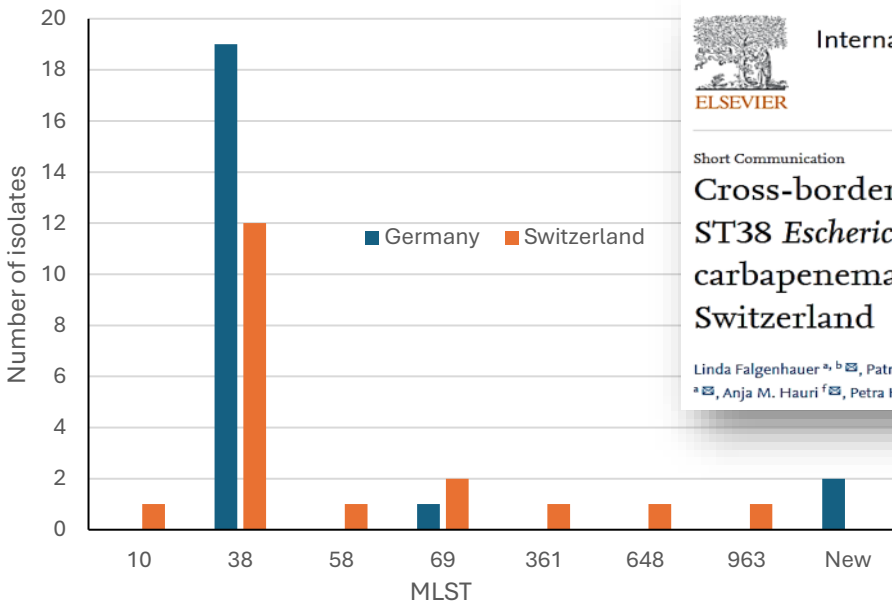
- Den größten Anteil der nachgewiesenen Carbapenemasen bilden KPC-2 und OXA-48
- Im Verlauf der Studie nehmen OXA-48(-like) Carbapenemasen zu
- Manche Carbapenemasen sind spezifisch in bestimmten Spezies zu finden

