

Sektorübergreifende genombasierte Surveillance von Salmonellen in Deutschland

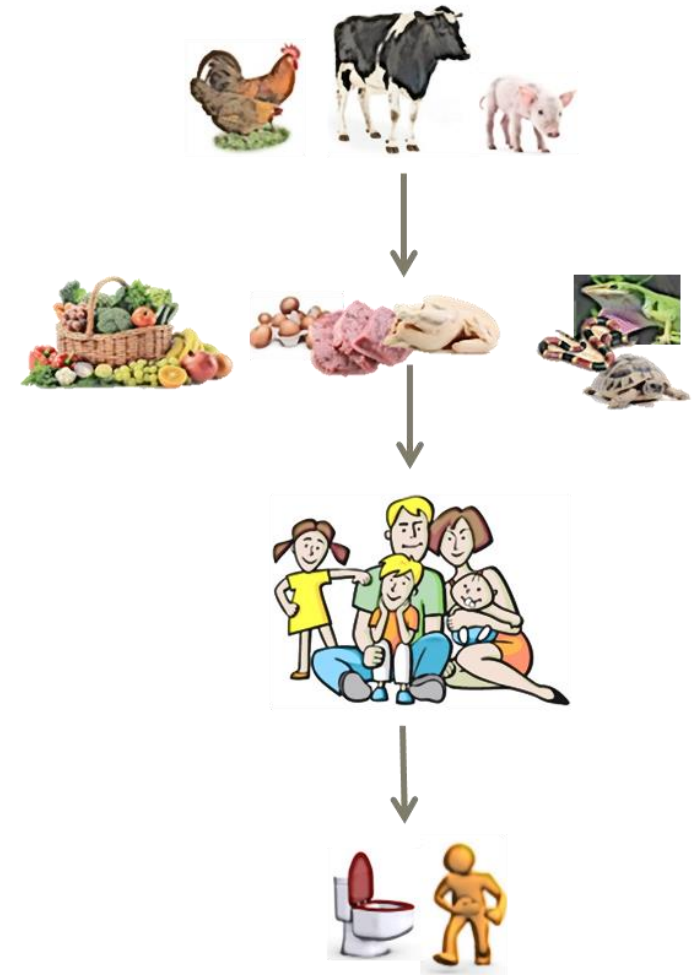
Michael Pietsch

FG Bakterielle Darmpathogene Erreger
und Legionellen, NRZ Salmonellen

Fortbildung für den Öffentlichen Gesundheitsdienst 2021,
24.03.2021

Bedeutung von Salmonellen als Zoonoseerreger

- Zweithäufigste Zoonose -> bedeutendstes Reservoir landwirtschaftliche Nutztiere^[3]
- **70-80% der Salmonellosen -> *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis***
- Trotz Prophylaxe- und Bekämpfungsmaßnahmen im Nutztiersektor -> relevantes Gesundheitsrisiko und erhebliche Belastung für LM-Sicherheit
 - EU/y > 100.000 humane Fälle ^[1]
 - Deutschland/y > 14.000 humane Fälle ^[2]
- Hospitalisierungsrate > Campylobacteriose ^[3]
- Große Anzahl an (großen) lebensmittelbedingte Ausbrüchen
- EFSA Schätzung: Salmonellosen beim Menschen -> belasten Wirtschaft/y mit bis zu 3 Mrd. EUR ^[1]
- **Einführung WGS für zur Molekularen Surveillance und Untersuchung von LM-bedingten Ausbrüchen**
- -> **Verbesserung Clusterdetektion, Erhöhung Trennschärfe** ^[4, 5]



[1]: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella>, [2]: RKI SurvStat; [3]: EFSA Journal 2018, [4] Jackson et al. Clin Infect Dis 2016, [5] Ashton et al. Peer J 2016



Nationales Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere bakterielle Enteritiserreger

am FG 11 Bakterielle darmpathogene Erreger und Legionellen

- ~ 14.000 Meldefälle/a
- ~ 4.000 Probeneingänge/a

	2020	2019	2018	2017	2016
Meldezahlen nach Ref.Def.	8.727 [#]	13.696	13.539	14.270	12.970
Einsendungen <i>Salmonella</i> spp. am NRZ*	3.449	5.521	4.037	3.885	2.391
<i>S. Typhimurium</i>	975	1.331	899	981	662
<i>S. Enteritidis</i>	559	1.160	981	910	263

*Quelle: RKI Salmo-DB

[#] Covid-19-bedingter Einbruch

S. Typhimurium + *S. Enteritidis* = 40-49% der Isolate; pro Jahr 130 - 170 verschiedene Serovare

Aufgaben

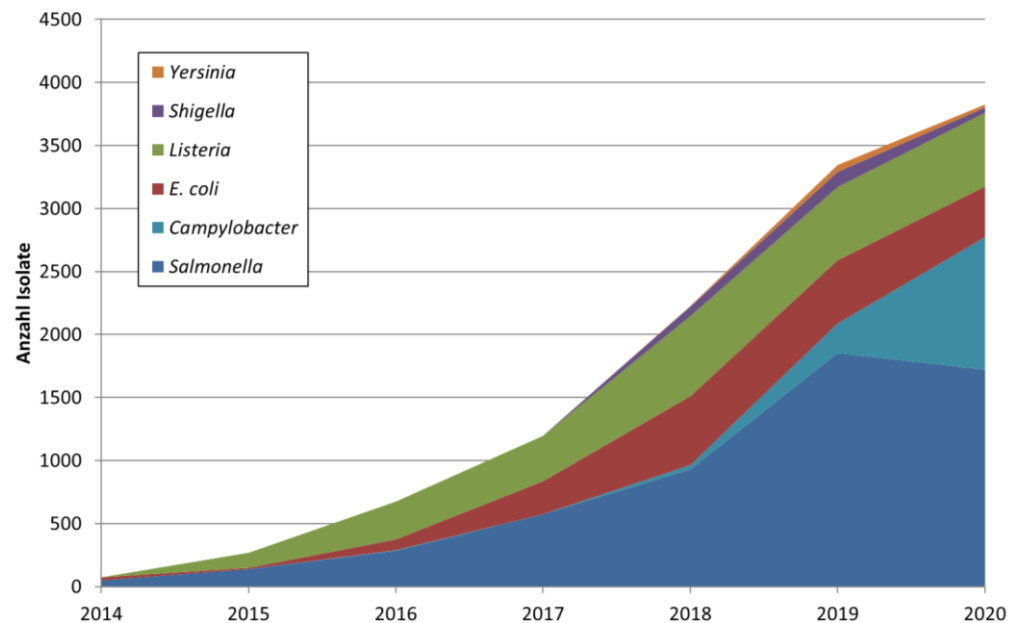
- Laborgestützte epidemiologische Überwachung (Surveillance)
- Sub- und Feintypisierungen zur Ausbruchsauflärung / Identifizierung von Erregerquellen
- Bewertungen der Resistenz- und Virulenzentwicklung in der Erregerpopulation (Risikopotentialanalyse)
- Stammsammlung





Genomsequenzierung am NRZ

- Ausbruchsuntersuchungen
- Surveillance: **S. Enteritidis**, **S. Typhi**, *Listeria*, EHEC
- Typisierung (Ersatz für klassische Methoden)
- Sonderfälle (raue, geißellose Isolate)
- Forschungsprojekte



