

# Rekonstruktion von Ausbreitungswegen resistenter Bakterien und ihrer Resistenzgene anhand von Ganzgenomdaten

Guido Werner  
Robert Koch Institut,

Berlin, BfR-Symposium, 08.-9.11.2018



# Gliederung

- **Einleitung**
- **Genom-basierte Erregersurveillance am Bsp. VRE**
- **NGS und Ausbruchsanalyse (VRE)**
- **Neue Resistenzmechanismen und NGS**
- **Sektor-übergreifende Verbreitung von Resistenzplasmiden am Bsp. CMY-2**



# Arbeiten mit Genomfragmenten



Next Gen Sequencing



3<sup>rd</sup>Gen. Sequencing/  
Single Molecule Sequencing

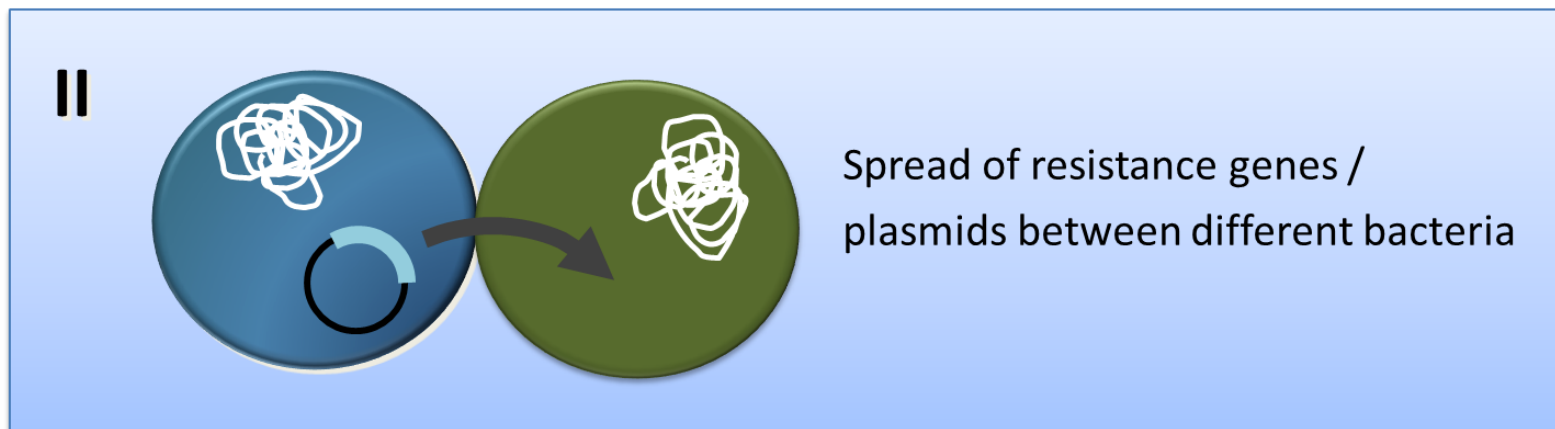
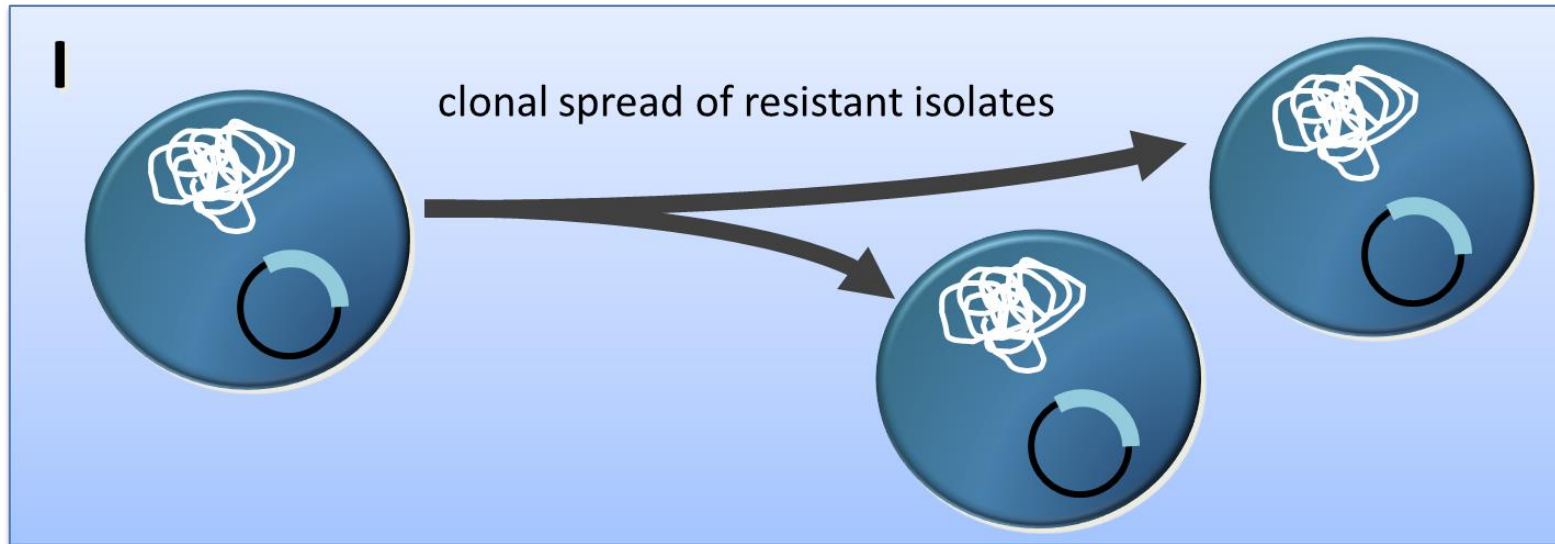


- **Gerätekosten**
- **Kosten pro Probe**
- **Hohe Fehlerrate**





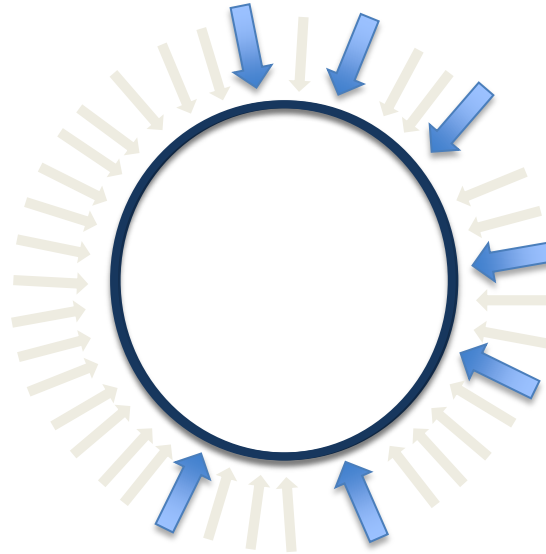
## Verbreitungswege von Antibiotikaresistenzen