SurvCARE Hessen

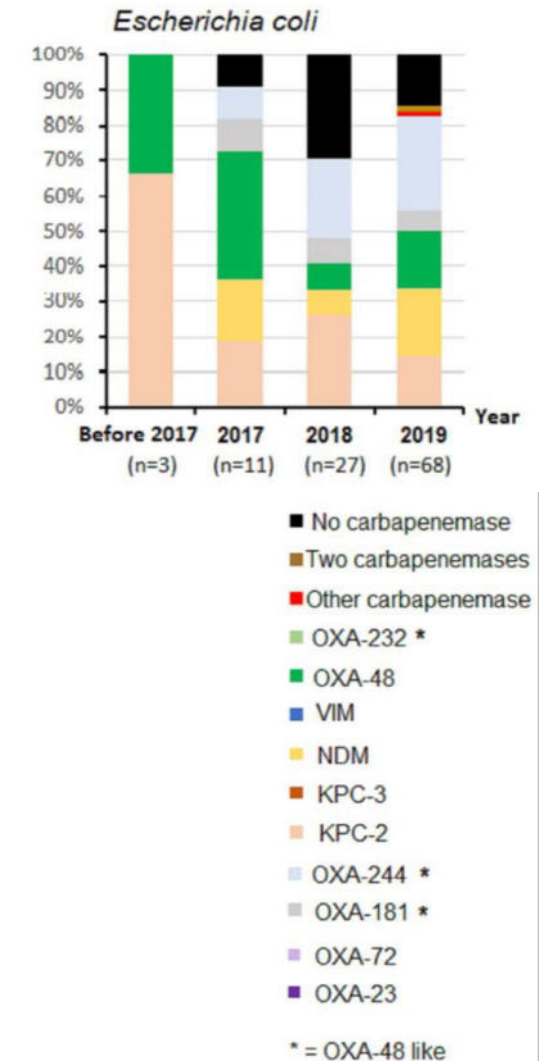
Carbapenemases und Spezies



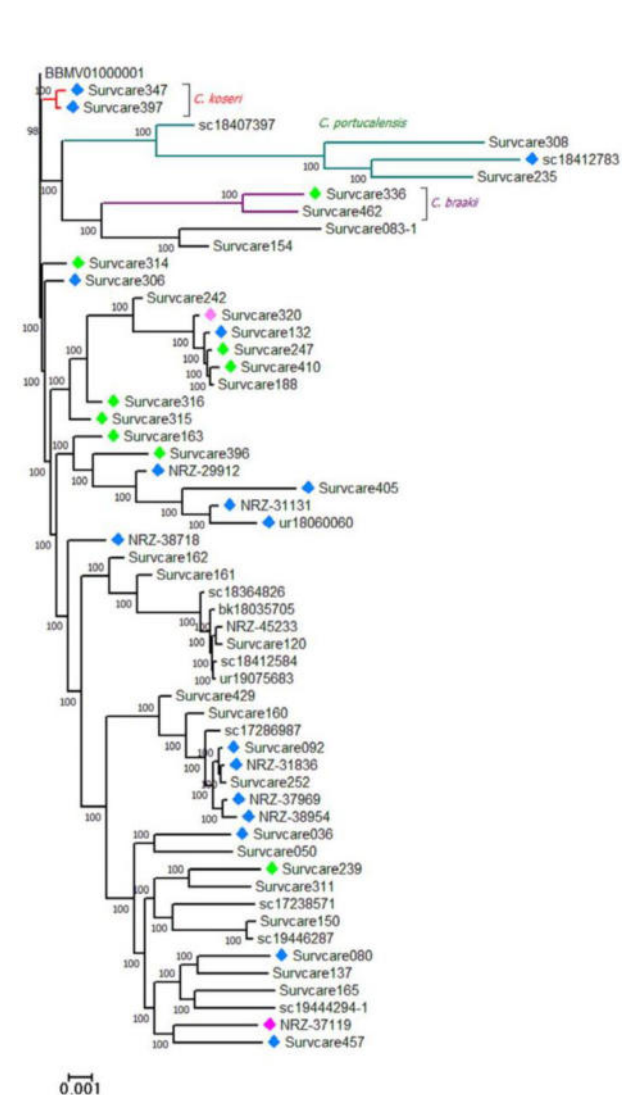
- Beobachtung: zunehmender Anteil an *E. coli* mit OXA-244 im Verlauf der Studie, größtenteils ST38
- gleichzeitig Nachweis in einer Studie in Zusammenarbeit mit einem Schweizer Institut
- zwei unterschiedliche Varianten von ST38 OXA-244 Isolaten:
 - chromosomal lokalisierte OXA-244 Carbapenemase und CTX-M-27 Betalaktamase (Lineage I)
 - chromosomal lokalisierte OXA-244 Carbapenemase und CTX-M-14 auf einem IncF-Plasmid (Lineage II)



- Die Fähigkeit von OXA-244, Carbapeneme zu hydrolysieren ist schwächer als OXA-48
 - In konventionellen Resistenztestungen kann diese Resistenz zunächst nicht detektierbar sein, würde im Falle einer Therapie aber zum Tragen kommen
 - Risiko, dass Erreger mit solchen Carbapenemasen in Screening- oder Surveillance-Konzepten initial nicht detektiert werden und sich somit still weiter verbreiten können
 - Fazit: In der Praxis würde ein zuvor sensibles Isolat unter Therapie auf einmal Carbapenem-resistent erscheinen. Dies hat mit der Expression der Carbapenemase zu tun, welche sich an den Selektionsdruck "adaptiert", in diesem Fall hochreguliert.
 - Auch eine Therapie mit Cephalosporinen oder anderen Betalaktamen würde den Selektionsdruck für diese Isolate erhöhen (zusätzliche CTX-M-Betalaktamase im Genom), statt nur Carbapeneme (OXA-244 Carbapenemase alleine)
- Gründe für die steigenden Zahlen im Laufe der Studie, und den gleichzeitigen Nachweis in unterschiedlichen Ländern



SurvCARE Hessen *Citrobacter* spp.