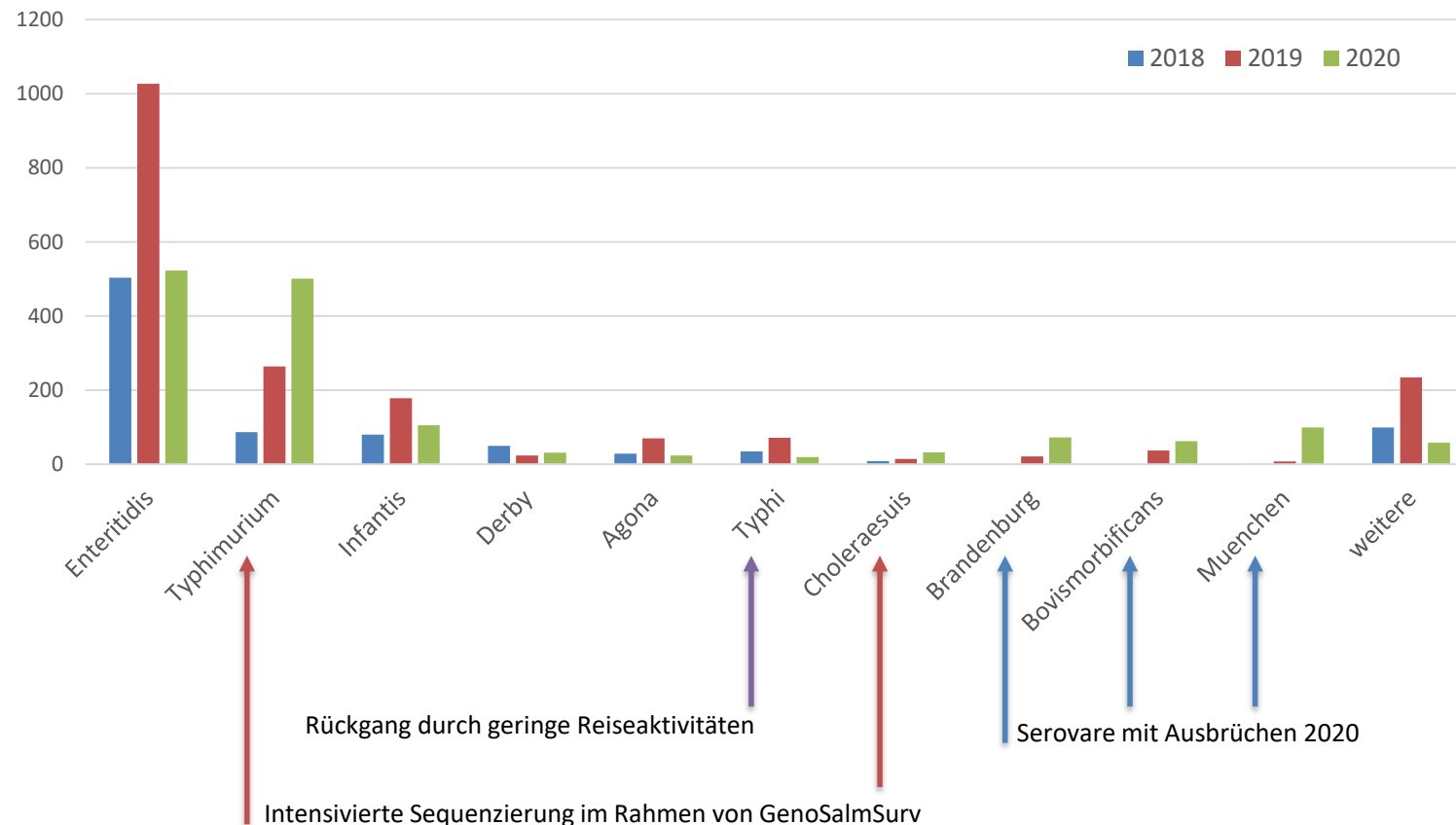
<https://www.research.colostate.edu/genomics/wp-content/uploads/sites/9/2018/11/MinION.png>
<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/images/systems/v2/systems-carousel/system-carousel-miseq-left.png>

Ganzgenomsequenzierung am RKI:

- zentrale Sequenziereinheit **MF2: Andrea Thürmer** am Standort Berlin
 - 2x Illumina MiSeq
 - 2x Illumina NextSeq
 - 1x Illumina ISeq
 - 4x Oxford Nanopore Minlon
- manuelle DNA-Isolation am NRZ
- (automatisierte) Library-Herstellung durch MF2
- Rohdatenauswertung am NRZ



Molekulare Surveillance von *Salmonella enterica* am NRZ Salm



- seit 2014 wurden ca. 5.500 *Salmonella* Genome sequenziert
- davon ca. 3.100 NGS Datensätze für *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*
- Typisiererate auf bis 40% (in 2019)
- *S. Typhi* Vollabdeckung durch NGS
- seit 01/2020: für alle SE Proben NGS-basierte Typisierung
- für STM ebenfalls angestrebt (2020 ca. 55%)
- alle anderen Serovare anlassbezogen (Ausbrüche)



Nationales Referenzlabor (NRL) - Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR)

- BfR-Profil: Wissenschaftliche Risikobewertung von Lebens- und Futtermitteln, Stoffen und Produkten
- Abteilung Biologische Sicherheit: Bewertung mikrobieller Risiken von Lebensmitteln, acht Referenzlaboratorien nach EU VO 2017/625
- An molekularer Surveillance und GenoSalmSurv beteiligte Labore:
 - NRL für *Salmonella*
 - Istvan Szabo, Jennie Fischer, Marina Lamparter
 - Studienzentrum für Genomsequenzierung und – analyse
 - Burkhard Malorny, Maria Borowiak, Laura Uelze, Carlus Deneke



Jungfernheide



Marienfelde



Alt-Marienfelde

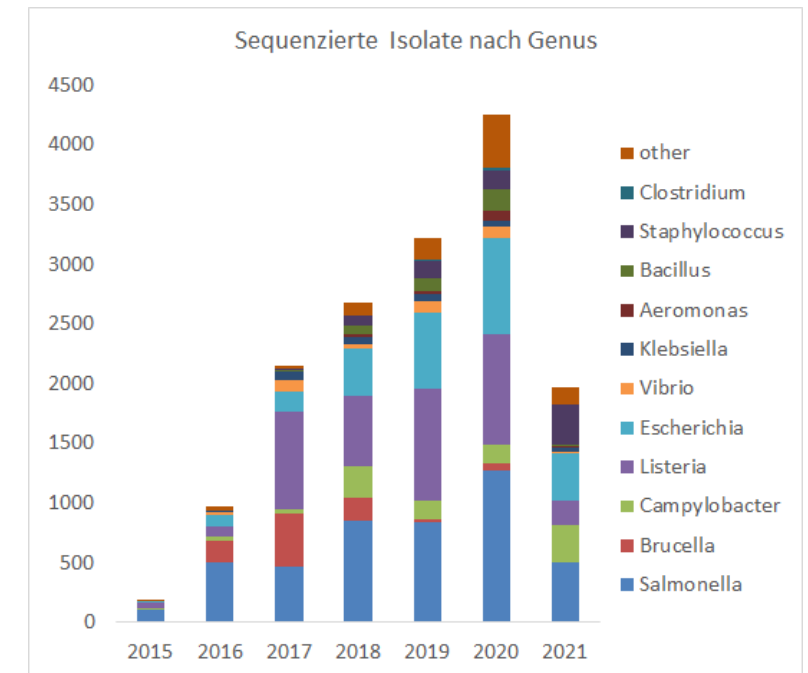


NRL-Salmonella Routinediagnostik

- Jährlich ca. ~5.000 Salmonellen Einsendungen im Rahmen von Monitoring- und Bekämpfungsprogrammen, Aufträge von Privatlaboren, Universitäten, Landesuntersuchungsämtern
- Herkunft: Nutztier, Wildtier, Zootiere, Lebensmittel, Futtermittel, Umwelt
- Routinemäßige Serotypisierung aller Isolate, Resistenzbestimmung von Monitoringisolaten
- Beteiligung an der Aufklärung von Infektketten und lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen, feindifferenzierende Untersuchungen (u.a. mittels Ganzgenomsequenzierung)