## Typisierung basierend auf Genen bei Bakterien

MLST (7 loci)  
cgMLST (1423 loci)



- Typisierung anhand von **7 housekeeping Genen = MLST** (Multi-Locus-Sequence Typing)
- WGS erlaubt die Nutzung aller verfügbaren Gene eines „Kerngenoms“=  
**1423 Genes des sogenannten Kerngenoms = cgMLST**
- Kommerzielle Software existiert, die cgMLST Typen aus WGS Daten ableiten  
(Ridom SeqSphere+, BioNumerics/Applied Maths)



## *E. faecium*/VRE-Blutkulturisolate NRZ 2011- 2017 (n= 416)

= 31 MLST Typen (n= 9 mit >3x)

5 MLST Typen mit >5% und einer Häufigkeit von >85%:

**ST117 (43%)**

**ST203 (15%)**

**ST080 (11%)**

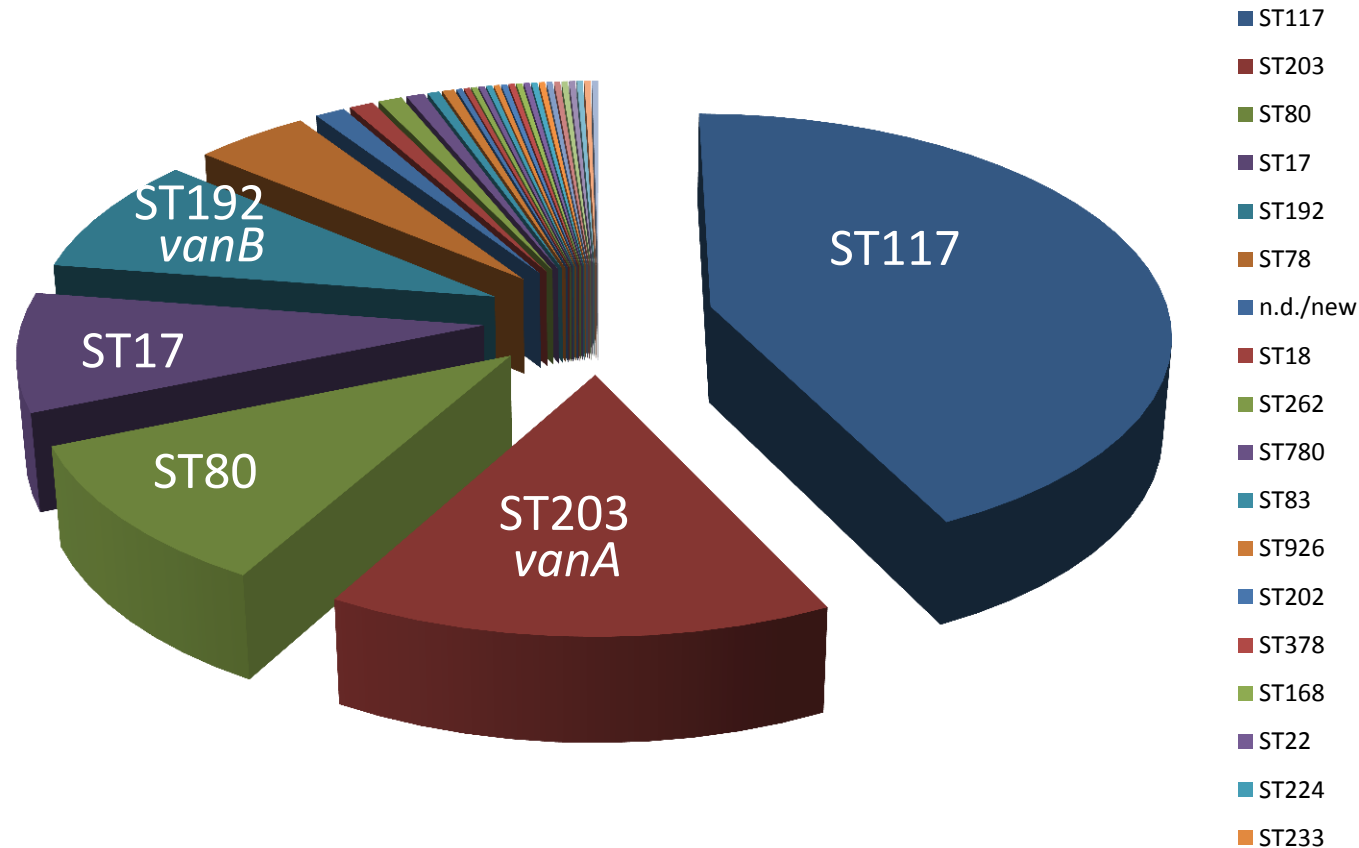
**ST017 (9%)**

**ST192 (9%)**

*vanA* und *vanB*  
assoziiert mit  
bestimmten MLST:

**ST203 (*vanA*)**

**ST192 (*vanB*)**





# VRE Blutkulturisolate, 2016 und 2017

## cgMLST Vergleiche von NGS-Daten:

- cgMLST differenziert innerhalb MLST
  - ST117: CT71, CT469, CT36, CT929

Norddeutschland 1 (MV, SH, BS, NS) – ST262/CT1016

Überregionale Verbreitung (10 Bundesländer) – ST117/CT71

Südwest-Klon (BW, BY, RP, SA) – ST117/CT469

Norddeutschland 2 (NS, B, BB) – ST117/CT36

„März/April 2017“ Klon – ST117/CT929

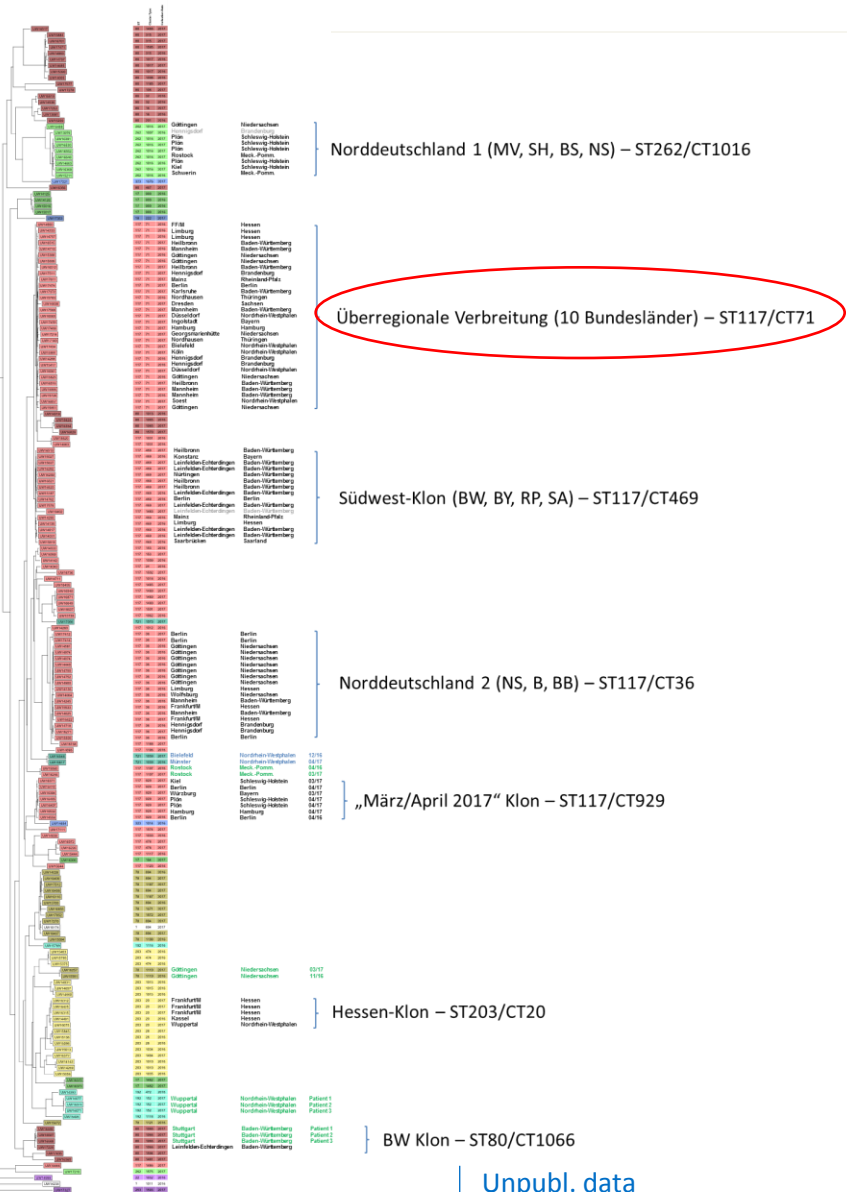
Hessen-Klon – ST203/CT20

BW Klon – ST80/CT1066

Unpubl. data



# VRE Blutkulturisolate, 2016 und 2017



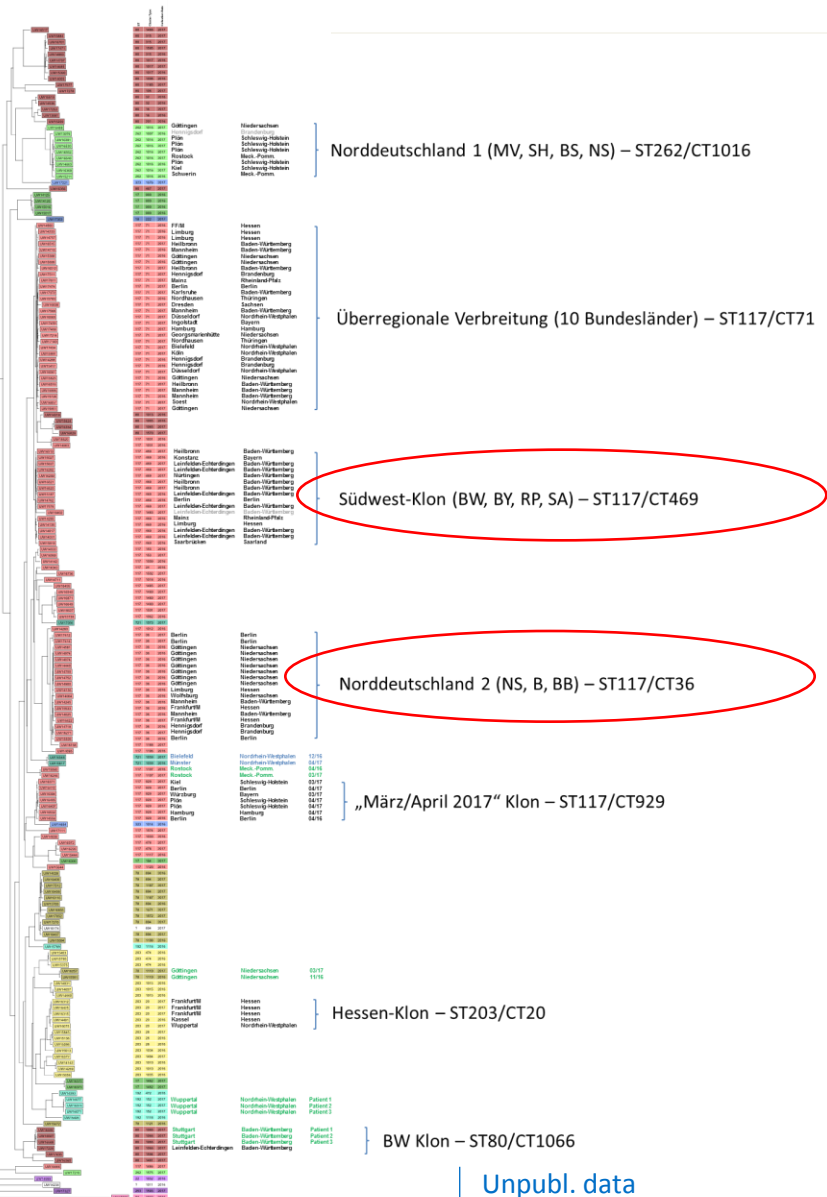
## cgMLST Vergleiche von NGS-Daten:

- cgMLST differenziert innerhalb MLST
  - ST117: CT71, CT469, CT36, CT929
- VRE Stämme sind landesweit verbreitet