Beta-lactamase genes

MLST	Carbapenemase	CMY-Allele	CTX-M	TEM-1B	OXA-1	Other
ND						CKO-1
ND						MAL-1
232		CMY-13				SHV-12
408		CMY-2	CTX-M-15			
Unknown		CMY-77				
96		CMY-46				
ND		CMY-83				
ND		CMY-74				
97						CFE-1
New 1						CFE-1
488		CMY-76	CTX-M-3			
107		CMY-48	CTX-M-15		OXA-10	SHV-12
19		CMY-41				
19		CMY-41				
19		CMY-41				
19		CMY-41	CTX-M-3			
19		CMY-41	CTX-M-3			SHV-31
19		CMY-41				
19		CMY-41				SHV-12
New 2		CMY-65	CTX-M-15			
91		CMY-65	CTX-M-15			
98		CMY-84				
111		CMY-65				
98		CMY-84				
98		CMY-84				
114		CMY-48				
18		CMY-79				
18		CMY-79				DHA-1
18		CMY-79, CMY-16			OXA-10	
18		CMY-79, CMY-16			OXA-10	DHA-1
18		CMY-79	CTX-M-1		OXA-10	DHA-1
18		CMY-79			OXA-10	DHA-1
18		CMY-79, CMY-16			OXA-10	
22		CMY-48				DHA-1
22		CMY-48	CTX-M-9			
22		CMY-48	CTX-M-9			
22		CMY-48				
22		CMY-48				
22		CMY-48				
22		CMY-48	CTX-M-9			
116		CMY-65				DHA-1
8		CMY-79	CTX-M-15			
112		CMY-75				
New 3		CMY-75				
New 4		CMY-51	CTX-M-9			SHV-12
396		CMY-78		TEM-2		
396		CMY-78			OXA-17	
256		CMY-51				
New 5		CMY-65				
New 6		CMY-48				
540		CMY-79	CTX-M-15			
New 7		CMY-79				
327		CMY-48	CTX-M-15			

Predicted plasmid types that encoded the carbapenemases

- ◆ IncN(pMLST-15): KPC-2
- ◆ IncL/M(pOXA-48): OXA-48
- ◆ IncN(pMLST-7): VIM-1
- ◆ IncN(pMLST-7)-like: VIM-1

Carbapenemase types

- OXA-48
- OXA-48 like
- KPC-2
- KPC-3
- NDM-5
- NDM-7
- VIM-1
- VIM-2 /4
- Two types
- None