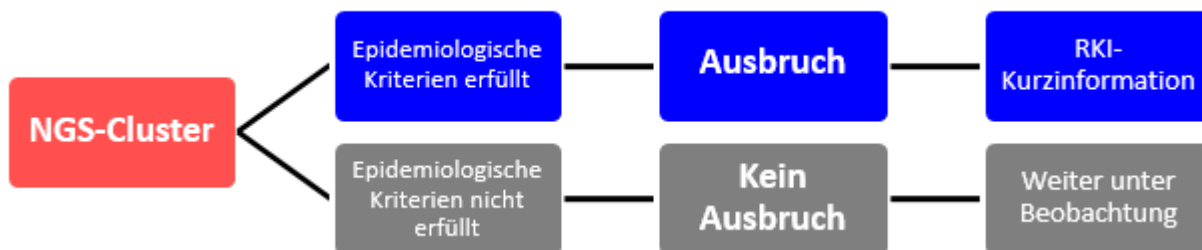
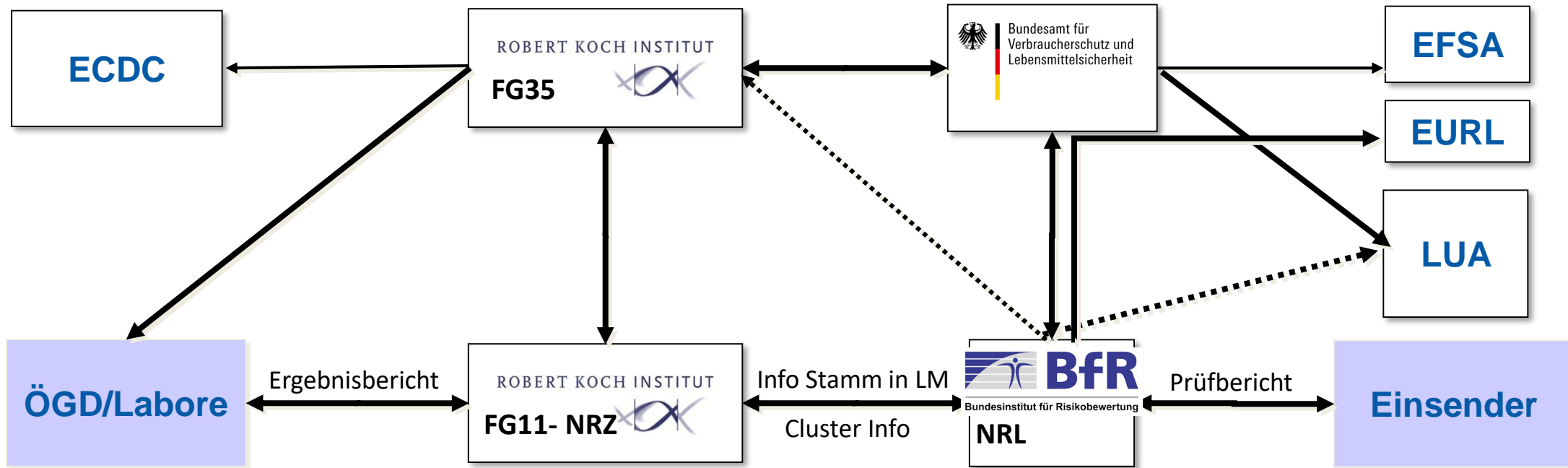
NGS Kapazitäten

- Seit 2015, > 4.500 Datensätze im *NRL-Salmonella*
- Bioinformatik: kommerzielle Programme, open-source Pipeline Entwicklungen für lebensmittelbedingte Erreger
- Geräte: 2 x MiSeq und 1 x NextSeq Sequenzierer (Illumina), 1 x PGM Ion Torrent (Thermo Scientific), 1 x MinIon (Oxford Nanopore), 1 x Sequel (Pacific Biosciences)
- Erfahrungen in der Ringversuchsorganisation



Anzahl sequenzierte Isolate Abteilung 4

Kommunikation und Interaktion von NRZ und NRL



NGS-Cluster

- Mindestens 4 voneinander unabhängige *Salmonella* Isolate mit 0 AD => Referenz-cgMLST Profil
- *Salmonella* Isolate mit 1-3 AD zum Referenzprofil

Erkennung von zusammenhängenden Isolaten

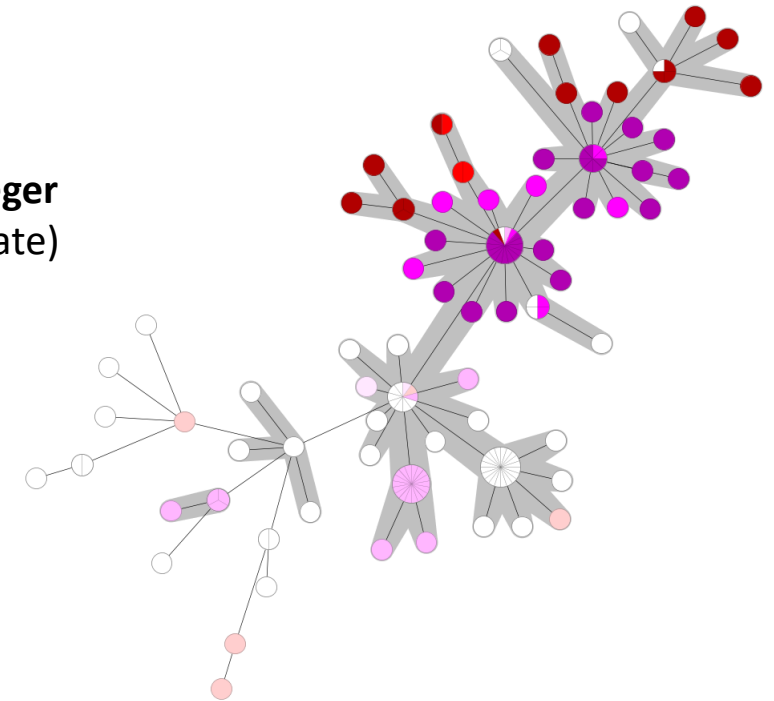
2014-2020 ca. 3.100 NGS Datensätze für *S. Enteritidis* und *S. Typhimurium*

S. Enteritidis

- 2.214 NGS-Datensätze
- **51 Cluster sehr eng verwandter Erreger** (cgMLST, AD ≤ 5 , Clustergröße ≥ 5 Isolate)
- Clustergröße 5-284 (Median:14)
- ca. 80% aller Isolate in Clustern
- ca. 10 % in Häufungen (2-4 Isolate)
- ca. 10% sporadische Isolate
- **für 15 Cluster: passende Lebensmittelisolate** (i. d. R. Eier oder Eierspeisen)

S. Typhimurium

- 917 NGS-Datensätze
- **42 Cluster sehr eng verwandter Erreger** (cgMLST, AD ≤ 5 , Clustergröße ≥ 5 Isolate)
- Clustergröße 5-204 (Median:7)
- ca. 50 % aller Isolate in Clustern
- ca. 20 % in Häufungen (2-4 Isolate)
- ca. 30 % sporadische Isolate
- **für 11 Cluster: passende Lebensmittelisolate** (Rohwurst / Hackfleisch)