# VRE Blutkulturisolate, 2016 und 2017

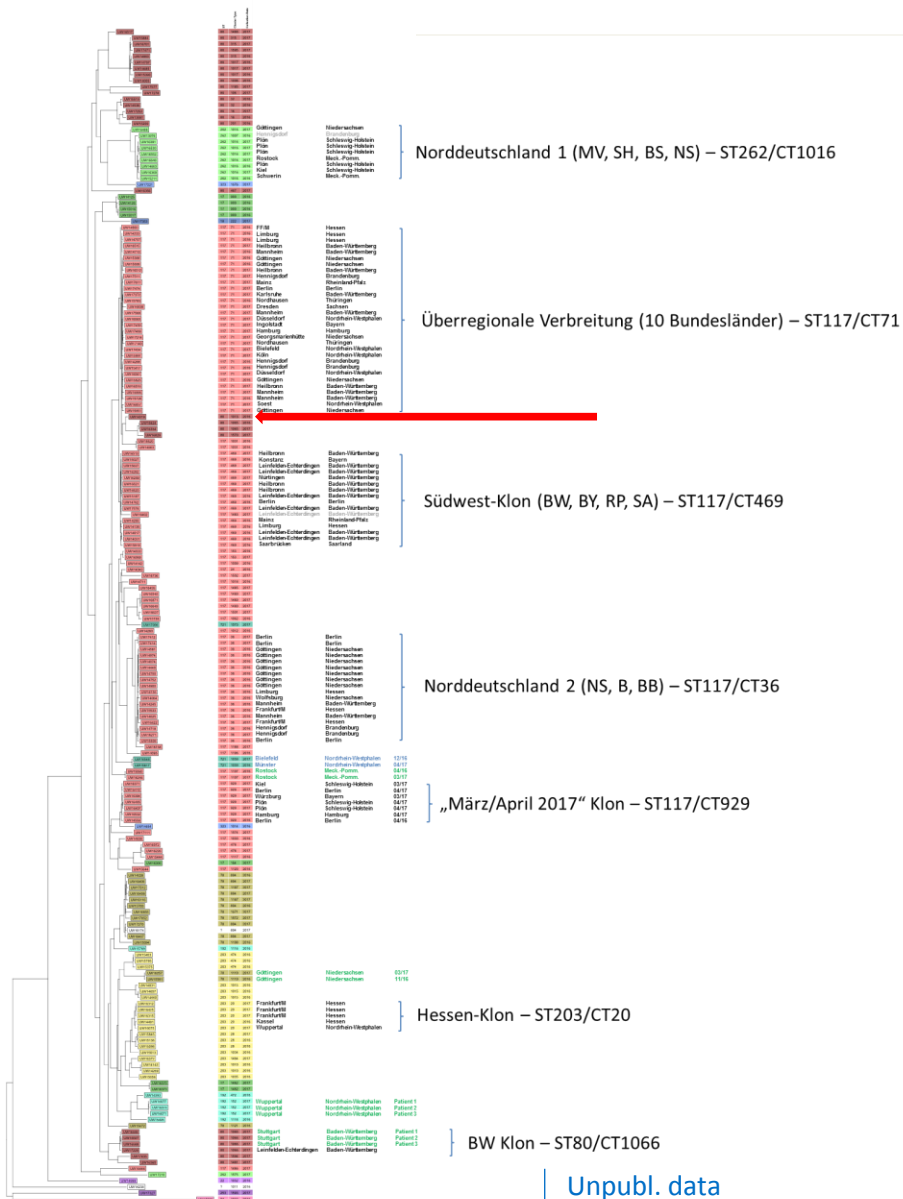


## cgMLST Vergleiche von NGS-Daten:

- cgMLST differenziert innerhalb MLST
  - ST117: CT71, CT469, CT36, CT929
- VRE Stämme sind landesweit verbreitet
- Einzelne VRE Stämme sind lokal bzw. regional verbreitet



# VRE Blutkulturisolate, 2016 und 2017

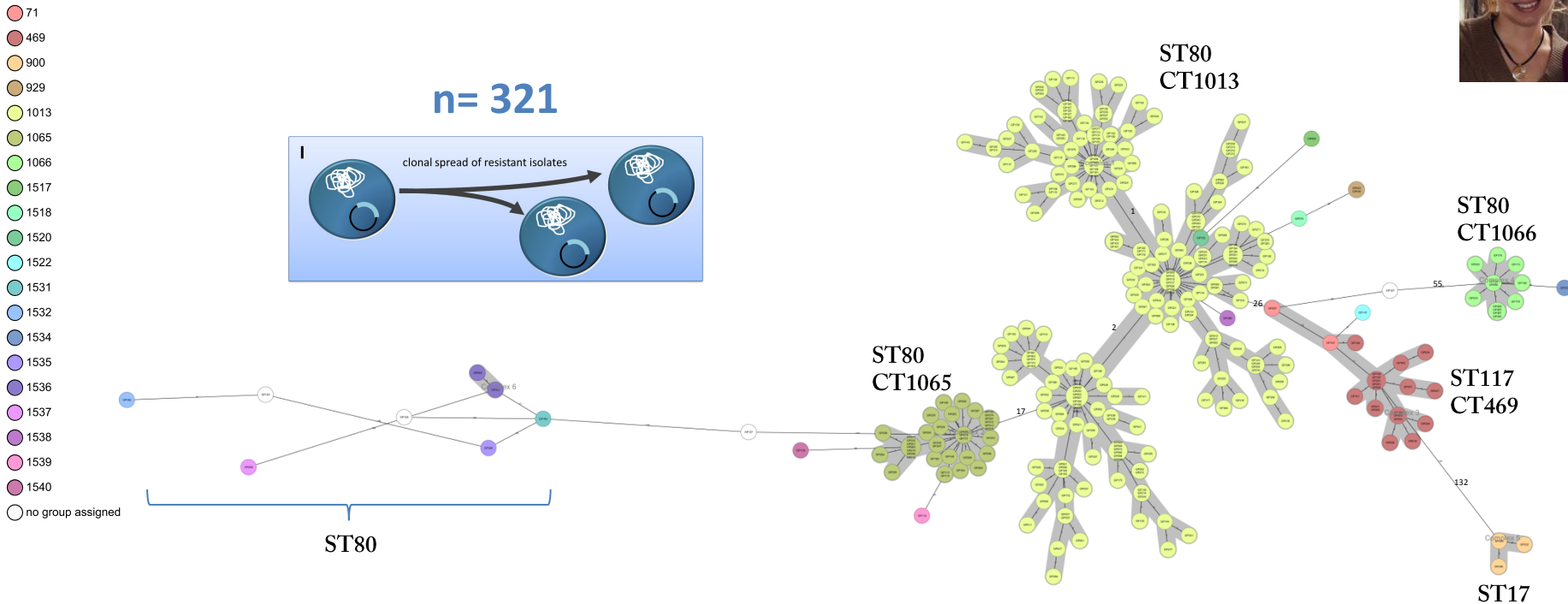


## cgMLST Vergleiche von NGS-Daten:

- cgMLST differenziert innerhalb MLST
  - ST117: CT71, CT469, CT36, CT929
- VRE Stämme sind landesweit verbreitet
- Einzelne VRE Stämme sind lokal bzw. regional verbreitet
- Auftreten eines neuen VRE-Epidemiostamms als Vergleich gegen eine Datenbank von 100x Genomen



# VRE Häufungsgeschehen analysiert mit NGS and cgMLST



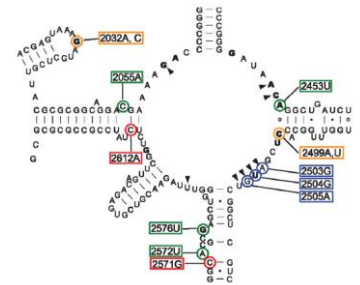
- **1 dominantes Cluster ST80-CT1013** → „Hauptklon“
- **2 zusätzliche ST80-Cluster: CT1065, CT1066** → 2 abtrennbare Cluster
- **Das CT1013 Cluster vereint Mehrzahl der nosokomial-erworbenen VRE Fälle**