Other beta-lactamase genes

- present
- not present

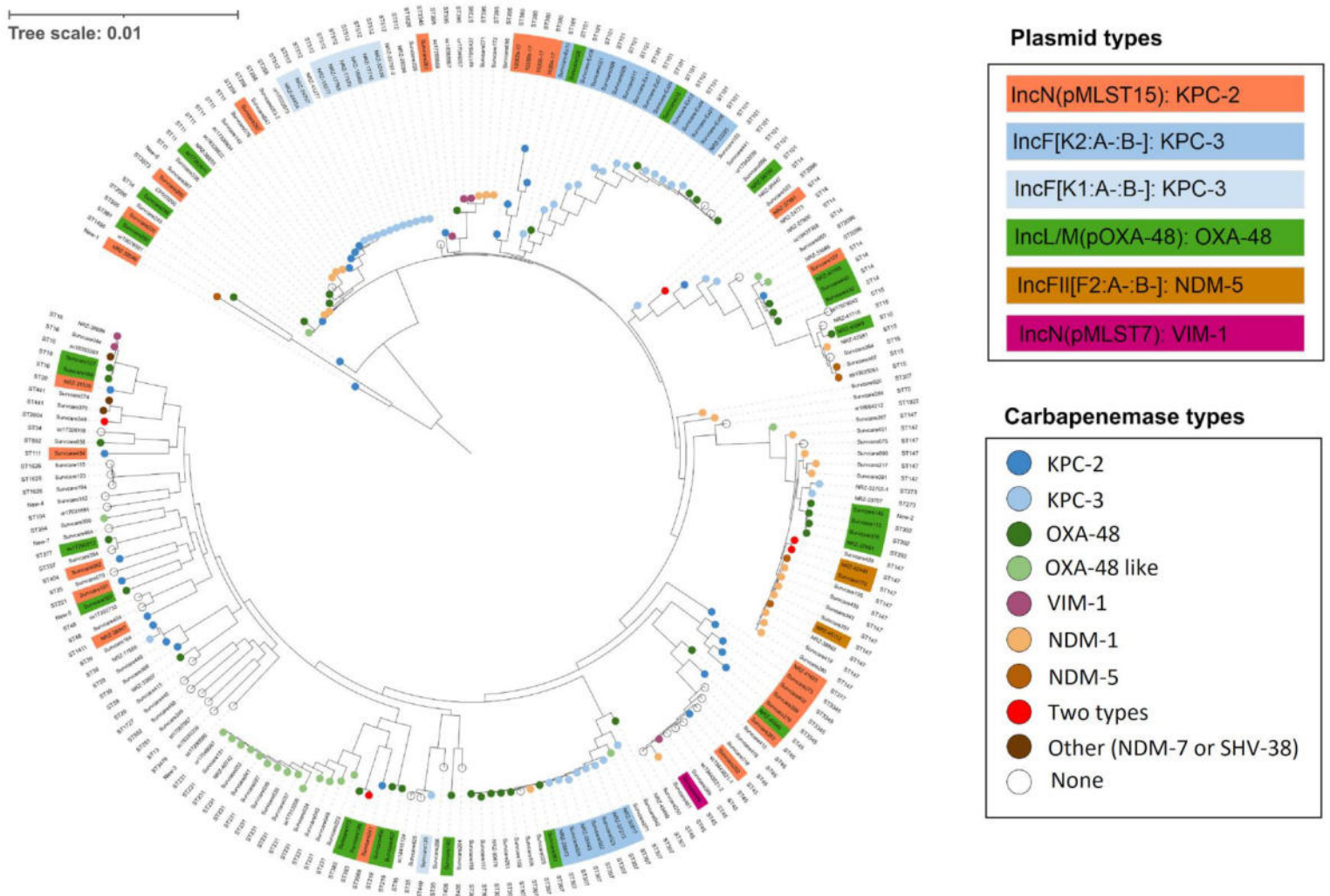
- Andere Verteilung an Carbapenemasen als bei *E. coli*, größtenteils mit Plasmiden assoziiert

- Bekanntes IncN(pMLST-15) Plasmid mit KPC-2 Carbapenemase über den Stammbaum verteilt nachgewiesen (auch verschiedene Spezies)