NGS-basierte Ausbruchsanalyse

S. Enteritidis CT1734-Ausbruch 2018-2019

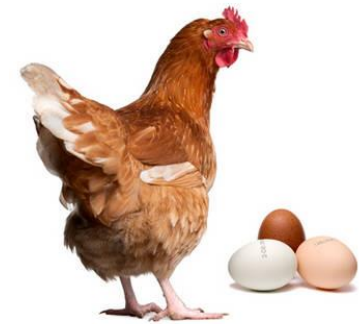
- (zweit-)häufigster Serovar beim Menschen in Deutschland
- häufig assoziiert mit Ei(produkten)

Ausbruchsfakten:

Wann: Juli 2018 – Ende 2019

Wo: in 12 Bundesländern (v.a. RP, SL, NW, HE)
NGS-bestätigte Fälle in Norwegen (n=16), Frankreich (n=3),
Luxembourg (n=1) und Schottland (n=1)

Fallzahl: >300



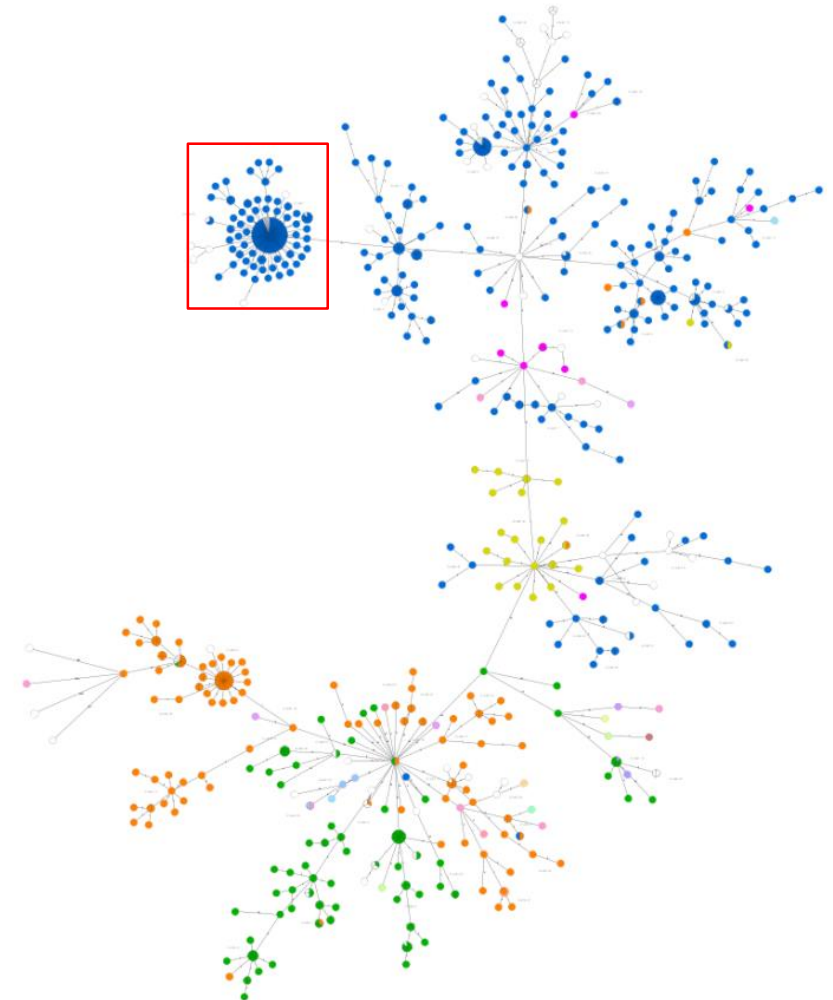
<http://www.deutsche-eier.info/typo3temp/pics/6870c1d25e.jpg>

NGS-basierte Ausbruchsanalyse S. Enteritidis CT1734-Ausbruch 2018-2019

Aufklärung / Analyse:

- NGS für alle S. Enteritidis PT8-Isolate (entspricht > 50 % aller SE) -> Vorselektion mittels CT1734-spezifischer PCR
- Sequenzaustausch mit NRL am BfR -> ermittelte Infektionsquelle: Eier mehrerer Legebetriebe
- Patienteninterviews des RKI und FKS in Rheinland-Pfalz deuten auf Eier
- Enge Zusammenarbeit mit BfR FoodChain-Lab und BVL
- Ursächliche gemeinsame Quelle bisher nicht identifiziert

Überblick Erregerpopulation S. Enteritidis

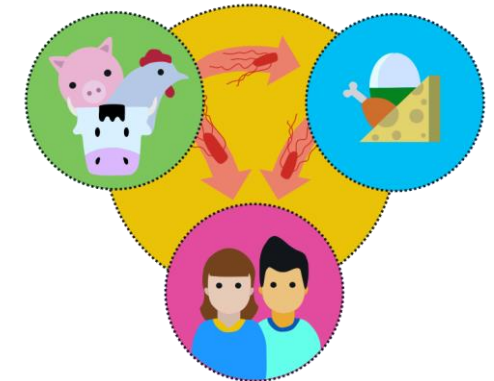




Herausforderungen zur Identifizierung von Infektionsclustern und Erregerquellen LM-bedingter Erkrankungen

Integrierte Molekulare Surveillance (IMS)

- Nutzung Erkenntnisse aus genombasierter Feintypisierung (molekulare Surveillance)
- Zusammenführung mit epidemiologischen Daten (aus dem Meldesystem nach IfSG)
- **Zusammenführung mit Daten der Lebensmittel- und Veterinärbehörden**
- Keine einheitlichen Qualitätskriterien und Analysepipelines für die Auswertung von Sequenzdaten
 - Einzellösungen, lassen oftmals keine direkten Vergleiche zu
 - keine definierten Standards, erschwerte Kommunikation
- Keine Sektor-übergreifende Zusammenführung von NGS Daten zur einheitlichen Interpretation
- Internationale Warenströme
 - grenzüberschreitender Austausch von Erregern
 - erschwerte Identifikation von Transmissionsquellen
- **Harmonisierung der Methoden und Zusammenführung Daten aus unterschiedlichen Sektoren notwendig**



nach Leekitcharoenphon P, *et al.*, Front. Microbiol., 2019



Herausforderungen (der IMS) zur Identifizierung von Infektionsclustern und Erregerquellen LM-bedingter Erkrankungen

Integrierte Molekulare Surveillance (IMS)

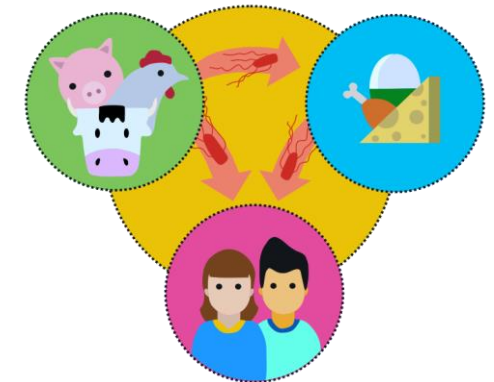
- Nutzung Erkenntnisse aus genombasierter Feintypisierung (molekulare Surveillance)
- Zusammenführung mit epidemiologischen Daten (aus dem Meldesystem nach IfSG)
- **Zusammenführung mit Daten der Lebensmittel- und Veterinärbehörden**

Stand heute beim Abgleich der Genomsequenzen:

- Manueller Datenaustausch zwischen Instituten
- Reprocessing von Datensätzen in den jeweiligen Instituten um Vergleichbarkeit zu gewährleisten