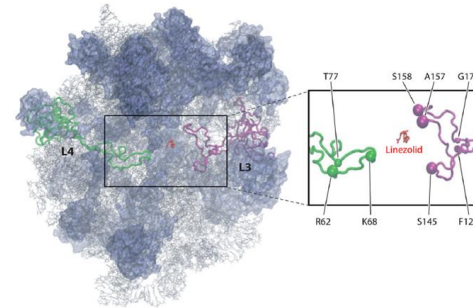
# Linezolid und Gram-positive MRE

- Linezolid = wichtige Reservesubstanz bei VRE, MRSA und MRSE

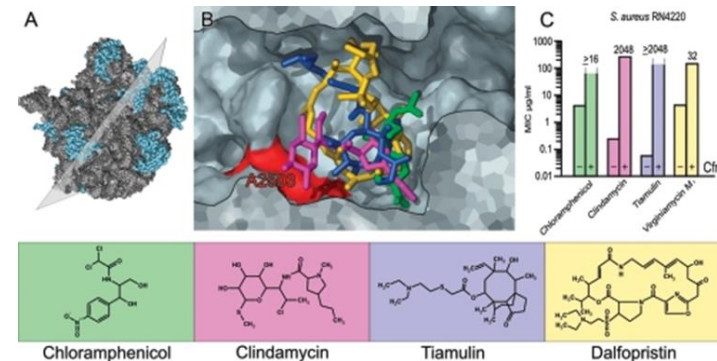
- LZD Resistenz durch (i) Mutationen in 23S rRNS Bindungsstelle



- LZD Resistenz durch (ii) Mutationen in ribosomalen Proteinen L3, L4, L22

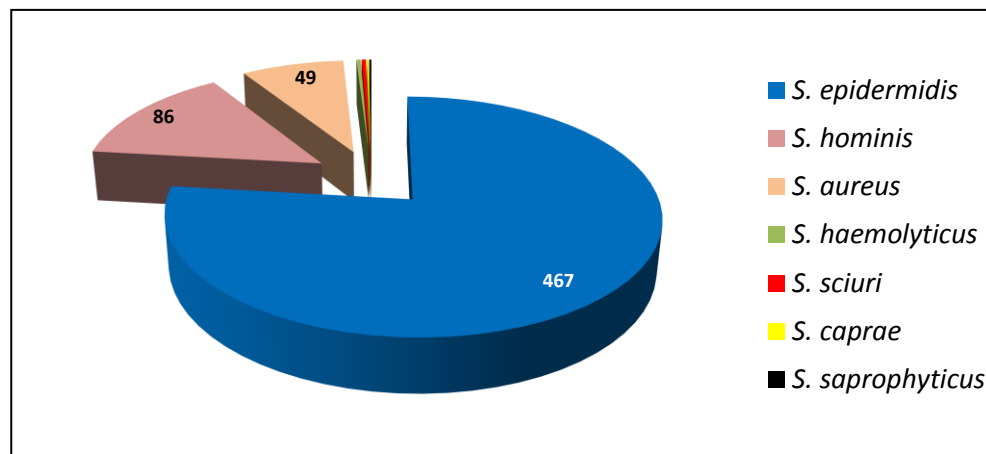


- LZD Resistenz durch (iii) **Target-modifizierende Enzyme/Gene wie z.B. Cfr/cfr (PHLOPS<sub>A</sub>)**

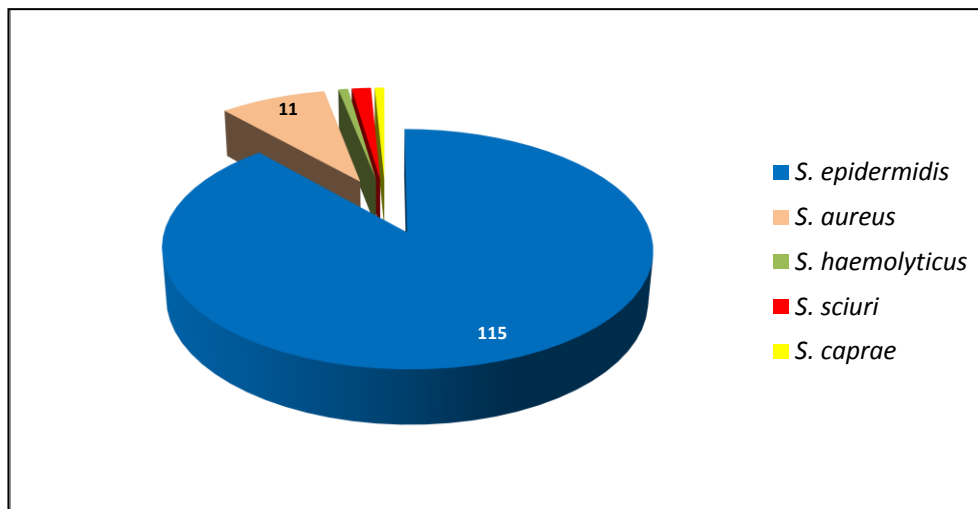




## Linezolidresistenz in klinischen Staphylokokken



Linezolid-resistente Staphylokokken,  
2006 - 2017



Vorkommen des *cfr* Gens in  
klinischen Staphylokokken,  
2006 - 2017



# Linezolidresistenz in *S. epidermidis* deutscher Patienten



No. of isolates	Hospital	ST	PFGE type	MIC of linezolid (mg/L)	<i>cfr</i>
8	A	2	IV	16-256	-
2	A	2	IV	>256	+
1	C	2	IV	8	+
1	G	2	V	>256	+
1	B	5	II	8	-
3	F	5	II	16-32	-
1	C	22	I	16	+
14	D	22	I	>256	-
2	E	22	I	>256	-
1	E	22	I	>256	-
1	H	22	I	>256	-
1	C	23	III	8	+