SurvCARE Hessen

K. pneumoniae Überblick

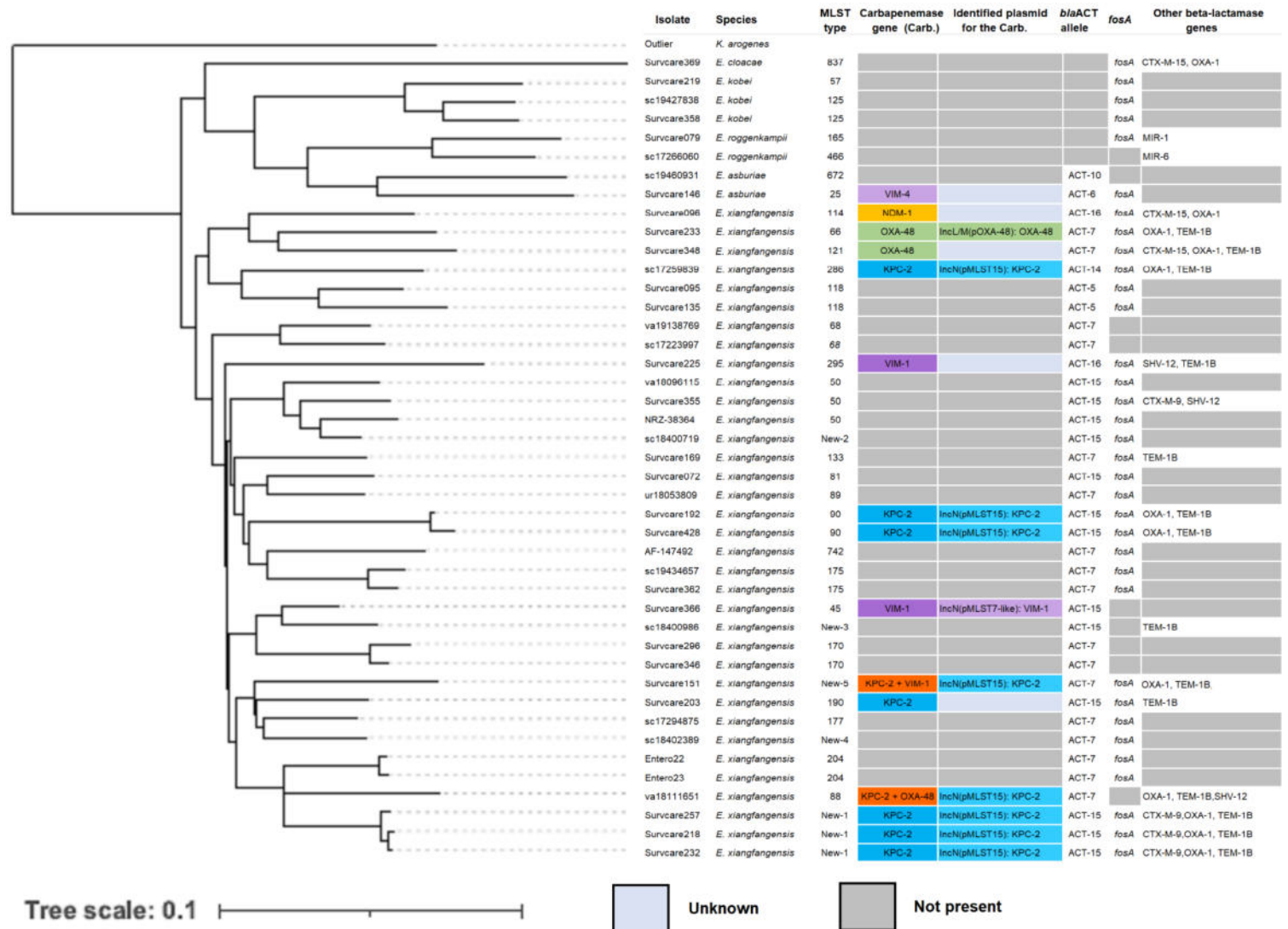
- Teilweise klonale Übertragung der Carbapenemase erkennbar, teilweise Plasmidübertragung
- Bekanntes IncN(pMLST-15) Plasmid mit KPC-2 Carbapenemase ebenfalls über den Stammbaum verteilt nachgewiesen