Probleme/Risiken

- Übersehen von Clustern zwischen Instituten, da intern unter Threshold zum Datenaustausch
- In der Dimension der Daten nicht mehr händisch realisierbar



nach Leekitcharoenphon P, *et al.*, Front. Microbiol., 2019

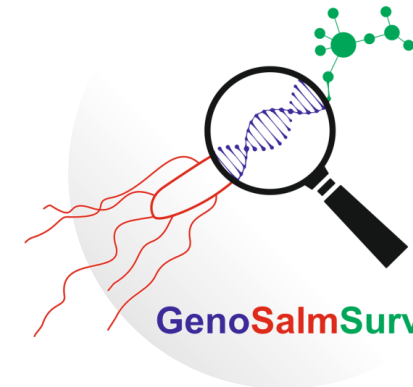


GenoSalmSurv

- Integrierte genombasierte Surveillance von Salmonellen

-> Etablierung von praktikablen harmonisierten Arbeitsabläufen für eine IMS von Salmonellen

- Bestandsaufnahme verfügbarer sowie tatsächlich angewendeter Typisierungsmethoden, Identifikation von begünstigenden und behindernden Faktoren
- Aufbau einer integrierten genombasierten Surveillance für Salmonellen (incl. Standardabläufe, Best Practice Beispiele, Laborvergleichstests, real time Sequenzierung)
- Befähigung weiterer Laboratorien (insb. Landeslaboratorien) zur Genomsequenzierung/-analyse (Schulungen, Veröffentlichungen)

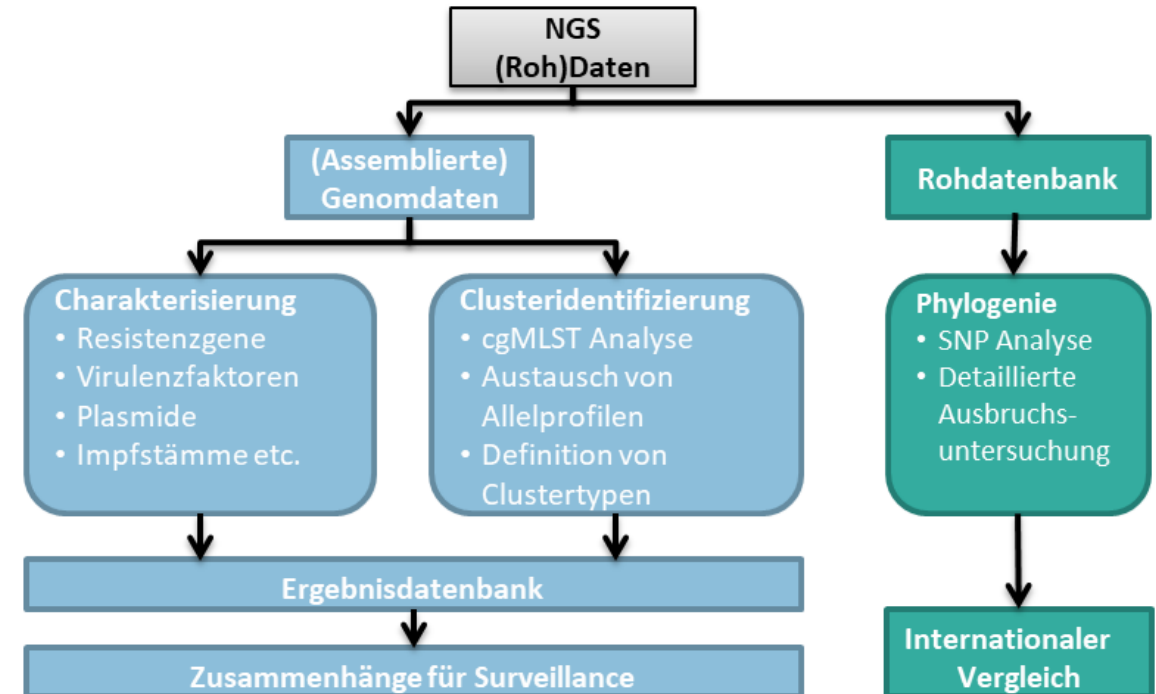


gefördert durch:  Bundesministerium für Gesundheit



Entwicklung von Standardarbeitsabläufen für eine Integrierte Genombasierte Surveillance

- Entwicklung bioinformatischer Standardarbeitsabläufe für die Typisierung, phylogenetischen Analysen und Detektion von Clustern (cluster alert)
 - Zusätzliche Betrachtung von:
 - Antibiotikaresistenzgenen
 - Virulenzgenen
 - Serotyp-bestimmenden Loci
 - Plasmiden
 - Detektion von Impfstamm-Markern
- Ausarbeitung und Entwicklung von Arbeitsabläufen zum Austausch minimaler Metadatensätze und zur Kommunikation von Clustern / Matches





Realtime Genomsequenzierung

- Konzept

- Sequenzierung und bioinformatische Auswertung von ca. 2 300 *Salmonella* Isolaten ausgewählter Serovare
 - **Sequenzierung von vorliegenden *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis* Isolaten an BfR, LGL und RKI in zwei Phasen**
 - Validierung von Pipelines und Clusterdetektion -> ggf. Anpassung der Workflows
 - Erprobung des Datenaustauschs und der Kommunikation
 - Offener Genomvergleich: Wie viele neue Cluster werden identifiziert?



<https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/images/systems/v2/systems-carousel/system-carousel-miseq-left.png>

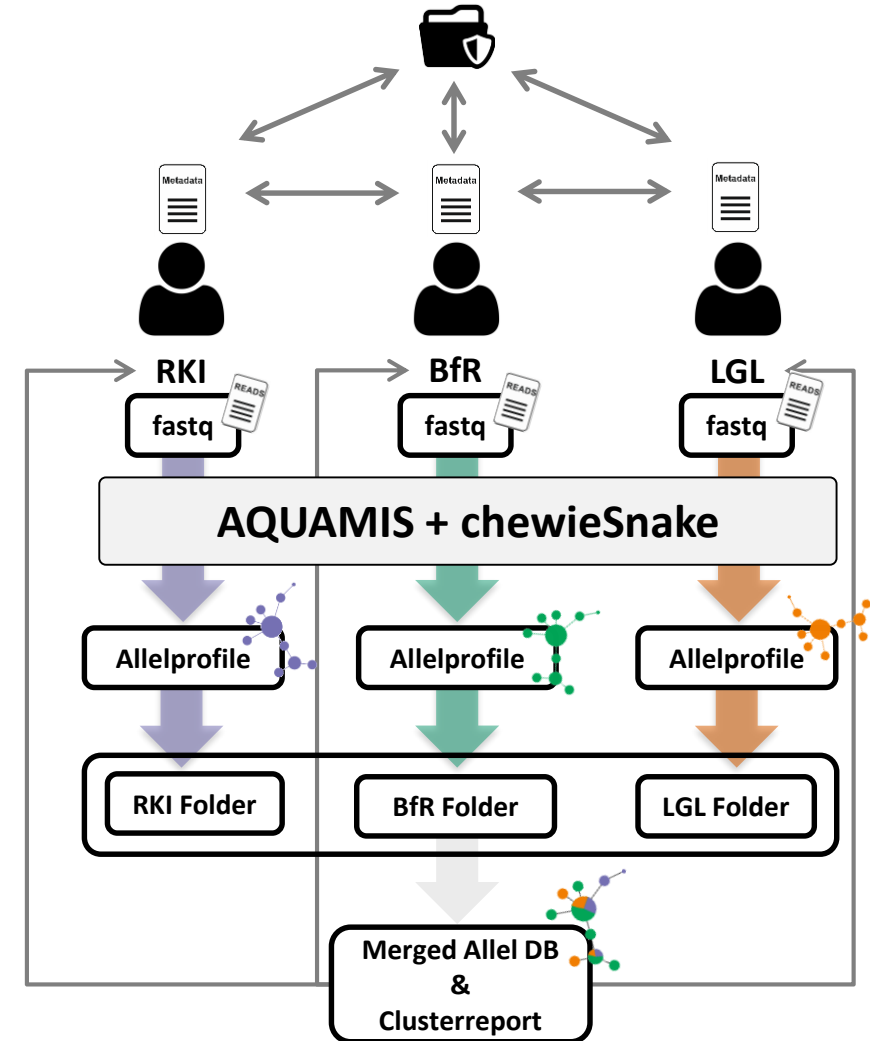
Realtime Genomsequenzierung - Datenaustauschmodell