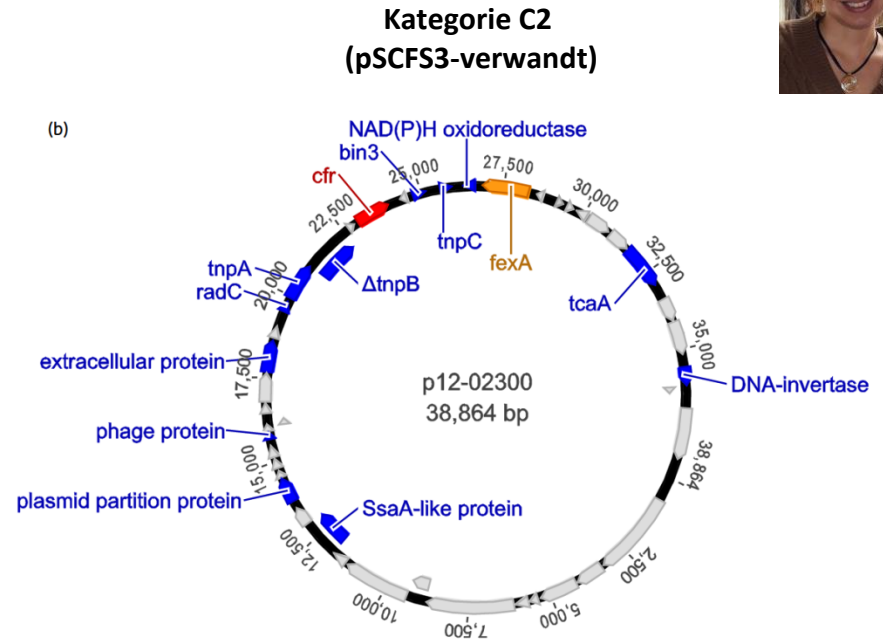
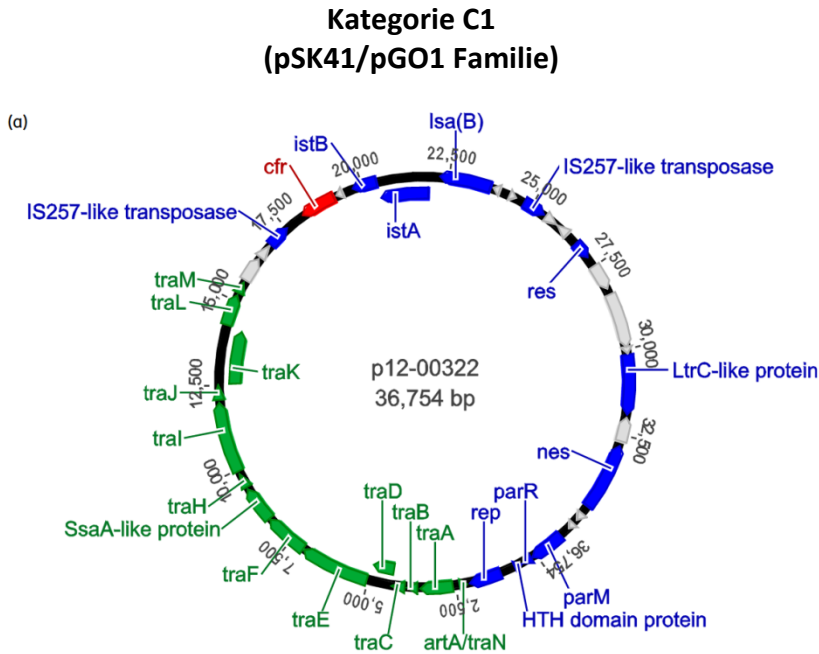
- **8 Krankenhäuser** ausgewählt
- Multiple resistente Isolate
- **4 Genotypen** nachgewiesen  
(klassische nosokomiale *S. epidermidis* Typen)
- Überwiegend Mutationen in 23S rDNA und ribosomalen Proteinen nachweisbar
- **6x *cfr*-positive Stämme**



# Linezolidresistenz in *S. epidermidis* deutscher Patienten



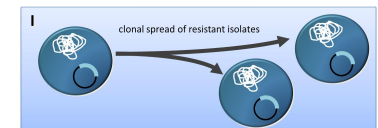
- *cfr* Plasmide: bekannte und neue Strukturen



LRSE ST2, ST22, ST23 aus **einem**  
**Krankenhaus**



LRSE ST2 aus **verschiedenen**  
**Krankenhäusern**



Plasmide ähnlich Plasmiden aus Nutztier-assoziierten Staphylokokken mit Linezolidresistenz

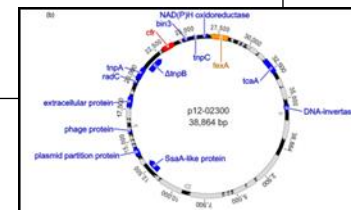


## Linezolidresistenz in *S. epidermidis* gesunder Probanden

- 4/171 (2,3%) der Tierärzte und 3/263 (1,1%) der Familienmitglieder trugen *cfr*-positive KNS
- Linezolidresistenz war **übertragbar mittels Konjugation**
- Das *cfr-fexA* tragende Fragment war **ähnlich zu Plasmiden klinischer LRSE**



Spezies		Resistenzgene			MLST	Resistenzphänotypen von Konjuganten
		<i>cfr</i>	<i>fexA</i>	<i>optrA</i>		
<i>S. epidermidis</i> (4)	fm	+	+	-	<b>5</b>	CLI, FLO, LNZ
	vt	+	+	-	<b>10</b>	CLI, FLO, LNZ
	vt	+	+	-	<b>2</b>	CLI, FLO, LNZ
	vt	+	+	-	<b>19</b>	CLI, FLO, LNZ
<i>S. saprophyticus</i> (2)	fm	+	+	-		CLI, FLO, LNZ
<i>S. saprophyticus</i> (1)	vt	+	+	-		CLI, FLO, LNZ