SurvCARE Hessen

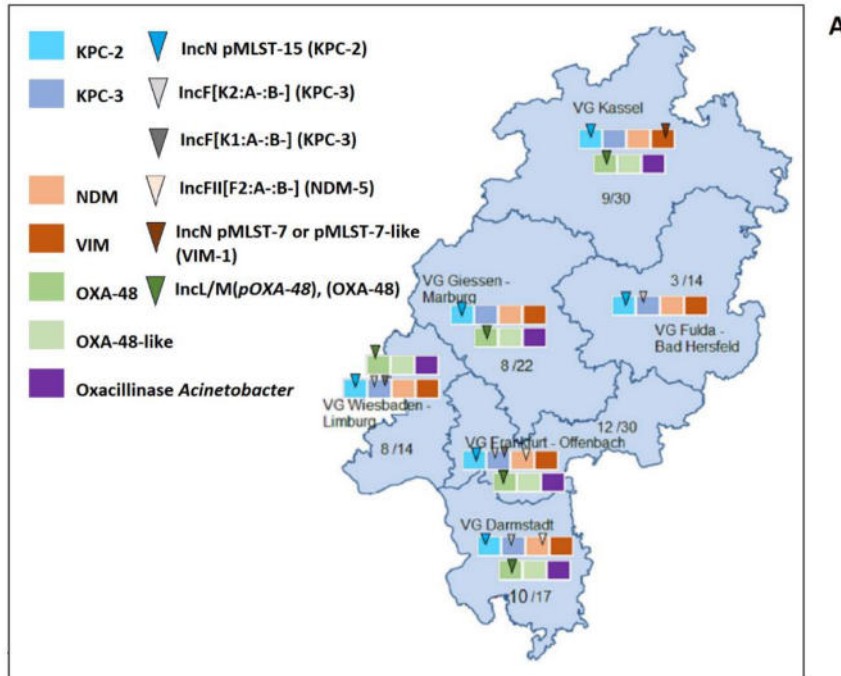
Enterobacter spp. Überblick

- Teilweise klonale Übertragung der Carbapenemase erkennbar, teilweise Plasmidübertragung
- Bekanntes IncN(pMLST-15) Plasmid mit KPC-2 Carbapenemase ebenfalls über den Stammbaum verteilt nachgewiesen
- *Enterobacter* spp. in SurvCARE bilden eine relativ heterogene Population mit wenigen klonalen Übertragungen



SurvCARE Hessen

Epidemiologie der Plasmide



B

Plasmid	Carbapenemase	No. of isolates and (%)	Bacterial host												No. of Hospitals	Health care area (VG)									
			Kpn	Eco	Cfr	Cko	Cpo	Exi	Ecl	Kva	Ron	Rpl	Kml	Sma		Cbr	KA	FB	GM	FO	WL	DA			
IncN pMLST-15	KPC-2	74 (86)	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
IncN pMLST-7	VIM-1	10 (22)	■		■									■	■				■						
IncN pMLST-7-like	VIM-1	17 (38)			■			■					■						■						
IncL/M (pOXA-48)	OXA-48	43 (56)	■	■	■			■			■				■	■		■	■	■	■	■	■	■	■
IncF [K2:A-B-]	KPC-3	15 (32)	■*															■	■	■	■	■	■	■	■
IncF [K1:A-B-]	KPC-3	9 (19)	■**																■	■					
IncFII [F2:A-B-]	NDM-5	5 (18)	■***	■															■	■					■

*, ST101 and ST307
**, ST512 and ST449
***, ST147; #, ST361

- Verteilung der Plasmide ist auch regional unterschiedlich, zum Teil werden Plasmide nur in einer Region nachgewiesen, oder sind „überall“ zu finden
- Auch die Verteilung der Plasmide auf die unterschiedlichen Spezies ist Plasmid-spezifisch, zum Teil nur Nachweis in 1-2 Sequenztypen einer Spezies