Austausch von Metadaten
via secured Database oder direkt

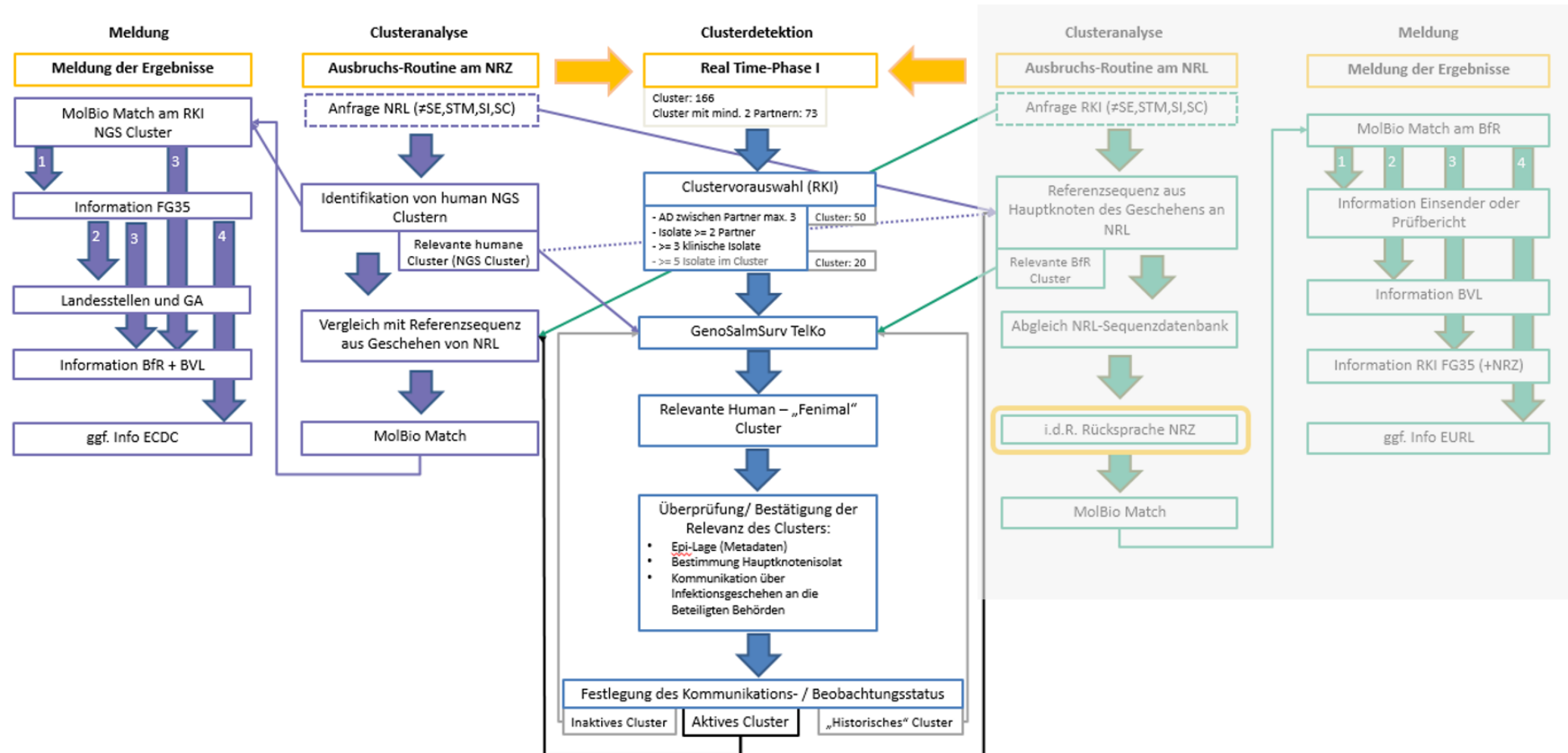
Assemblierung & cgMLST
Analyse

Upload von ghashten Allelprofilen in
secured Database

Synchronisierung und Zusammenführung
der Allelprofile sowie Generierung von
cgMLST Reports



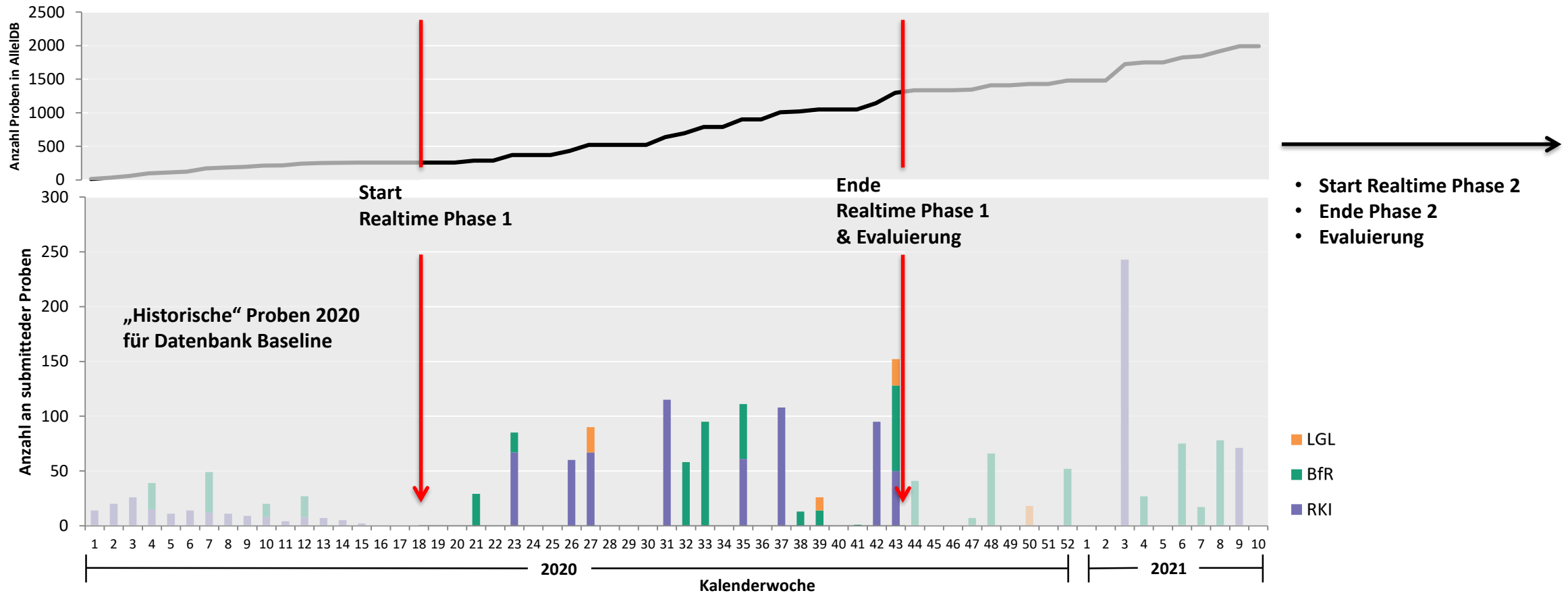
Realtime Genomsequenzierung - Ergebniskommunikation