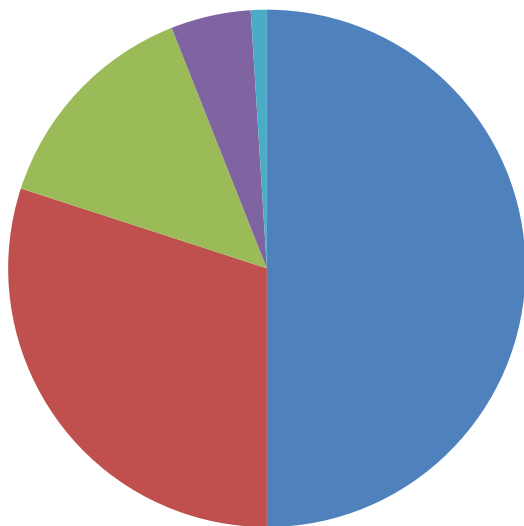




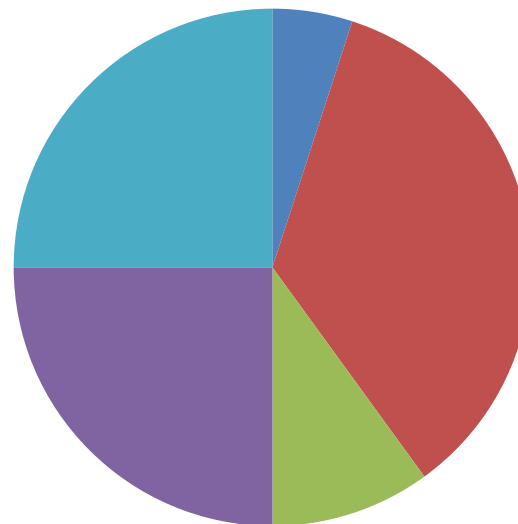


# Vorkommen von Laktamasen in *E. coli* von Mensch und Tier

Mensch



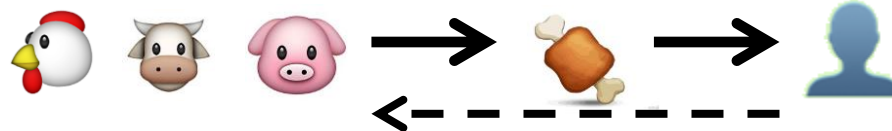
Geflügel



ESBL-Typ



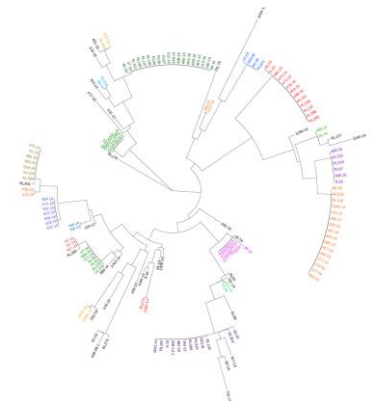
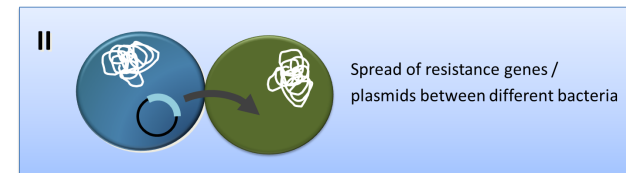
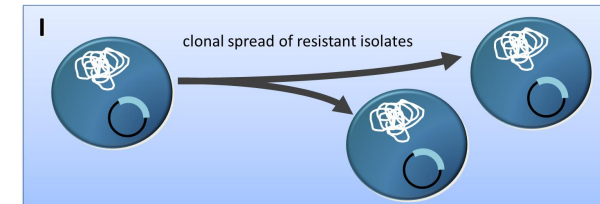
- CTX-M-15
- CTX-M-1
- CTX-M-14
- Andere
- CMY (AmpC)





## Analyse von AmpC-prod. *E. coli* verschiedener Herkunft

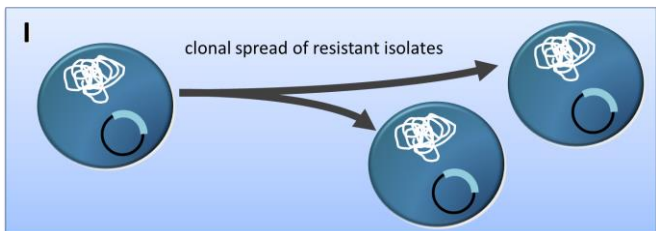
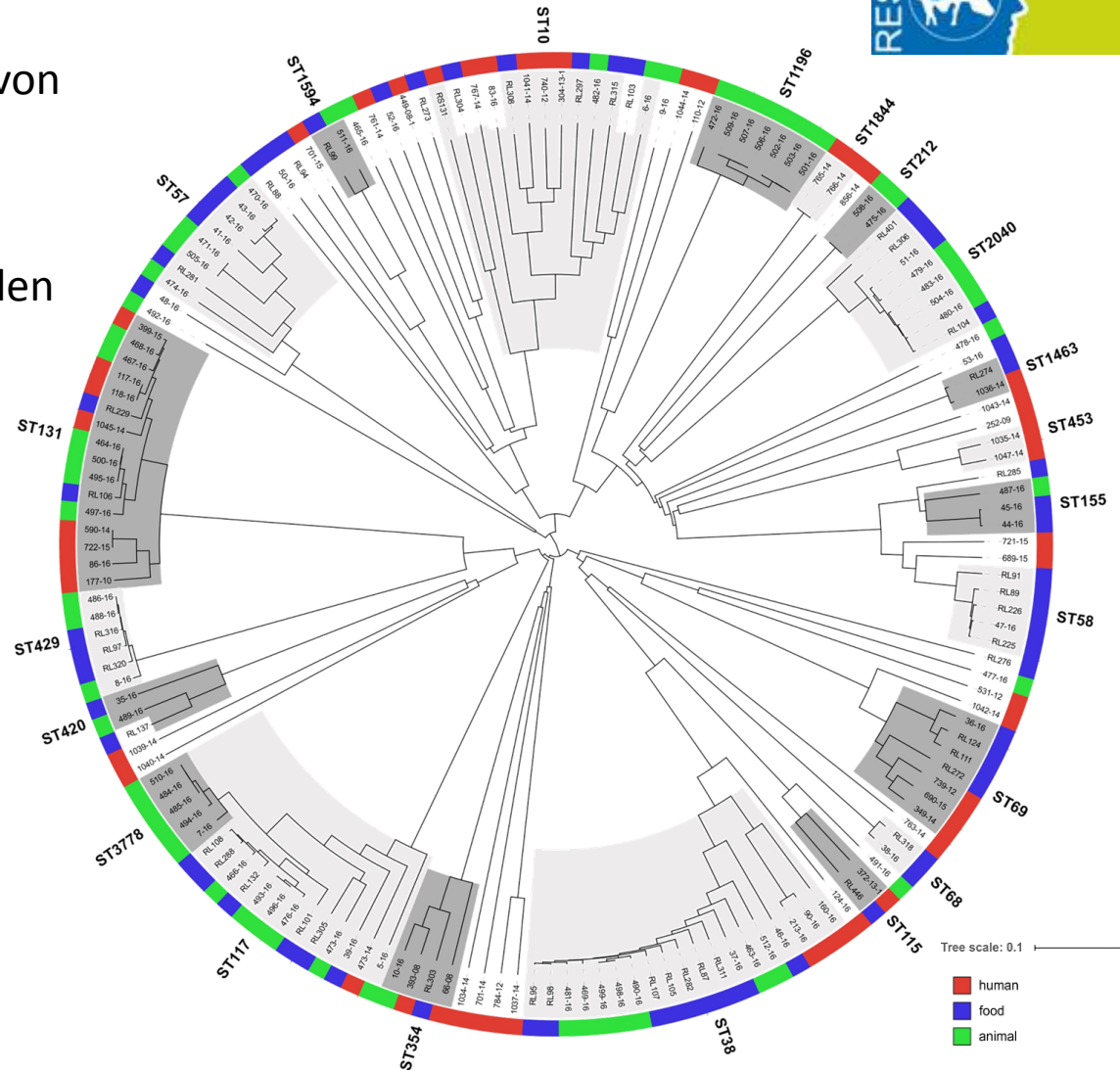
- WGS Analyse von **170 CMY-2 prod. *E. coli* Isolate** von Nutztieren, aus Lebensmitteln und vom Menschen (Besiedlung und Infektion [amb./stationär])
- Phylogenetische Analyse mittels Multilocus Sequence Typing (MLST) and core-genome MLST (cgMLST)
- Analyse der Plasmide (Replikon und Struktur)
- Analyse der genetischen Umgebung von *bla*<sub>CMY-2</sub>