SurvCARE Hessen

Epidemiologie der Isolate und Plasmide

Cluster No.	Species	MLST	Carbapenemase-Gene	Other common beta-lactamase-genes	No. of Isolates	Districts and Hospital ID																																									
						0	0a	KA						GM						WL						FO						DA						FB									
1	2	3	4	20	31	32	6	27	28	29	30	38	5	14	16	22	23	36	7	10	11	13	15	17	21	24	33	34	35	8	9	12	18	25	26	37	19	39									
1	<i>Kpn</i>	14	OXA-48	TEM-1	4																																										
2	<i>Kpn</i>	14	KPC-3	SHV-1	3																																										
3	<i>Kpn</i>	39	KPC-2	TEM-1	3																																										
4	<i>Kpn</i>	101	KPC-3	SHV-1	15																																										
5	<i>Kpn</i>	101	OXA-48	SHV-1, TEM-1A	5																																										
6	<i>Kpn</i>	147	NDM-1	SHV-11, TEM-1	11																																										
7	<i>Kpn</i>	147	OXA-181	SHV-11, TEM-1	3																																										
8	<i>Kpn</i>	147	NDM-5		4																																										
9	<i>Kpn</i>	231	OXA-232	CTX-M-1, TEM-1	14																																										
10	<i>Kpn</i>	258	KPC-2	SHV-11	4																																										
11	<i>Kpn</i>	307	KPC-3	CTX-M-15, SHV-28	8																																										
12	<i>Kpn</i>	307	OXA-48	CTX-M-14b, SHV-28	7																																										
13	<i>Kpn</i>	380	KPC-2	SHV-1, TEM-1	3																																										
14	<i>Kpn</i>	392	OXA-48	CTX-M-15, SHV-11, TEM-1	3																																										
15	<i>Kpn</i>	395	VIM-1	CTX-M-15, SHV-11	3																																										
16	<i>Kpn</i>	395	NDM-1	SHV-11	3																																										
17	<i>Kpn</i>	512	KPC-3	SHV-11	11																																										
18	<i>Kpn</i>	2096	OXA-232	CTX-M-15, SHV-28, TEM-1A	3																																										
19	<i>Kpn</i>	3345	KPC-2	SHV-27, TEM-1	5																																										
20	<i>Eco</i>	38	OXA-244	CTX-M-27/14	19																																										
21	<i>Eco</i>	38	OXA-48	CTX-M-24/14, TEM-1	8																																										
22	<i>Eco</i>	69	KPC-2	TEM-1	6																																										
23	<i>Eco</i>	58	KPC-2	TEM-1	3																																										
24	<i>Eco</i>	1284	NDM-5		3																																										
25	<i>Eco</i>	3268	OXA-181	CTX-M-15, TEM-1B	3																																										
26	<i>Cfr</i>	18	KPC-2	CMY-84, OXA-1, TEM-1	3																																										
27	<i>Cfr</i>	18	KPC-3	CMY-16, CMY-79, OXA-10	4																																										
28	<i>Cfr</i>	18	OXA-48	CMY-79, TEM-1	3																																										
29	<i>Cfr</i>	19	OXA-48	CMY-41	3																																										
30	<i>Cfr</i>	22	KPC-2	CMY-48, TEM-1	4																																										
31	<i>Exi</i>	new*	KPC-2	ACT-15, CTX_M-9, TEM-1	3																																										
32	<i>Kmi</i>	213	VIM-1	OXY-1-3	6																																										
33	<i>Kmi</i>	205	VIM-1	OXY-1-1	3																																										
34	<i>Pmi</i>		VIM-1 + VIM-4	CTX-M-15	3																																										
35	<i>Sma</i>		VIM-1	SRT-2	16																																										
36	<i>Sma</i>		VIM-1 + OXA-162		3																																										
37	<i>Aba</i>	2	OXA-23	ADC-25	26																																										
38	<i>Aba</i>	636	OXA-72	ADC-25	12																																										

SurvCARE Hessen

Zusammenfassung und Implikationen

- Das Projekt SurvCARE Hessen bot eine einzigartige Möglichkeit, Carbapenemasen auf der Genomebene nachzuverfolgen
- Es konnten Übertragungscluster aufgedeckt werden, die mit konventionellen Methoden unbeachtet geblieben wären (z.B. Nachweis an unterschiedlichen Standorten, oder unterschiedliche Spezies und Plasmidübertragung der Carbapenemase)
- Andererseits konnten Übertragungen anhand der Bakteriengenome ausgeschlossen werden, wenn Isolate bezüglich Resistenz und Spezies aufgefallen waren
- Eine Unterscheidung in Übertragung über Plasmide oder klonale Übertragung kann sehr unterschiedliche „Gefahrenpotenziale“ der Carbapenemasen eröffnen (z.B. IncN(pMLST-15) Plasmid mit KPC-2 verbreitet sich schnell auf unterschiedliche Spezies)
- Eine genaue Bestimmung der Bakterien und der Carbapenemasen kann ebenfalls zu einer Bewertung des Risikos beitragen → *E. coli* ST38 mit OXA-244

Danksagung

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

- **Prof. Dr. Trinad Chakraborty (i.R.)**
- **PD Dr. Can Imirzalioglu**
- **Dr. Yancheng Yao**
- **Dr. Linda Falgenhauer**
- Prof. Dr. Eugen Domann
- Dr. Moritz Fritzenwanker
- Christina Gerstmann

Institut für Bioinformatik und Systembiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Das Nationale Referenzzentrum (NRZ) für gramnegative Krankenhauserreger (RU-Bochum)



Alle teilnehmenden Krankenhäuser und Gesundheitsämter in Hessen

Hessisches Landesprüfungs- und Untersuchungsamt im Gesundheitswesen, Dillenburg insbesondere:

- **Dr. Petra Heinmüller**
- **Dr. Anja Hauri**
- **Dr. Michael Frowein**

Hessisches Ministerium für Soziales und Integration

Die MRE Netzwerke In Hessen, insbesondere das MRE Netzwerk Mittelhessen



Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!