Realtime Genomsequenzierung

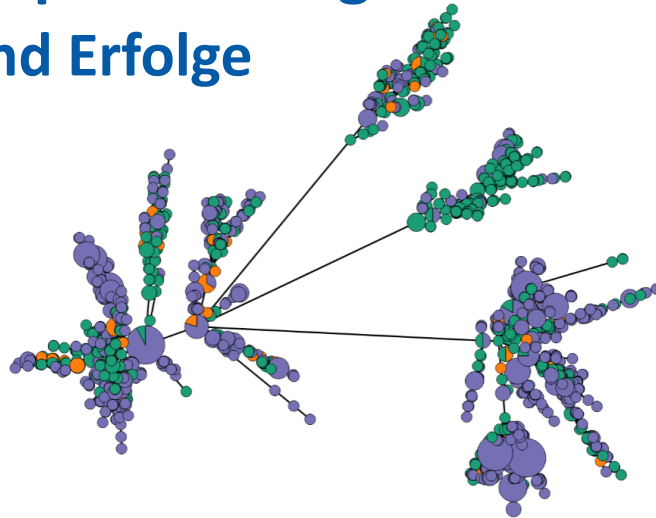
- Verlauf der Realtime Phase



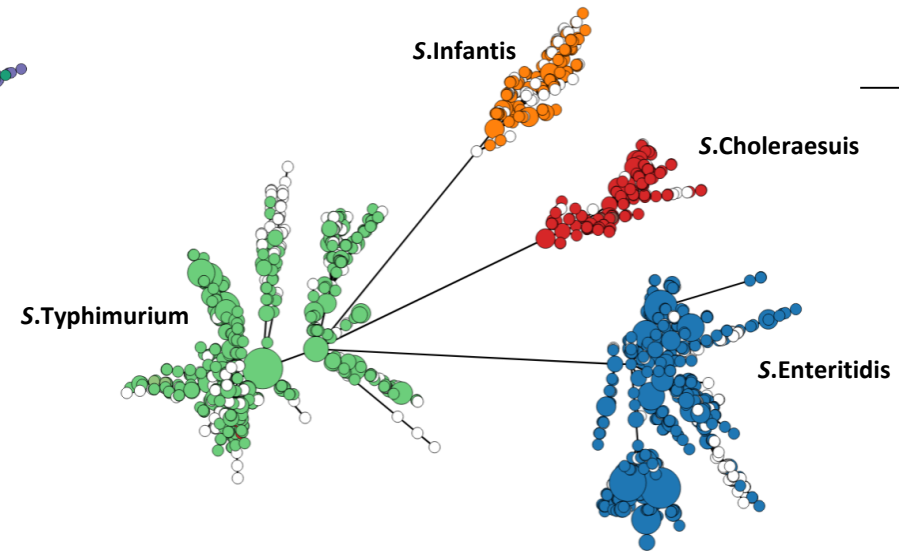
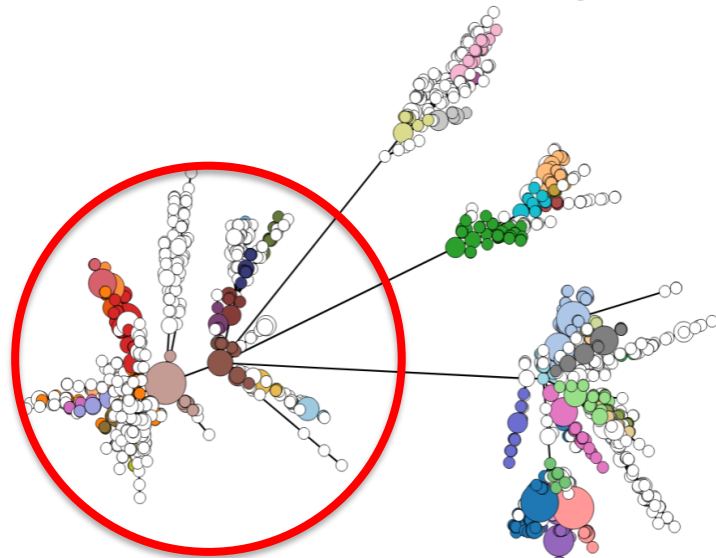
Realtime Genomsequenzierung - erste Ergebnisse und Erfolge

Grapetree Visualisierung annotiert

nach Einsender



nach Clusterzuordnung



nach Serovar

Realtime Genomsequenzierung

- Sektorübergreifende Cluster

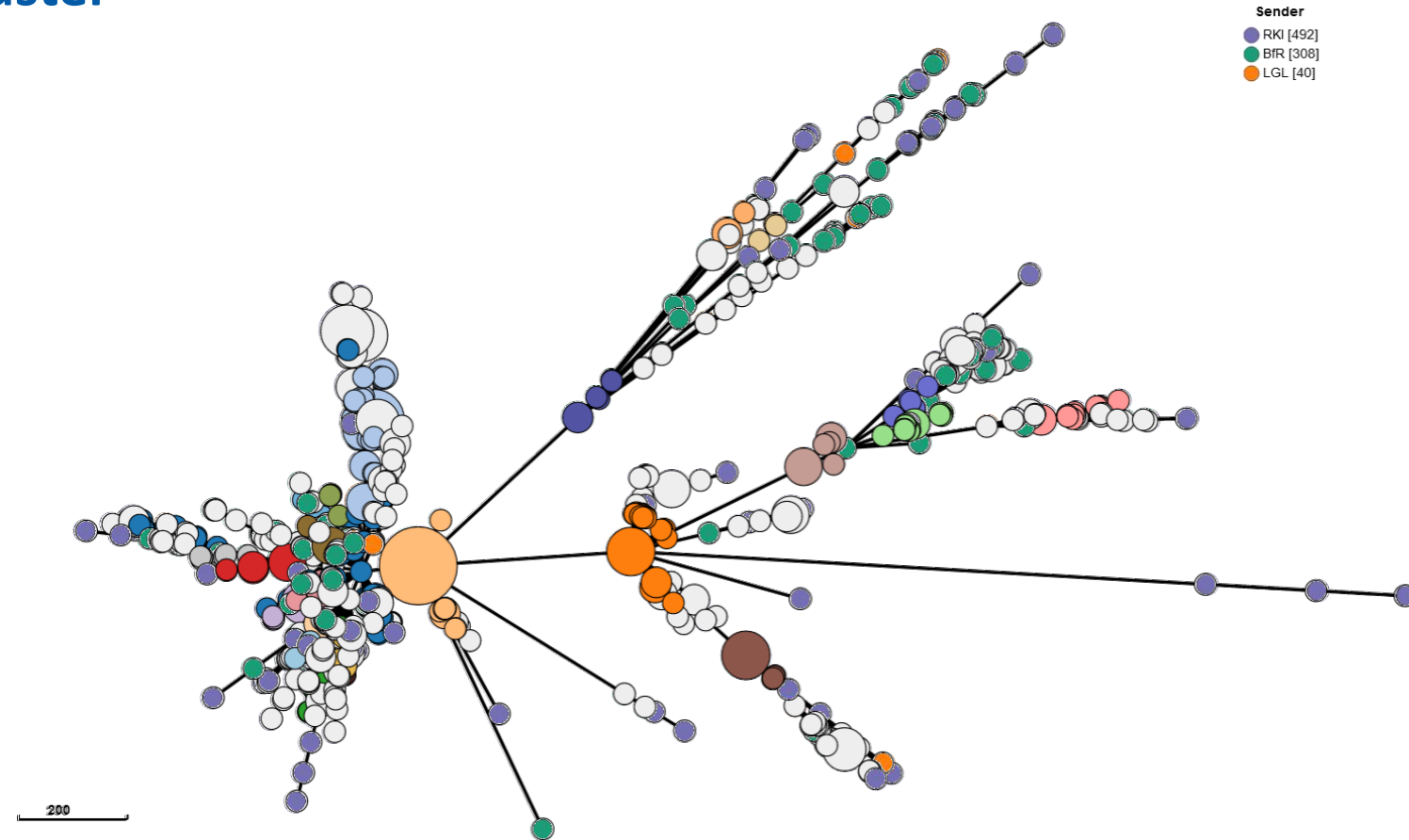
Cluster Threshold: AD10 – AD3
(Nomenklatur: Dichter – Buchstabe)

Antiphon.alpha
Antiphon.beta
...