## Typisierung durch WGS

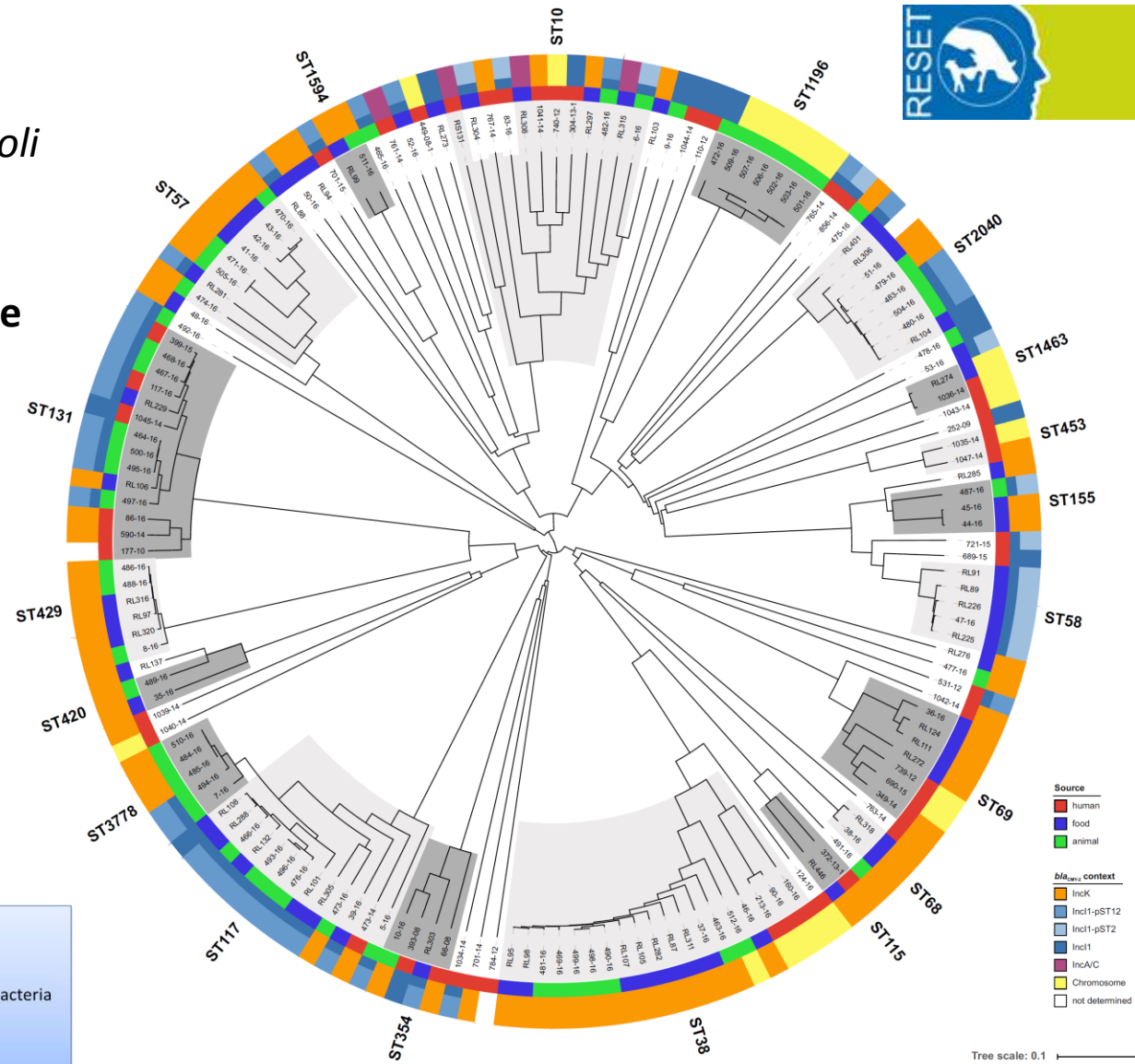
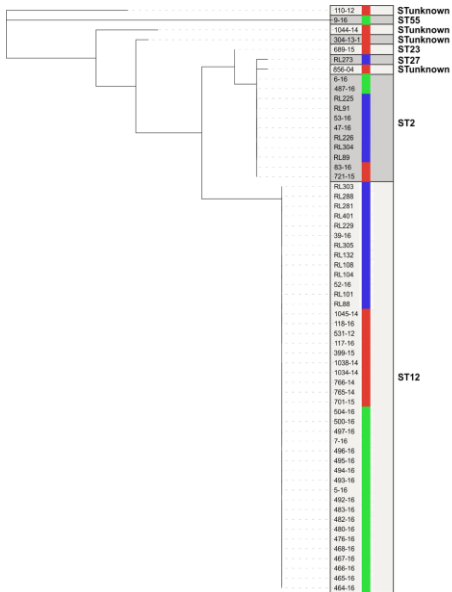
- Ad hoc cgMLST Schema anhand von 2547 Genen
- Humane *E.coli* clustern verschieden von *E.coli* aus Tieren und Lebensmitteln (ST1196, ST38)
- Eng verwandte Isolate vom Mensch und Tier: ST131, ST1463





# Plasmidbesitz

- Gleiche Plasmidtypen in *E.coli* verschiedener Herkunft (äußerer Ring: **IncK, IncI**)
- Eng verwandte **IncI** Plasmide



**Source**

- human
- food
- animal

**bla<sub>CMY-2</sub> context**

- IncK
- IncI-pST12
- IncI-pST2
- IncI
- IncA/C
- Chromosome
- not determined



Tree scale: 0.1



# Zusammenfassung

## Genombasierte Surveillance von MRE und deren Resistenzgenen hilft u.a. bei

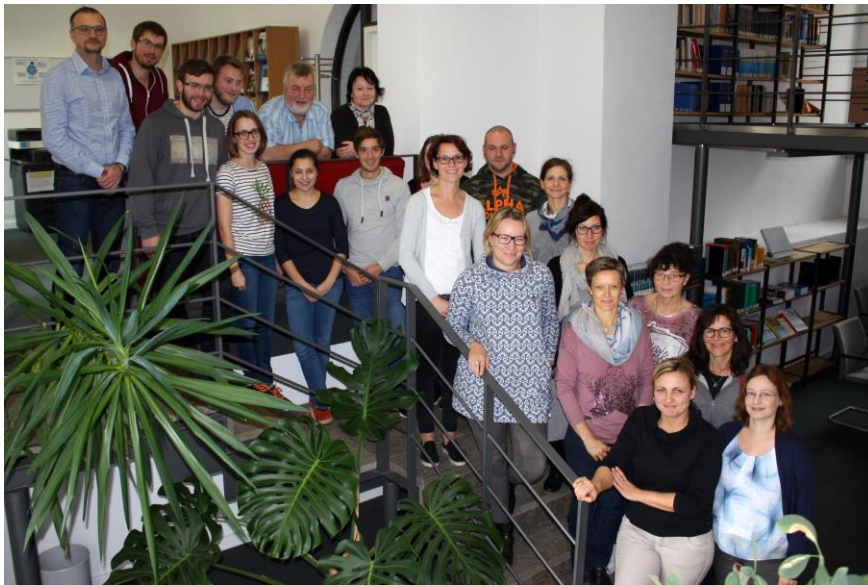
- Detaillierten Ausbruchsanalysen und der Quellensuche (Bsp. VRE)
- Rekonstruktion von Ausbreitungswegen von MRE und deren Genen (Bsp. VRE und *bla*<sub>CMY-2</sub>)
- Erkennen und Verfolgen des Auftretens und der Verbreitung neuer Resistenzgene mit „One Health“ Dimension (Bsp. *cfr*)





## Danksagung

- Fachgebiet Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen, Nationales Referenzzentrum für Staphylokokken und Enterokokken
- Netzwerk von kooperierenden Laboren



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Gesundheit