Datenbankgröße*: 1.999 Samples
- 471 Orphans
- 1.528 Isolate in Clustern

Anzahl Cluster

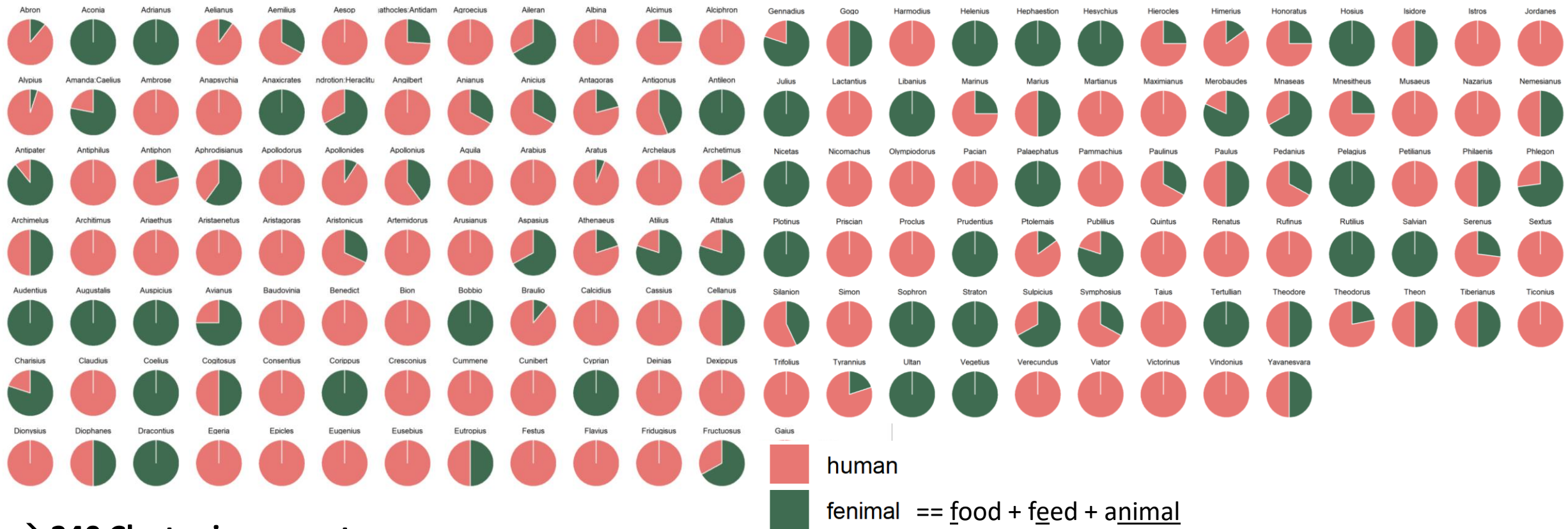
AD10:	240
AD10 _{Different Sender} :	99
AD3 _{Different Sender} :	65
Davon Cluster mit:	
2 Samples:	9
3 Samples:	9
4 Samples:	11
5 Samples:	3
>5 Samples:	33



*25.02.2021

Realtime Genomsequenzierung

- Übersicht Cluster – Matrix Composition



→ 240 Cluster insgesamt

→ 60 % der Cluster bestehen aus nur einem Matrix Typ



Ziele/Fazit

- Einsatz WGS ermöglicht Stammvergleich im Hochdurchsatzverfahren mit maximaler Auflösung
 - Beschleunigung Clusterdetektion + Ausbruchsuntersuchung für *Salmonella*
- Enorme Entwicklung in der Sektor-übergreifenden Surveillance in den letzten Jahren
 - Einführung der routinemäßigen NGS führt zur vermehrten Clusterdetektion
 - Intensivierte Kommunikation zwischen NRL und NRZ sowie allen weiteren Akteuren
 - Aber: Erhöhter Arbeitsaufwand durch NGS nicht zu vernachlässigen!
 - Jeder Sequenzierlauf kann bestehende Cluster vergrößern oder neue generieren
 - Kommunikation und Priorisierung!

GenoSalmSurv

- Lizenzfreie Pipeline für die integrierte genom-basierten Surveillance für Salmonellen verfügbar und im Produktivmodus
 - AQUAMIS, BakCharak, chewieSnake
- Datenaustausch (unter Einhaltung Datenschutzrelevanter Fragestellungen) zwischen Instituten realisiert und Sektor-übergreifende Matches identifiziert
- Annähernd automatisierte Cluster Generierung und Matching funktioniert



[Front Microbiol.](#) 2021; 12: 626941.

PMCID: PMC7902525

Published online 2021 Feb 10. doi: [10.3389/fmicb.2021.626941](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626941)

PMID: [33643254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33643254/)

Toward an Integrated Genome-Based Surveillance of *Salmonella enterica* in Germany

[Laura Uelze](#),¹ [Natalie Becker](#),² [Maria Borowiak](#),¹ [Ulrich Busch](#),³ [Alexandra Dangel](#),³ [Carlus Deneke](#),¹ [Jennie Fischer](#),¹ [Antje Flieger](#),⁴ [Sabrina Hepner](#),³ [Ingrid Huber](#),³ [Ulrich Methner](#),⁵ [Jörg Linde](#),⁵ [Michael Pietsch](#),⁴ [Sandra Simon](#),⁴ [Andreas Sing](#),³ [Simon H. Tausch](#),¹ [Istvan Szabo](#),¹ and [Burkhard Malorny](#),^{1,*}



- https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/AQUAMIS
- https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/bakcharak
- https://gitlab.com/bfr_bioinformatics/chewieSnake

Vielen Dank für die Aufmerksamkeit

RKI

Antje Flieger
Sandra Simon
Eva Trost

FG35

MF2

LGL

Ulrich Busch
Andreas Sing
Alexandra Dangel
Ingrid Huber
Sabrina Hepner
Nancy Bretschneider

BVL

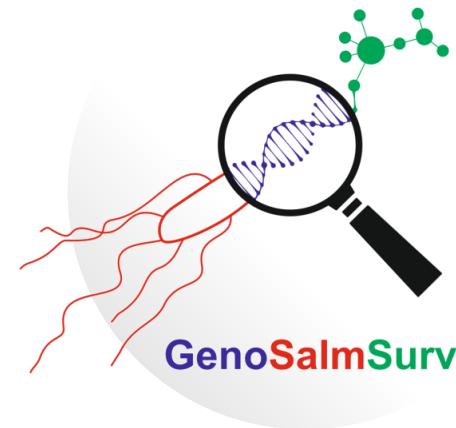
Natalie Becker

BfR

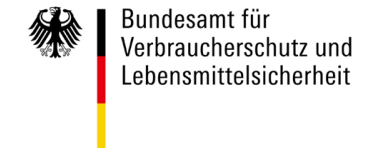
Burkhard Malorny
Istvan Szabo
Jennie Fischer
Carlus Deneke
Simon Tausch
Maria Borowiak
Laura Uelze
Wiebke Burkhard
Marina Lamparter

FLI

Ulrich Methner
Jörg Linde



Bundesministerium
für Gesundheit



Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit