



# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

Dr. Janina Treffon  
Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene

<https://www.biosciencetoday.co.uk>

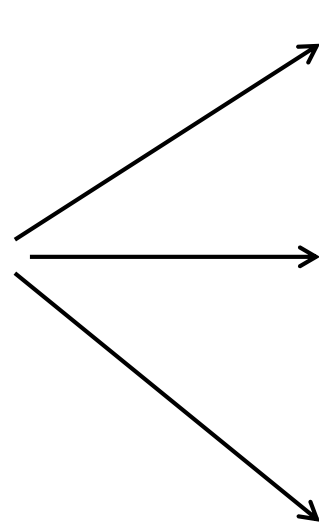
# Definition „Cluster“

---

Im Englischen...

Im Deutschen...

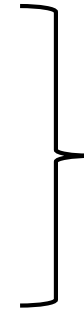
**Cluster**



Gruppierung

Häufung

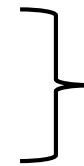
Ausbruch



*Kleine bzw. größere  
Erregeransammlung (meist  
verschiedene Stämme einer Spezies)*

*Kein Infektionsgeschehen*

*Nicht meldepflichtig*



*Erregerverbreitung mit zeitlichem  
und örtlichem Zusammenhang (meist  
ein bestimmter Stamm einer Spezies)*

*Infektionsgeschehen*

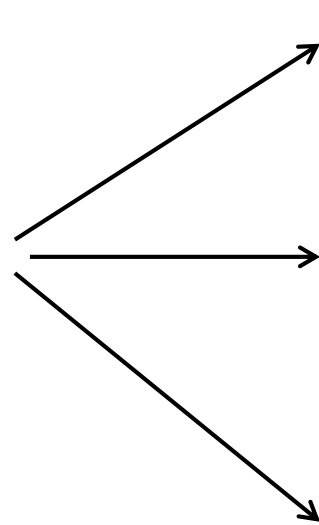
*Meldepflichtig*

# Definition „Cluster“

Im Englischen...

Im Deutschen...

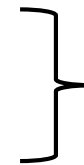
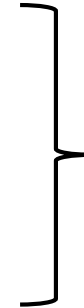
**Cluster**



Gruppierung

Häufung

Ausbruch



*Kleine bzw. größere  
Erregeransammlung (meist  
verschiedene Stämme einer Spezies)*

*Kein Infektionsgeschehen*

*Nicht meldepflichtig*

*Erregerverbreitung mit zeitlichem  
und örtlichem Zusammenhang (meist  
ein bestimmter Stamm einer Spezies)*

*Infektionsgeschehen*

*Meldepflichtig*

Nachverfolgung **genetisch identischer/ähnlicher** Erreger  
mit Cluster-spezifischen Screening-Assays

# Wieso ist Erregernachverfolgung wichtig?

---

- Weltweit viele Todesfälle assoziiert mit (multi)resistenten Bakterien
- (Multi)resistente Bakterien verursachen hohe Kosten für das Gesundheitssystem (Therapie, Hygienemaßnahmen)

> [Lancet](#). 2022 Feb 12;399(10325):629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0. Epub 2022 Jan 19.

## **Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis**

[Antimicrobial Resistance Collaborators](#)

[PLoS One](#). 2016; 11(2): e0149226.

Published online 2016 Feb 10. doi: [10.1371/journal.pone.0149226](#)

## **Cost-Analysis of Seven Nosocomial Outbreaks in an Academic Hospital**

[Jan-Willem H. Dik](#),<sup>1</sup> [Ariane G. Dinkelacker](#),<sup>1,2</sup> [Pepijn Vemer](#),<sup>3,4,5</sup> [Jerome R. Lo-Ten-Foe](#),<sup>1</sup> [Mariëtte Lokate](#),<sup>1</sup> [Bhanu Sinha](#),<sup>1</sup> [Alex W. Friedrich](#),<sup>1,\*</sup> and [Maarten J. Postma](#)<sup>3,4,5</sup>

# Wieso ist Erregernachverfolgung wichtig?

- Weltweit viele Todesfälle assoziiert mit (multi)resistenten Bakterien
- (Multi)resistente Bakterien verursachen hohe Kosten für Gesundheitssystem (Therapie, Hygienemaßnahmen)

**Übertragungen/Ausbrüche verstärken Problem**

> [Lancet](#). 2022 Feb 12;399(10325):629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00451-0.  
**Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis**  
Antimicrobial Resistance Collaborators

[PLoS One](#). 2016; 11(2): e0149226.  
Published online 2016 Feb 10. doi: [10.1371/journal.pone.0149226](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149226)  
**Cost-Analysis of Seven Nosocomial Outbreaks in an Academic Hospital**  
[Jan-Willem H. Dik](#),<sup>1</sup> [Ariane G. Dinkelacker](#),<sup>1,2</sup> [Pepijn Vemer](#),<sup>3,4,5</sup> [Jerome R. Lo-Ten-Foe](#),<sup>1</sup> [Mariëtte Lokate](#),<sup>1</sup>  
[Bhanu Sinha](#),<sup>1</sup> [Alex W. Friedrich](#),<sup>1,\*</sup> and [Maarten J. Postma](#)<sup>3,4,5</sup>

# Wieso ist Erregernachverfolgung wichtig?

- Weltweit viele Todesfälle assoziiert mit (multi)resistenten Bakterien
- (Multi)resistente Bakterien verursachen hohe Kosten für Gesundheitssystem (Therapie, Hygienemaßnahmen)

**Übertragungen/Ausbrüche verstärken Problem**

> [Lancet](#). 2022 Feb 12;399(10325):629-655. doi: [10.1016/S0140-6736\(22\)00441-1](#).  
**Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis**  
Antimicrobial Resistance Collaborators

[PLoS One](#). 2016; 11(2): e0149226.  
Published online 2016 Feb 10. doi: [10.1371/journal.pone.0149226](#)  
**Cost-Analysis of Seven Nosocomial Outbreaks in an Academic Hospital**  
[Jan-Willem H. Dik](#),<sup>1</sup> [Ariane G. Dinkelacker](#),<sup>1,2</sup> [Pepijn Vemer](#),<sup>3,4,5</sup> [Jerome R. Lo-Ten-Foe](#),<sup>1</sup> [Mariëtte Lokate](#),<sup>1</sup> [Bhanu Sinha](#),<sup>1</sup> [Alex W. Friedrich](#),<sup>1,\*</sup> and [Maarten J. Postma](#)<sup>3,4,5</sup>



## EHEC-Ausbruch in Deutschland, 2011

- 3.842 Erkrankte
- 53 Todesfälle

**EHEC: Als Sprossen eine Krise auslösten**

# Wieso ist Erregernachverfolgung wichtig?

- Weltweit viele Todesfälle assoziiert mit (multi)resistenten Bakterien
- (Multi)resistente Bakterien verursachen hohe Kosten für Gesundheitssystem (Therapie, Hygienemaßnahmen)

**Übertragungen/Ausbrüche verstärken Problem**

> [Lancet](#). 2022 Feb 12;399(10325):629-655. doi: 10.1016/S0140-6736(22)00111-1.  
**Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis**  
Antimicrobial Resistance Collaborators

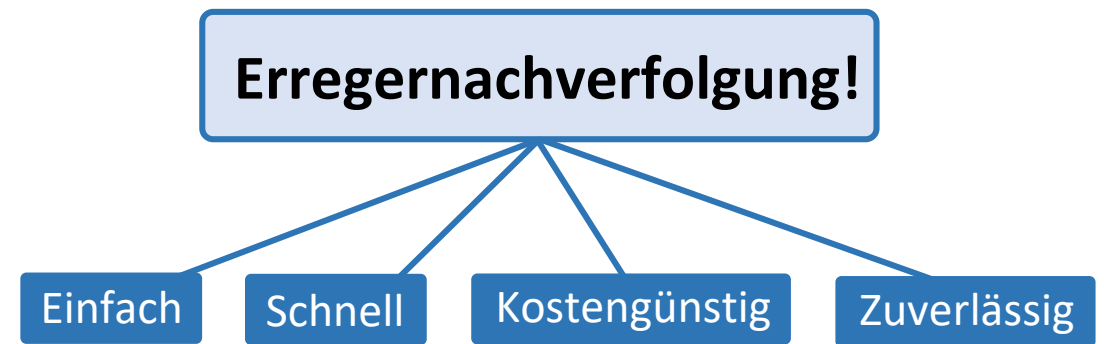
[PLoS One](#). 2016; 11(2): e0149226.  
Published online 2016 Feb 10. doi: [10.1371/journal.pone.0149226](#)  
**Cost-Analysis of Seven Nosocomial Outbreaks in an Academic Hospital**  
[Jan-Willem H. Dik](#),<sup>1</sup> [Ariane G. Dinkelacker](#),<sup>1,2</sup> [Pepijn Vemer](#),<sup>3,4,5</sup> [Jerome R. Lo-Ten-Foe](#),<sup>1</sup> [Mariëtte Lokate](#),<sup>1</sup> [Bhanu Sinha](#),<sup>1</sup> [Alex W. Friedrich](#),<sup>1,\*</sup> and [Maarten J. Postma](#)<sup>3,4,5</sup>



**EHEC: Als Sprossen eine Krise auslösten**

## EHEC-Ausbruch in Deutschland, 2011

- 3.842 Erkrankte
- 53 Todesfälle



# Wie funktioniert Erregernachverfolgung?

---

## Schritt 1: Beprobung und Probenverarbeitung

Probenmaterial sammeln, DNA isolieren, Bakterien kultivieren



# Wie funktioniert Erregernachverfolgung?

---

## Schritt 1: Beprobung und Probenverarbeitung

Probenmaterial sammeln, DNA isolieren, Bakterien kultivieren

## Schritt 2: Screening-Assay

Sensitiver Assay, der die **schnelle** Identifizierung eines bestimmten Bakterienstammes **in hunderten Proben** ermöglicht

→ *Nachweis geringer Bakterienkonzentrationen*

→ *Einbußen bei der Spezifität werden zugunsten einer hohen Sensitivität toleriert*

→ *Nachweis Stamm-spezifischer Unterschiede (z.B. auf DNA-Level → PCR-Assay)*

# Wie funktioniert Erregernachverfolgung?

---

## Schritt 1: Beprobung und Probenverarbeitung

Probenmaterial sammeln, DNA isolieren, Bakterien kultivieren

## Schritt 2: Screening-Assay

Sensitiver Assay, der die **schnelle** Identifizierung eines bestimmten Bakterienstammes **in hunderten Proben** ermöglicht

→ *Nachweis geringer Bakterienkonzentrationen*

→ *Einbußen bei der Spezifität werden zugunsten einer hohen Sensitivität toleriert*

→ *Nachweis Stamm-spezifischer Unterschiede (z.B. auf DNA-Level → PCR-Assay)*

## Schritt 3: Bestätigungstest

Spezifischer Test, der die **korrekte Zuordnung** einzelner identifizierter Bakterienstämme zu einem bestimmten Cluster bestätigt

→ *Muss nicht sehr sensitiv sein, dafür sehr spezifisch*

# Wie funktioniert Erregernachverfolgung?

---

## Schritt 1: Beprobung und Probenverarbeitung

Probenmaterial sammeln, DNA isolieren, Bakterien kultivieren

## Schritt 2: Screening-Assay

Sensitiver Assay, der die **schnelle** Identifizierung eines bestimmten Bakterienstammes **in hunderten Proben** ermöglicht

→ *Nachweis geringer Bakterienkonzentrationen*

→ *Einbußen bei der Spezifität werden zugunsten einer hohen Sensitivität toleriert*

→ *Nachweis Stamm-spezifischer Unterschiede (z.B. auf DNA-Level → PCR-Assay)*

## Schritt 3: Bestätigungstest

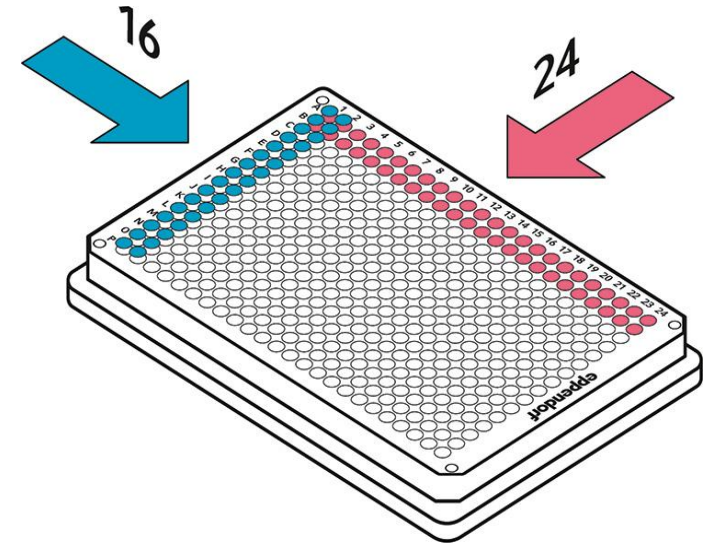
Spezifischer Test, der die **korrekte Zuordnung** einzelner identifizierter Bakterienstämme zu einem bestimmten Cluster bestätigt

→ *Muss nicht sehr sensitiv sein, dafür sehr spezifisch*

# PCR-basierte Assays

## Vorteile

- Assaydesign und Assaydurchführung einfach und schnell
- Gezielter Nachweis von Genen, DNA-Abschnitten, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs)
- Sensitiv (Nachweis von 10 DNA-Kopien möglich)
- Nachweis sowohl mit reiner DNA als auch aus Primärmaterial
- Hochskalierbar



<https://handling-solutions.eppendorf.com>

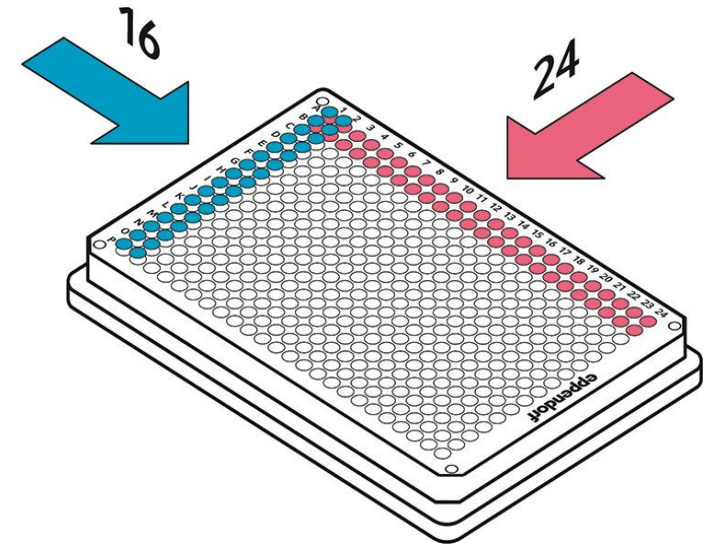
# PCR-basierte Assays

## Vorteile

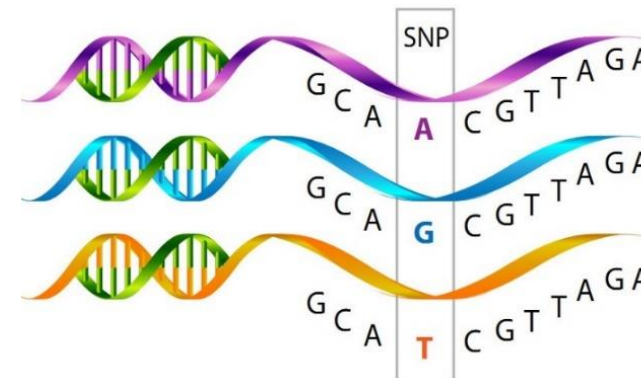
- Assaydesign und Assaydurchführung einfach und schnell
- Gezielter Nachweis von Genen, DNA-Abschnitten, *single nucleotide polymorphisms* (SNPs)
- Sensitiv (Nachweis von 10 DNA-Kopien möglich)
- Nachweis sowohl mit reiner DNA als auch aus Primärmaterial
- Hochskalierbar

## Nachteile

- Assayentwicklung auf Basis von Sequenz-Daten
- Real-time PCRs teuer



<https://handling-solutions.eppendorf.com>



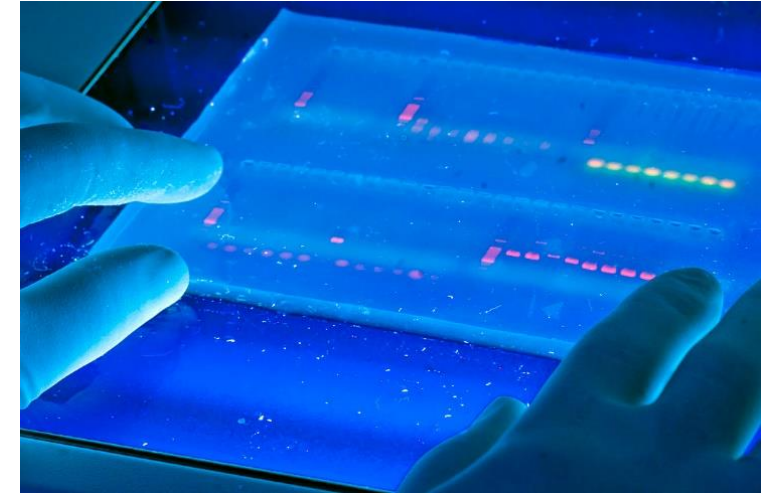
<https://standardofcare.com>

# PCR-basierte Screening-Assays: Methoden

---

## Konventionelle PCR mit Agarosegelelektrophorese

- Differenzierung über An-/Abwesenheit bestimmter Gene/DNA-Abschnitte

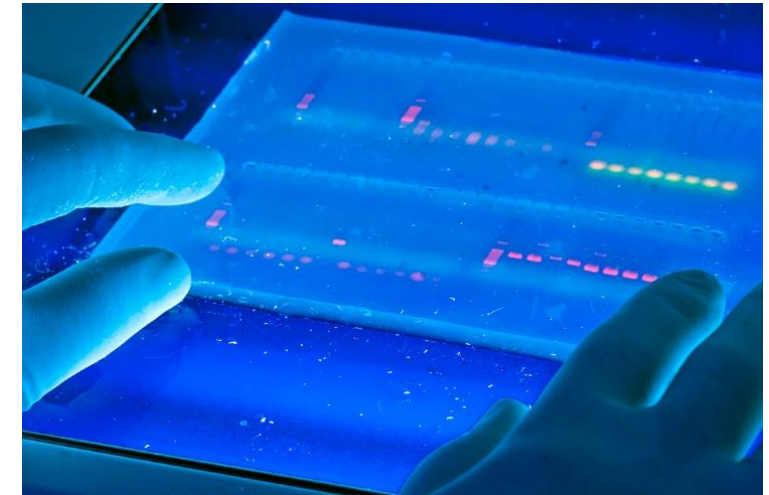


<https://weblogographic.com>

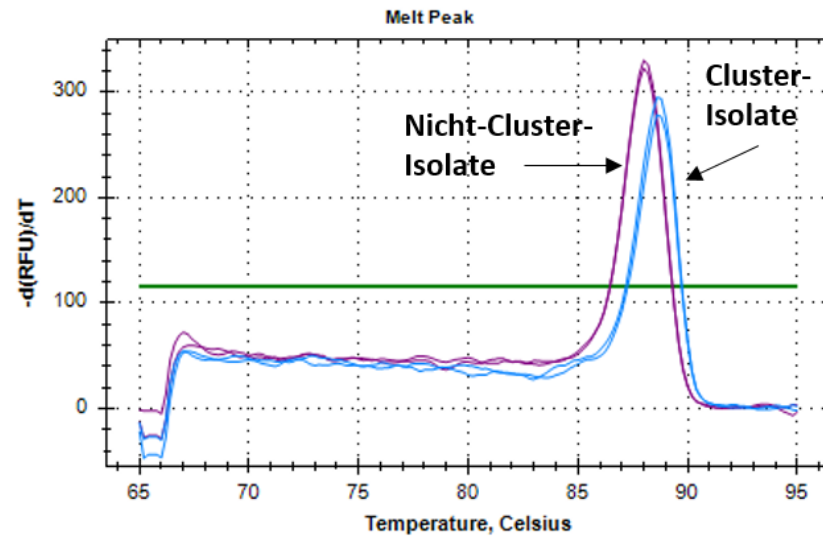
# PCR-basierte Screening-Assays: Methoden

## Konventionelle PCR mit Agarosegelelektrophorese

- Differenzierung über An-/Abwesenheit bestimmter Gene/DNA-Abschnitte



<https://weblogographic.com>



Treffon et al. 2023. J Clin Microbiol. 61(3):e0187322  
(modifiziert)

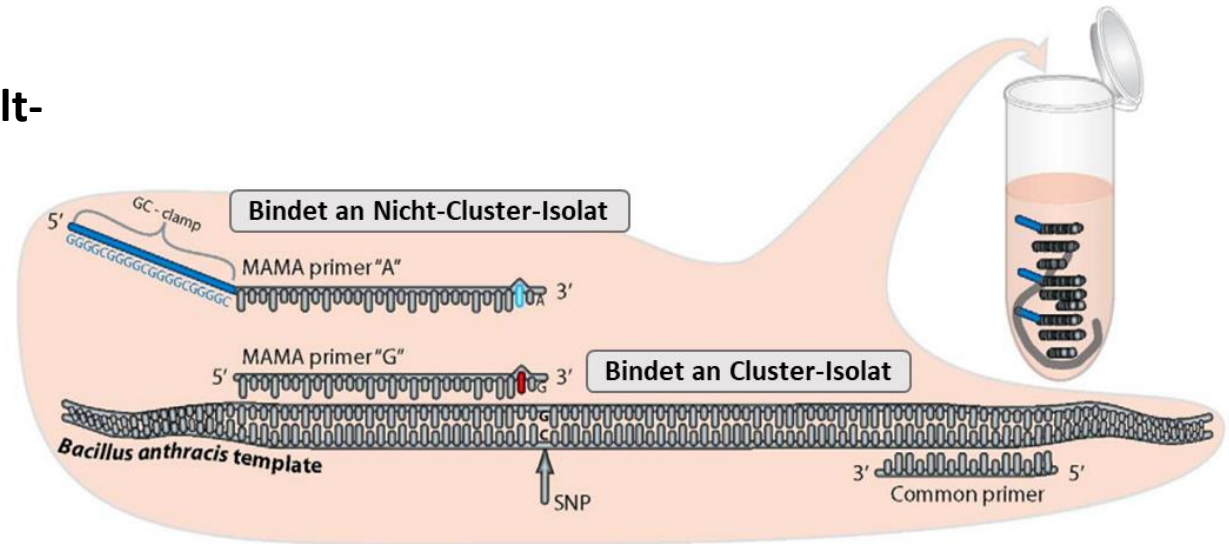
## High-resolution melting (HRM) real-time PCR

- Differenzierung über GC-Gehalt bestimmter DNA-Abschnitte mittels Schmelzkurvenanalyse

# PCR-basierte Screening-Assays: Methoden

## Melt analysis of mismatch amplification mutation (Melt-MAMA) real-time PCR

- Differenzierung über GC-Gehalt oder SNPs
- Anwendbar als real-time PCR oder konventionelle PCR



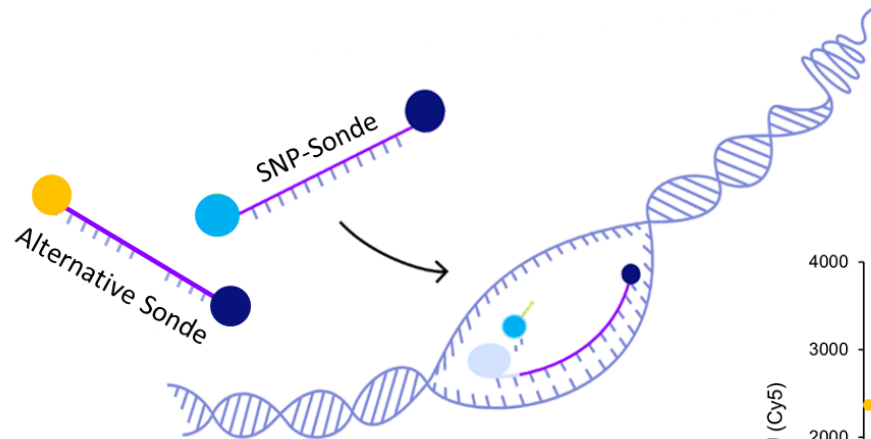
Birdsell et al. 2012. PLoS One 7:e32866



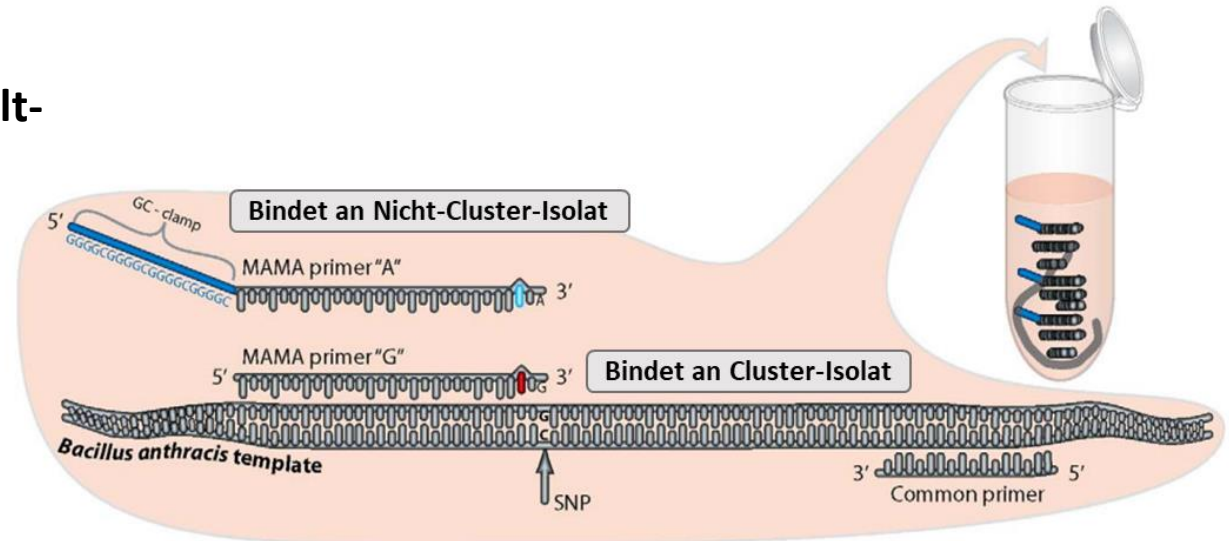
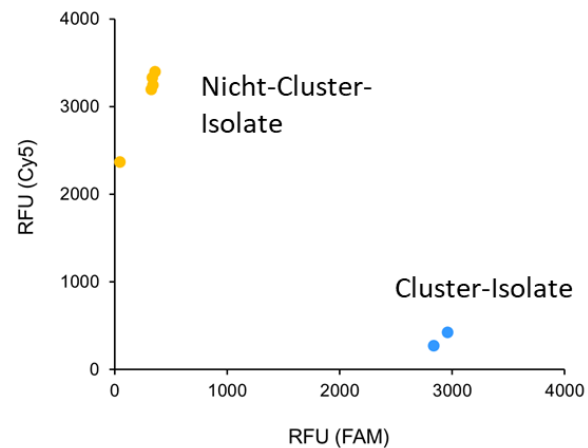
# PCR-basierte Screening-Assays: Methoden

## Melt analysis of mismatch amplification mutation (Melt-MAMA) real-time PCR

- Differenzierung über GC-Gehalt oder SNPs
- Anwendbar als real-time PCR oder konventionelle PCR



<https://kilobaser.com> (modifiziert)



Birdsell et al. 2012. PLoS One 7:e32866

## TaqMan real-time PCR

- Differenzierung über SNPs
- Einfacheres Assaydesign als bei Melt-MAMA-PCR

# Wie funktioniert Erregernachverfolgung?

---

## Schritt 1: Beprobung und Probenverarbeitung

Probenmaterial sammeln, DNA isolieren, Bakterien kultivieren

## Schritt 2: Screening-Assay

Sensitiver Assay, der die **schnelle** Identifizierung eines bestimmten Bakterienstammes **in hunderten Proben** ermöglicht

→ *Nachweis geringer Bakterienkonzentrationen*

→ *Einbußen bei der Spezifität werden zugunsten einer hohen Sensitivität toleriert*

→ *Nachweis Stamm-spezifischer Unterschiede (z.B. auf DNA-Level → PCR-Assay)*

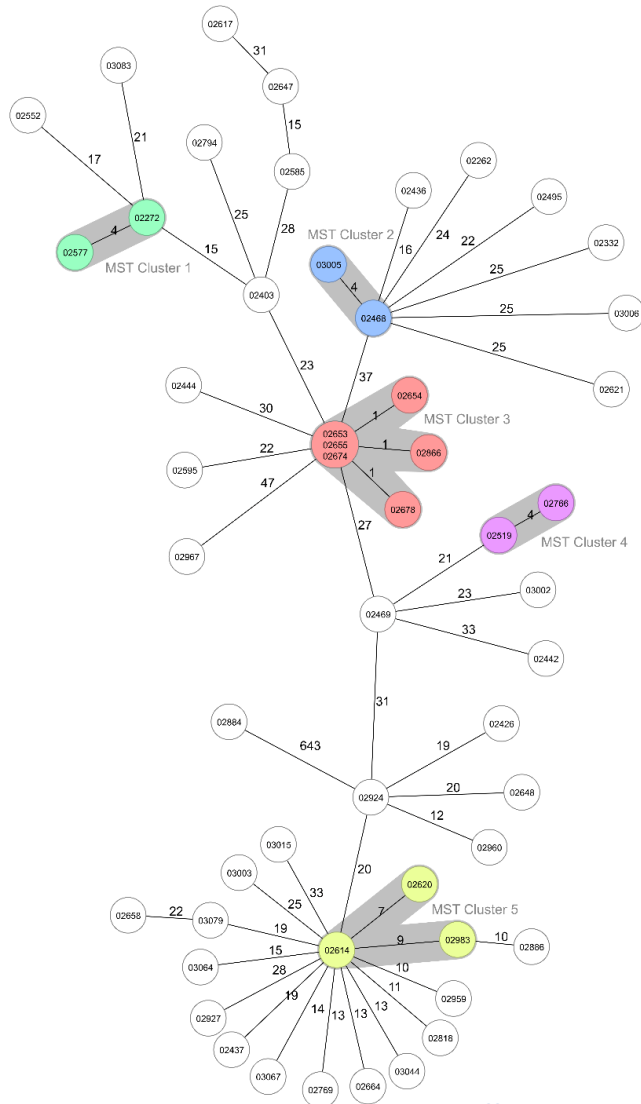
## Schritt 3: Bestätigungstest

Spezifischer Test, der die **korrekte Zuordnung** einzelner identifizierter Bakterienstämme zu einem bestimmten Cluster

bestätigt

→ *Muss nicht sehr sensitiv sein, dafür sehr spezifisch*

# Bestätigungstests



Treffon et al. 2023. J Clin Microbiol. 61(3):e0187322

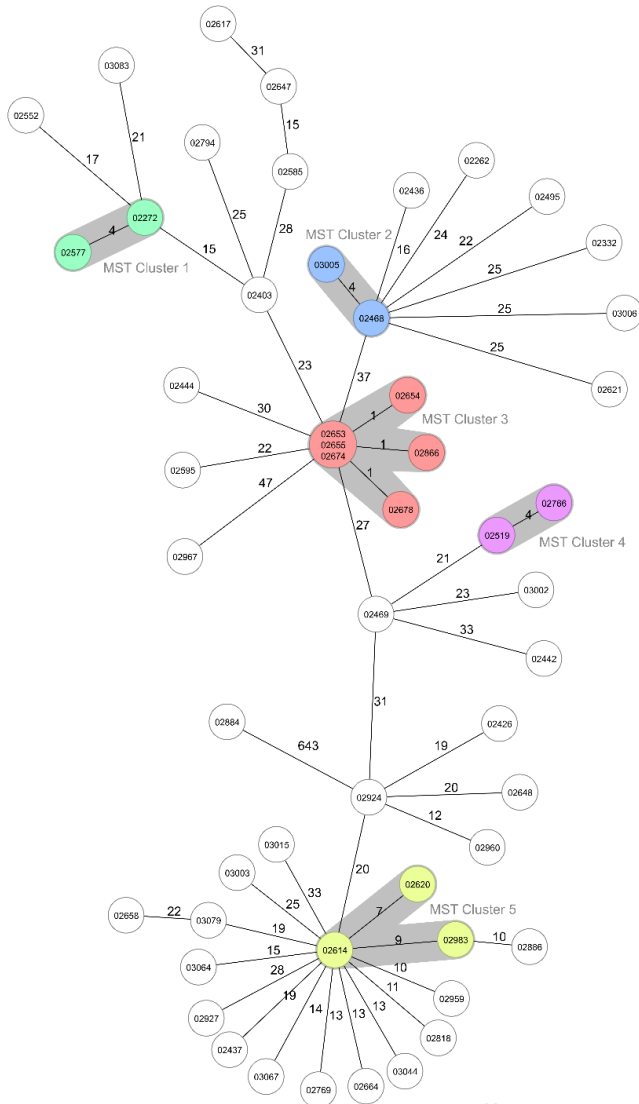
## Sequenz-basierte Methoden

z.B. Ganzgenomsequenzierung  
(*whole genome sequencing, WGS*)



<https://forschungsinfrastruktur.bmbwf.gv.at/>;  
<https://www.genome.gov>

# Bestätigungstests



Treffon et al. 2023. J Clin Microbiol. 61(3):e0187322

## Sequenz-basierte Methoden

z.B. Ganzgenomsequenzierung  
(*whole genome sequencing, WGS*)

### Vorteile

- Hohe Auflösung
- Nachweis kleinster genetischer Unterschiede (bis zu einem SNP)

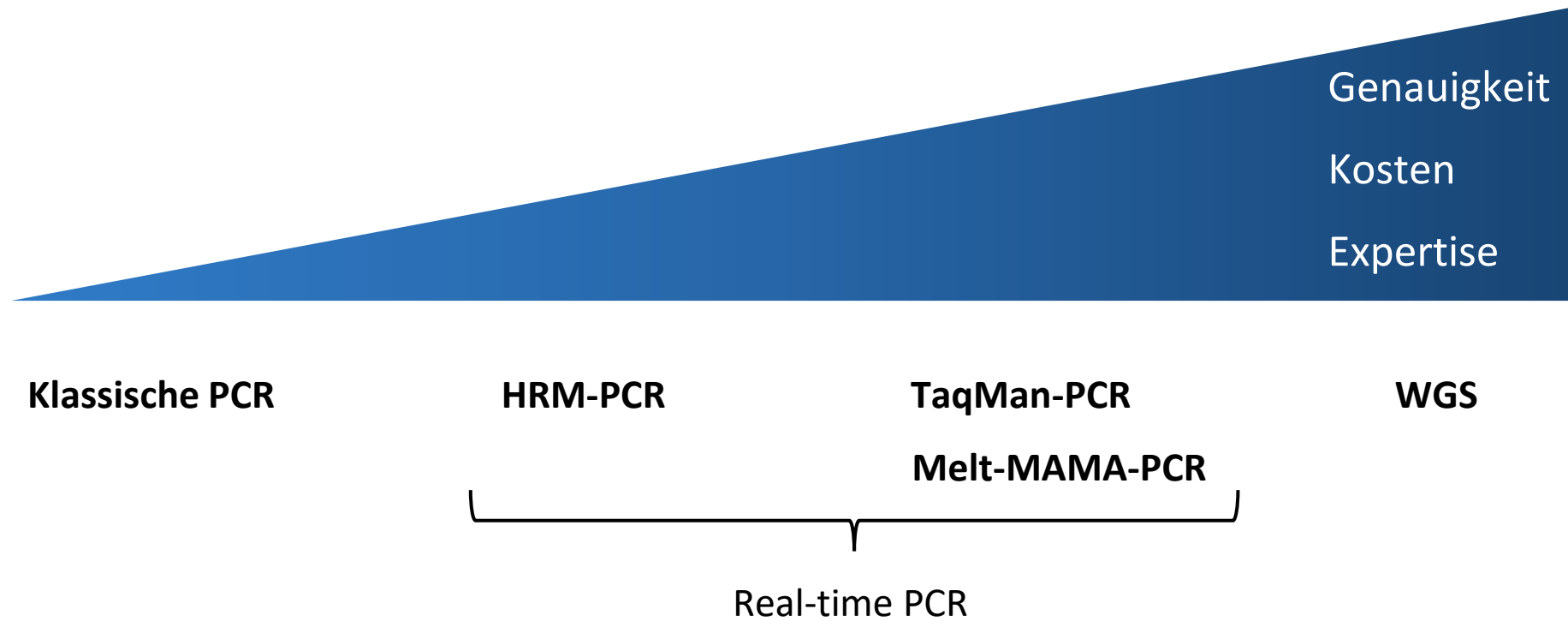
### Nachteile

- Zeit-, arbeits- und kostenintensiv
- Tiefgehende Expertise nötig

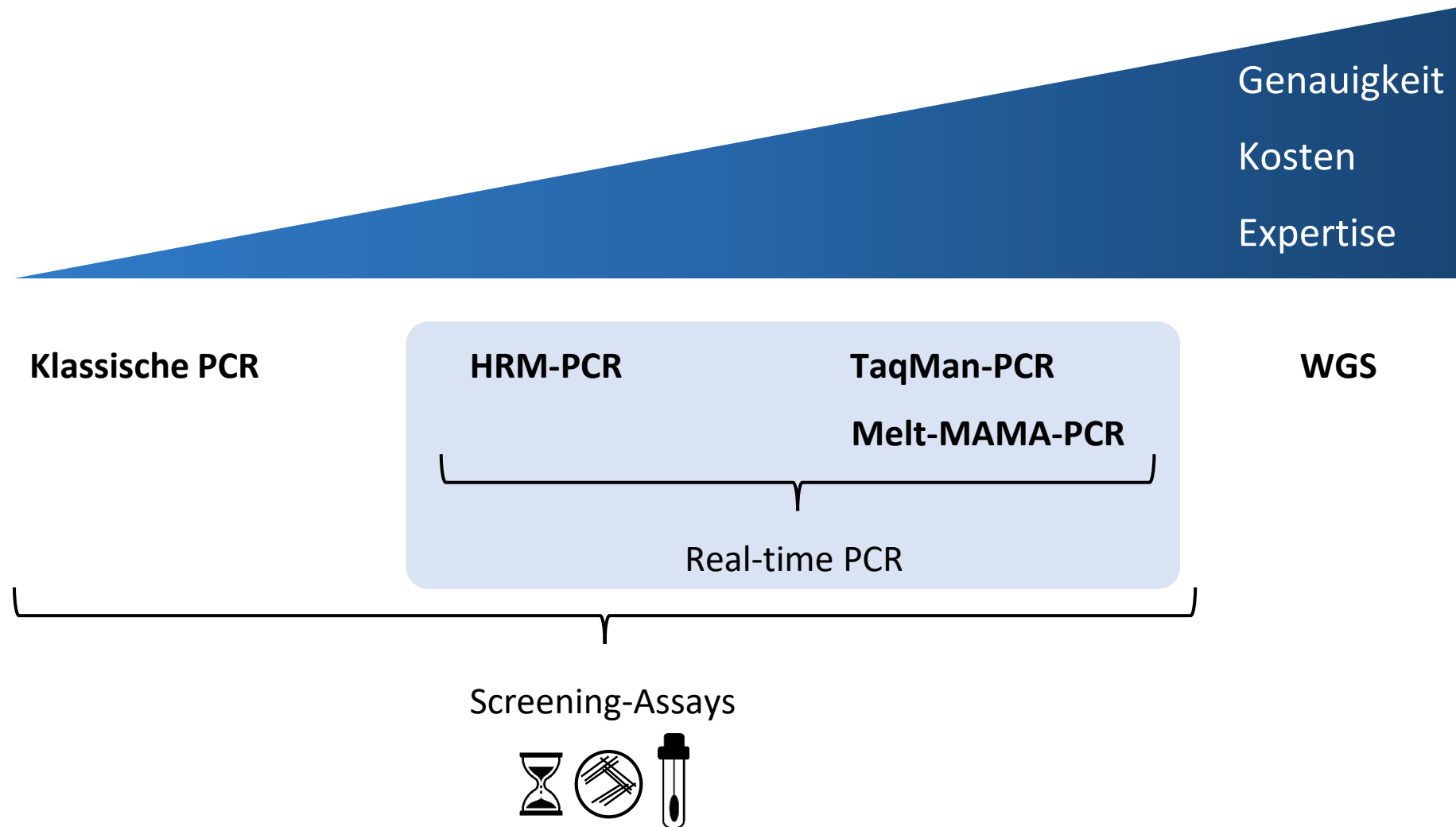


<https://forschungsinfrastruktur.bmbwf.gv.at/>  
<https://www.genome.gov>

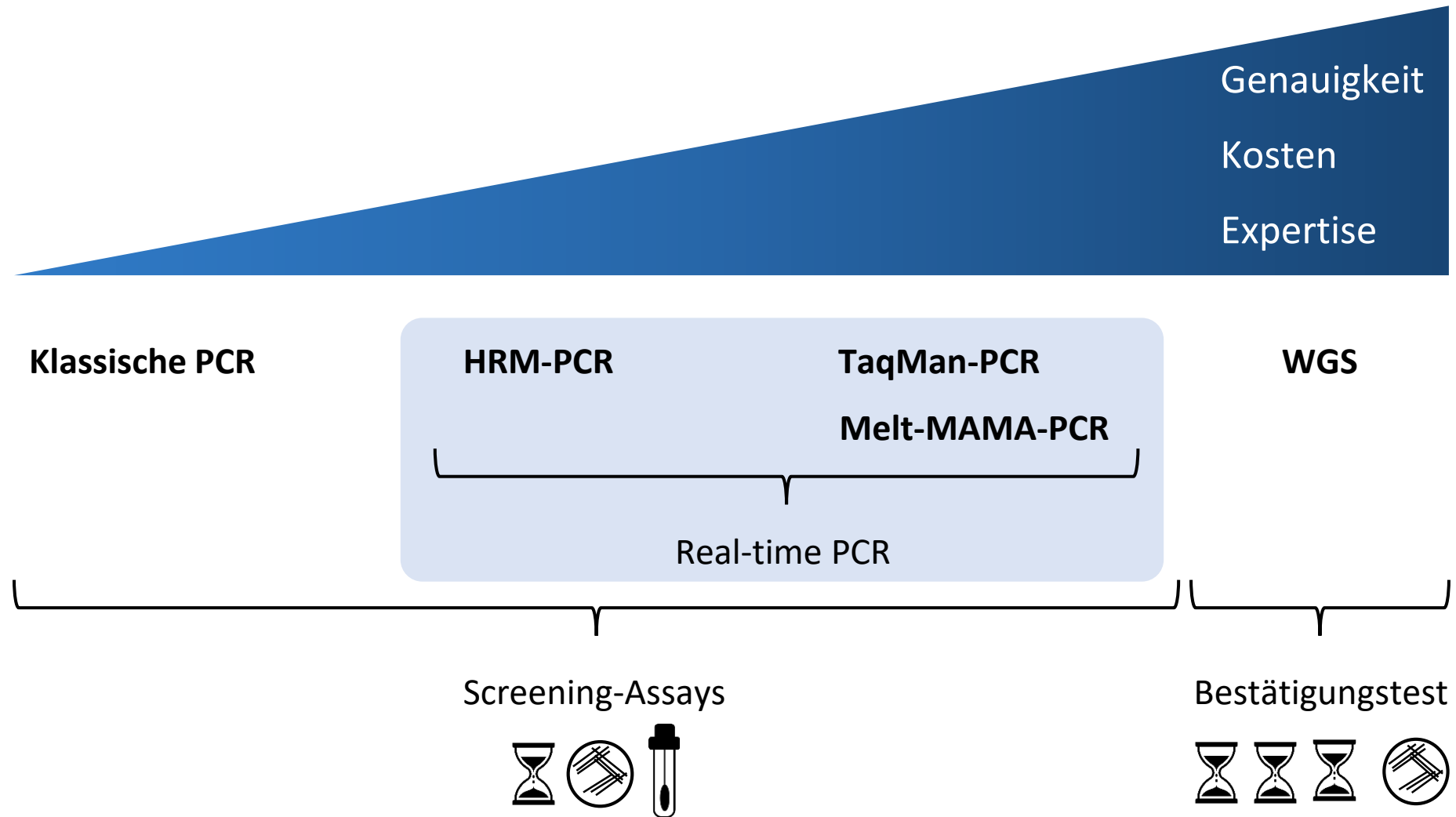
# Übersicht Screening Assays/Bestätigungstest für Erregernachverfolgung



# Übersicht Screening Assays/Bestätigungstest für Erregernachverfolgung



# Übersicht Screening Assays/Bestätigungstest für Erregernachverfolgung



# Beispiele für Cluster-spezifische PCR-Screening-Assays

## Bielaszewska *et al.* 2011

- *Escherichia coli* O104:H4 (EHEC)
- Gen-spezifische klassische Multiplex-PCR

> [Lancet Infect Dis.](#) 2011 Sep;11(9):671-6. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7. Epub 2011 Jun 22.

**Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study**

Martina Bielaszewska <sup>1</sup>, Alexander Mellmann, Wenlan Zhang, Robin Köck, Angelika Fruth, Andreas Bauwens, Georg Peters, Helge Karch

## Zhang *et al.* 2012

- *Escherichia coli* O104:H4 (EHEC)
- Gen-spezifische real-time Multiplex-PCR
- Rudimentär aufgereinigte Stuhlproben

[J Clin Microbiol.](#) 2012 May; 50(5): 1752–1754.

PMCID: PMC3347122

doi: [10.1128/JCM.06817-11](#)

PMID: [22337987](#)

Real-Time Multiplex PCR for Detecting Shiga Toxin 2-Producing *Escherichia coli* O104:H4 in Human Stools

[Wenlan Zhang](#),<sup>a</sup> [Martina Bielaszewska](#),<sup>a</sup> [Andreas Bauwens](#),<sup>a</sup> [Angelika Fruth](#),<sup>b</sup> [Alexander Mellmann](#),<sup>a,c</sup> and [Helge Karch](#)<sup>¶</sup>  
a,c



# Beispiele für Cluster-spezifische PCR-Screening-Assays

## Bielaszewska *et al.* 2011

- *Escherichia coli* O104:H4 (EHEC)
- Gen-spezifische klassische Multiplex-PCR

> [Lancet Infect Dis.](#) 2011 Sep;11(9):671-6. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70165-7. Epub 2011 Jun 22.

### Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study

Martina Bielaszewska <sup>1</sup>, Alexander Mellmann, Wenlan Zhang, Robin Köck, Angelika Fruth, Andreas Bauwens, Georg Peters, Helge Karch

## Zhang *et al.* 2012

- *Escherichia coli* O104:H4 (EHEC)
- Gen-spezifische real-time Multiplex-PCR
- Rudimentär aufgereinigte Stuhlproben

[J Clin Microbiol.](#) 2012 May; 50(5): 1752–1754.

PMCID: PMC3347122

doi: [10.1128/JCM.06817-11](#)

PMID: [22337987](#)

### Real-Time Multiplex PCR for Detecting Shiga Toxin 2-Producing *Escherichia coli* O104:H4 in Human Stools

[Wenlan Zhang](#),<sup>a</sup> [Martina Bielaszewska](#),<sup>a</sup> [Andreas Bauwens](#),<sup>a</sup> [Angelika Fruth](#),<sup>b</sup> [Alexander Mellmann](#),<sup>a,c</sup> and [Helge Karch](#)<sup>a,c</sup>

## Pérez-Lago *et al.* 2016

- *Mycobacterium tuberculosis*
- Allel-spezifische klassische Multiplex-PCR
- Entwicklungszeit: über ein Monat

[J Clin Microbiol.](#) 2016 Dec; 54(12): 2969–2974.

PMCID: PMC5121387

Published online 2016 Nov 23. Prepublished online 2016 Sep 28. doi: [10.1128/JCM.01718-16](#)

PMID: [27682128](#)

### Urgent Implementation in a Hospital Setting of a Strategy To Rule Out Secondary Cases Caused by Imported Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains at Diagnosis

[Laura Pérez-Lago](#),<sup>a,b,c</sup> [Miguel Martínez-Lirola](#),<sup>d</sup> [Sergio García](#),<sup>d</sup> [Marta Herranz](#),<sup>a,b,c</sup> [Igor Mokrousov](#),<sup>e</sup> [Iñaki Comas](#),<sup>f,g</sup> [Llúcia Martínez-Priego](#),<sup>h</sup> [Emilio Bouza](#),<sup>a,b,c</sup> and [Darío García-de-Viedma](#)<sup>g,a,b,c</sup>

# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

---

- 1.) Ansammlung/Verbreitung eines bestimmten Bakterienstammes → Cluster?
- 2.) Ganzgenomsequenzierung einiger Cluster-Isolate (*je mehr, desto besser*)
- 3.) Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen/SNPs mit bioinformatischen Tools
- 4.) (Real-time) PCR-Design
- 5.) Kleiner Funktionstest
- 6.) Screening nach Cluster-Isolaten
- 7.) Bestätigung einzelner Isolate mittels WGS

# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

---

1.) Ansammlung/Verbreitung eines bestimmten Bakterienstammes → Cluster?

2.) Ganzgenomsequenzierung einiger Cluster-Isolate (*je mehr, desto besser*)

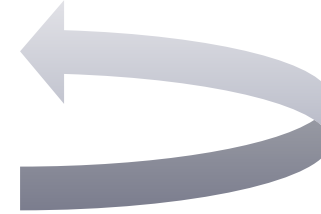
3.) Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen/SNPs mit bioinformatischen Tools

4.) (Real-time) PCR-Design

5.) Kleiner Funktionstest

6.) Screening nach Cluster-Isolaten

7.) Bestätigung einzelner Isolate mittels WGS



# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

---

1.) Ansammlung/Verbreitung eines bestimmten Bakterienstammes → Cluster?

2.) Ganzgenomsequenzierung einiger Cluster-Isolate (*je mehr, desto besser*)

3.) Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen/SNPs mit bioinformatischen Tools

4.) (Real-time) PCR-Design

5.) Kleiner Funktionstest

6.) Screening nach Cluster-Isolaten

7.) Bestätigung einzelner Isolate mittels WGS

# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

1.) Ansammlung/Verbreitung eines bestimmten Bakterienstammes → Cluster?

2.) Ganzgenomsequenzierung einiger Cluster-Isolate (*je mehr, desto besser*)

3.) Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen/SNPs mit bioinformatischen Tools

4.) (Real-time) PCR-Design

5.) Kleiner Funktionstest

6.) Screening nach Cluster-Isolaten

7.) Bestätigung einzelner Isolate mittels WGS

> [Microbiol Spectr.](#) 2022 Dec 21;10(6):e0303622. doi: 10.1128/spectrum.03036-22. Epub 2022 Oct 17.

**Single Nucleotide Polymorphism-Based Real-Time PCR Screening Assay for Rapid Tracking of Bacterial Infection Clusters To Complement Whole-Genome Sequencing Efforts during Outbreak Investigations**

Janina Treffon <sup>1</sup>, Bianca Heppner <sup>1</sup>, Julia Eismann <sup>2</sup>, Julia Bothe <sup>2</sup>, Birgit Omengo <sup>2</sup>, Alexander Mellmann <sup>1</sup>

Multicenter Study > [J Clin Microbiol.](#) 2023 Mar 23;61(3):e0187322. doi: 10.1128/jcm.01873-22.

Epub 2023 Feb 22.

**Multicenter Preparedness Exercise Enables Rapid Development of Cluster-Specific PCR-Based Screening Assays from Bacterial Genomic Data**

Janina Treffon <sup>1 2</sup>, Karola Prior <sup>3</sup>, Johannes Dreesman <sup>4</sup>, Richard Egelkamp <sup>4</sup>, Antje Flieger <sup>5</sup>, Barbara Middendorf-Bauchart <sup>1 2</sup>, Michaela Projahn <sup>6</sup>, Anne Richter <sup>5</sup>, Elisabeth Schuh <sup>6</sup>, Dag Harmsen <sup># 3</sup>, Alexander Mellmann <sup># 1 2</sup>

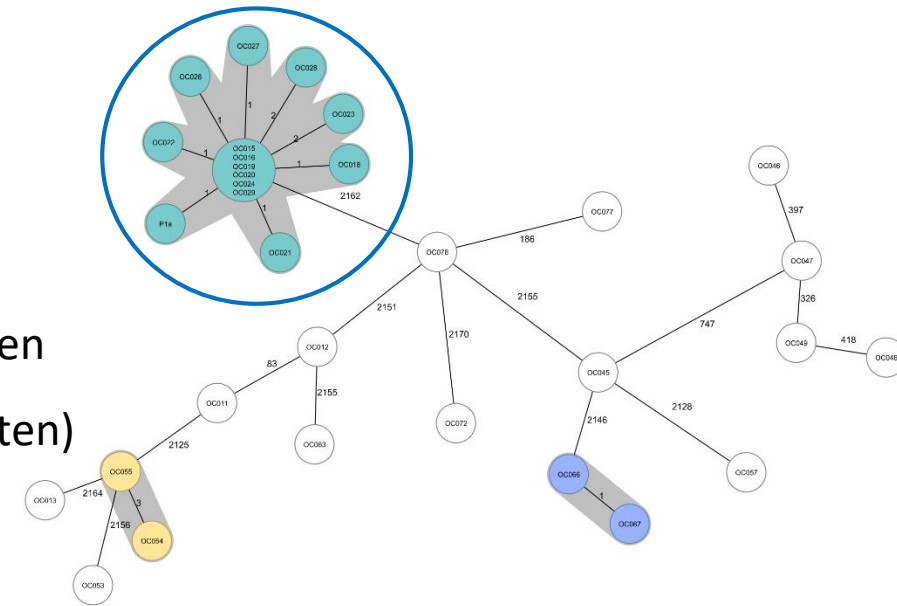
# Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen

---

- Große Auswahl an Software-Tools ([SeqSphere+](#), [RUCS](#), Gegenees, Find Differential Primers, kSNP, ...)

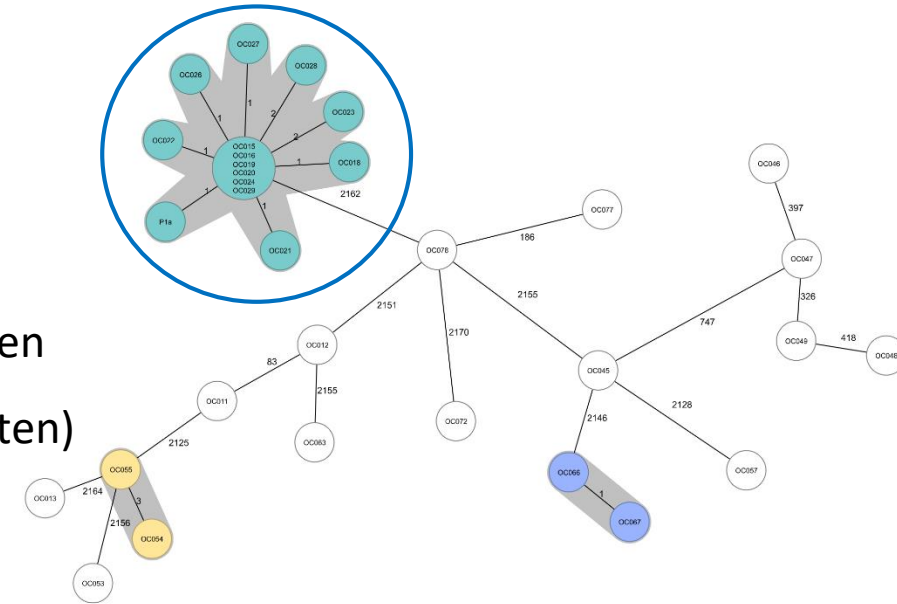
# Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen

- Große Auswahl an Software-Tools ([SeqSphere+](#), [RUCS](#), Gegenees, Find Differential Primers, kSNP, ...)
- **Prinzip:** in WGS-Daten genomische Bereiche oder SNPs finden, die nur in den Cluster-Isolaten vorkommen (und nicht in sporadischen Nicht-Cluster-Isolaten)



# Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen

- Große Auswahl an Software-Tools ([SeqSphere+](#), [RUCS](#), Gegenees, Find Differential Primers, kSNP, ...)
- **Prinzip:** in WGS-Daten genomische Bereiche oder SNPs finden, die nur in den Cluster-Isolaten vorkommen (und nicht in sporadischen Nicht-Cluster-Isolaten)



## Cluster

<b>Isolat 1</b>	ATCCCGTATCGGTA CTTGGCTAGC
<b>Isolat 2</b>	GTATCGGTA CTTGGCATGCCTAC
<b>Isolat 3</b>	GCCGTATCGGTA CTTGGCTTAGGCTATCAG

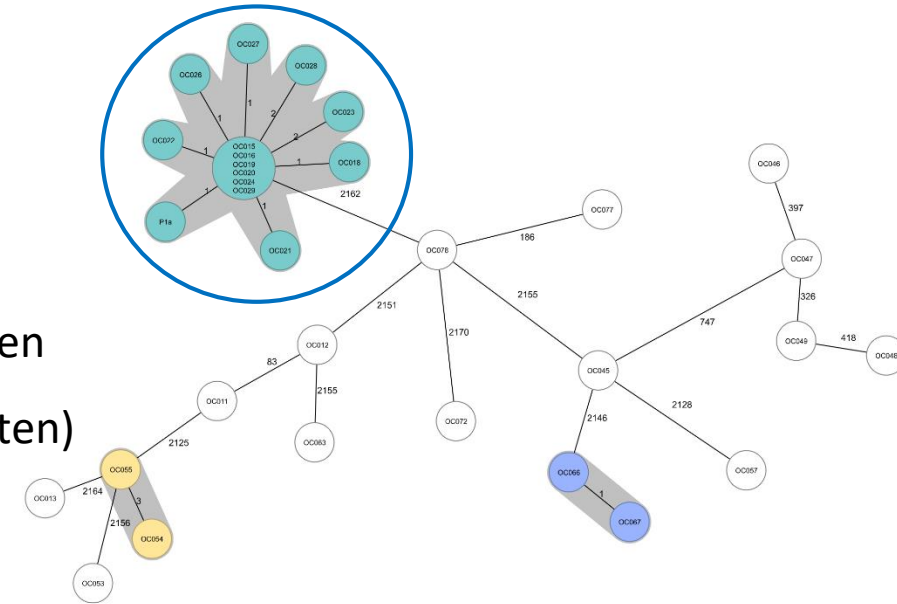
## Hintergrundpopulation (WGS-Referenzdatensatz)

TTGCCGTATCGATA CTTGGC	<b>Isolat 1</b>
AAGTATCGATA CTTGGCCATGTAG	<b>Isolat 2</b>
GTATCGATA CTTGGCGATAGGC	<b>Isolat 3</b>
ATCGCGAGTATCGATA CTTGGCTTAGG	<b>Isolat 4</b>



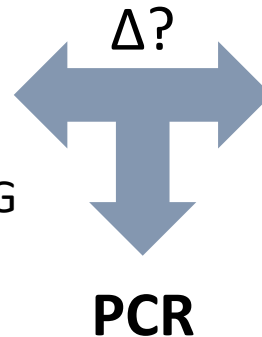
# Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen

- Große Auswahl an Software-Tools ([SeqSphere+](#), [RUCS](#), Gegenees, Find Differential Primers, kSNP, ...)
- **Prinzip:** in WGS-Daten genomische Bereiche oder SNPs finden, die nur in den Cluster-Isolaten vorkommen (und nicht in sporadischen Nicht-Cluster-Isolaten)



## Cluster

Isolat 1 ATGCCGTATCGGTACTTGGCTAGC  
 Isolat 2 GTATCGGTACTTGGCATGCCTAC  
 Isolat 3 GCCGTATCGGTACTTGGCTTAGGCTATCAG



## Hintergrundpopulation (WGS-Referenzdatensatz)

TTGCCGTATCGATACTTGGC Isolat 1  
 AAGTATCGATACTTGGCCATGTAG Isolat 2  
 GTATCGATACTTGGCGATAGGC Isolat 3  
 ATCGCGAGTATCGATACTTGGCTTAGG Isolat 4

# WGS-Referenzdatensatz

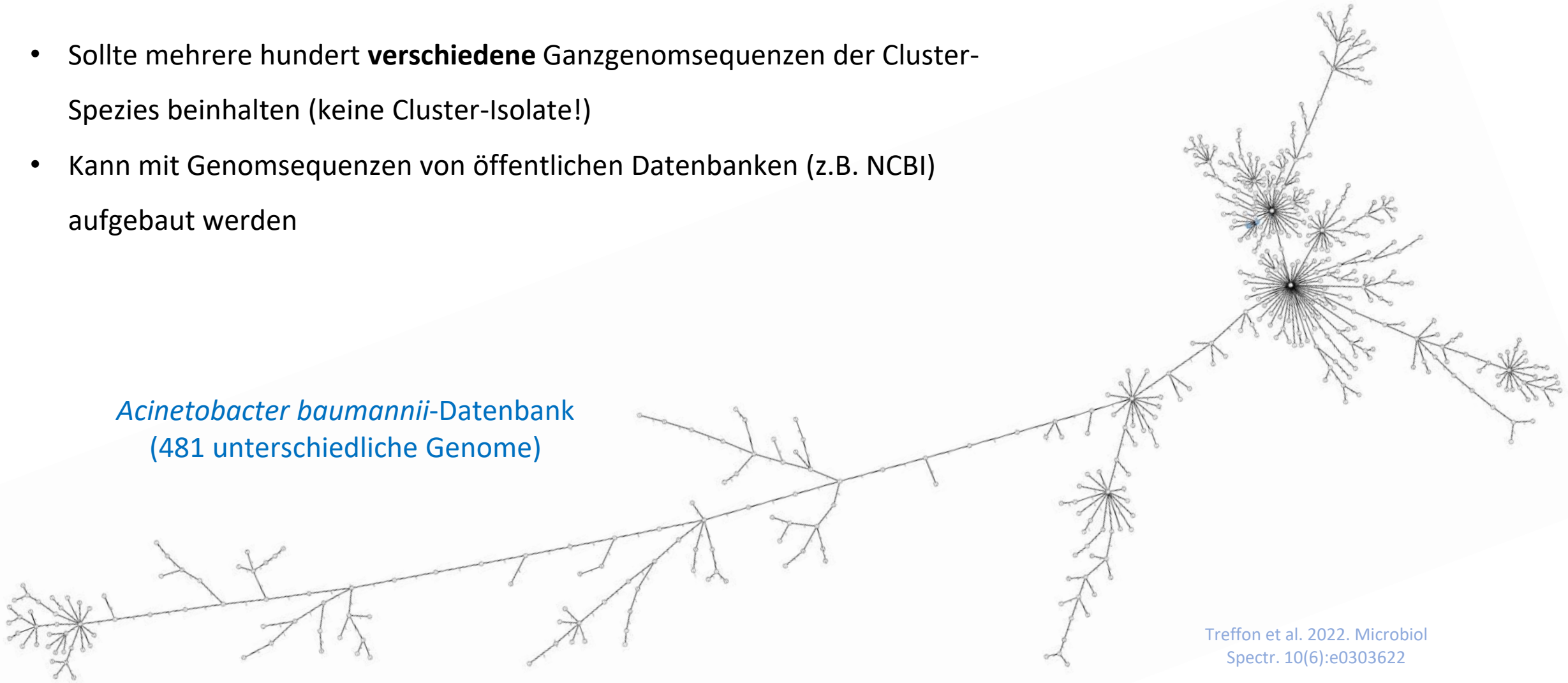
---

- Sollte mehrere hundert **verschiedene** Ganzgenomsequenzen der Cluster-Spezies beinhalten (keine Cluster-Isolate!)
- Kann mit Genomsequenzen von öffentlichen Datenbanken (z.B. NCBI) aufgebaut werden

# WGS-Referenzdatensatz

- Sollte mehrere hundert **verschiedene** Ganzgenomsequenzen der Cluster-Spezies beinhalten (keine Cluster-Isolate!)
- Kann mit Genomsequenzen von öffentlichen Datenbanken (z.B. NCBI) aufgebaut werden

*Acinetobacter baumannii*-Datenbank  
(481 unterschiedliche Genome)

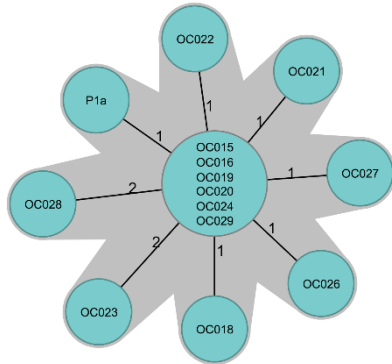


Treffon et al. 2022. Microbiol Spectr. 10(6):e0303622

# Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen

## Target

WGS-Daten von  
Cluster-Isolaten



## Nicht-Target

WGS-Daten von  
Referenzdatensatz



<https://creazilla.com>

TGAACCTGT

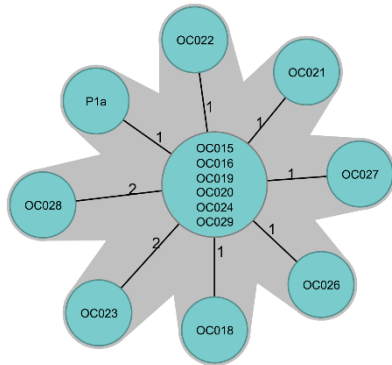
T/A    ACCGTCCGTA  
         T/C  
                 A/C

Treffon et al. 2022. Microbiol Spectr. 10(6):e0303622

# Suche nach Cluster-spezifischen genomischen Regionen

## Target

WGS-Daten von  
Cluster-Isolaten



## Nicht-Target

WGS-Daten von  
Referenzdatensatz



<https://creazilla.com>

TGAACCTGT

T/A

ACCGTCCGTA

T/C

A/C



<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Treffon et al. 2022. Microbiol Spectr. 10(6):e0303622

# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

---

> [Microbiol Spectr.](#) 2022 Dec 21;10(6):e0303622. doi: 10.1128/spectrum.03036-22. Epub 2022 Oct 17.

## **Single Nucleotide Polymorphism-Based Real-Time PCR Screening Assay for Rapid Tracking of Bacterial Infection Clusters To Complement Whole-Genome Sequencing Efforts during Outbreak Investigations**

Janina Treffon<sup>1</sup>, Bianca Heppner<sup>1</sup>, Julia Eismann<sup>2</sup>, Julia Bothe<sup>2</sup>, Birgit Omengo<sup>2</sup>, Alexander Mellmann<sup>1</sup>

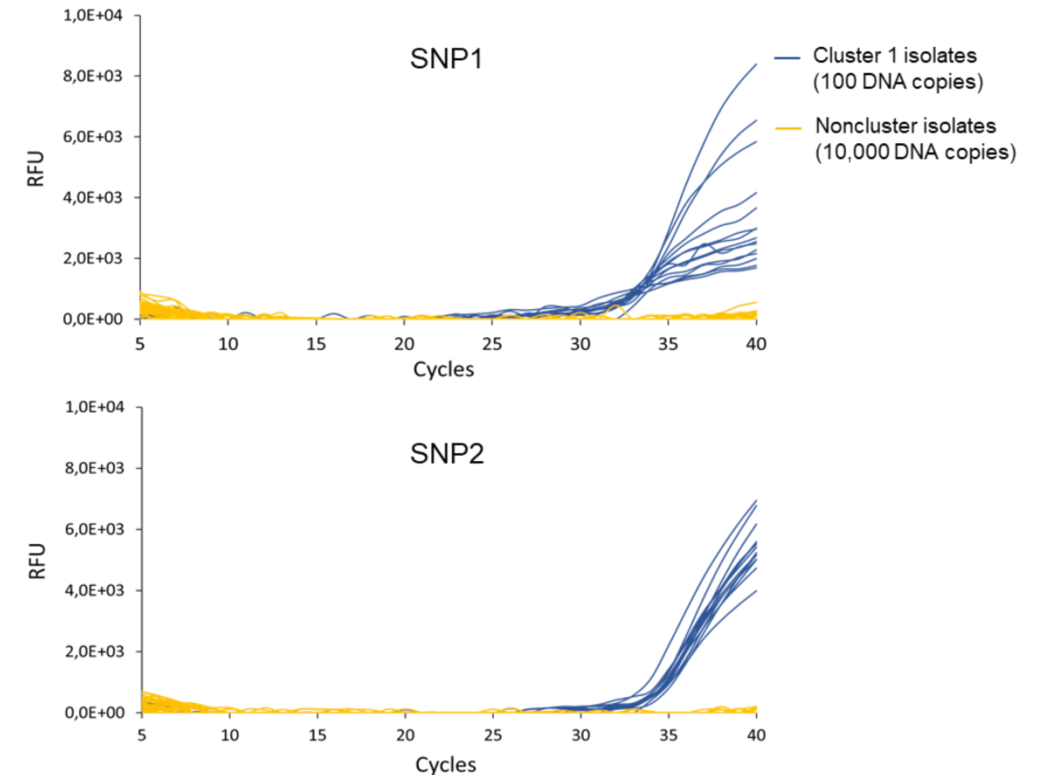
# Entwicklung Cluster-spezifischer PCR-Screening-Assays

> [Microbiol Spectr.](#) 2022 Dec 21;10(6):e0303622. doi: 10.1128/spectrum.03036-22. Epub 2022 Oct 17.

## Single Nucleotide Polymorphism-Based Real-Time PCR Screening Assay for Rapid Tracking of Bacterial Infection Clusters To Complement Whole-Genome Sequencing Efforts during Outbreak Investigations

Janina Treffon<sup>1</sup>, Bianca Heppner<sup>1</sup>, Julia Eismann<sup>2</sup>, Julia Bothe<sup>2</sup>, Birgit Omengo<sup>2</sup>, Alexander Mellmann<sup>1</sup>

- Sonden-basierte Real-time PCRs für zwei *A. baumannii*-Cluster
- Nachweis mehrerer spezifischer SNPs pro Cluster (Backup)
- Assayentwicklung in ca. 7 Tagen möglich



# Es geht auch schneller...

---

Multicenter Study > J Clin Microbiol. 2023 Mar 23;61(3):e0187322. doi: 10.1128/jcm.01873-22.

Epub 2023 Feb 22.

## **Multicenter Preparedness Exercise Enables Rapid Development of Cluster-Specific PCR-Based Screening Assays from Bacterial Genomic Data**

Janina Treffon <sup>1 2</sup>, Karola Prior <sup>3</sup>, Johannes Dreesman <sup>4</sup>, Richard Egelkamp <sup>4</sup>, Antje Flieger <sup>5</sup>, Barbara Middendorf-Bauchart <sup>1 2</sup>, Michaela Projahn <sup>6</sup>, Anne Richter <sup>5</sup>, Elisabeth Schuh <sup>6</sup>, Dag Harmsen <sup># 3</sup>, Alexander Mellmann <sup># 1 2</sup>



# Es geht auch schneller...

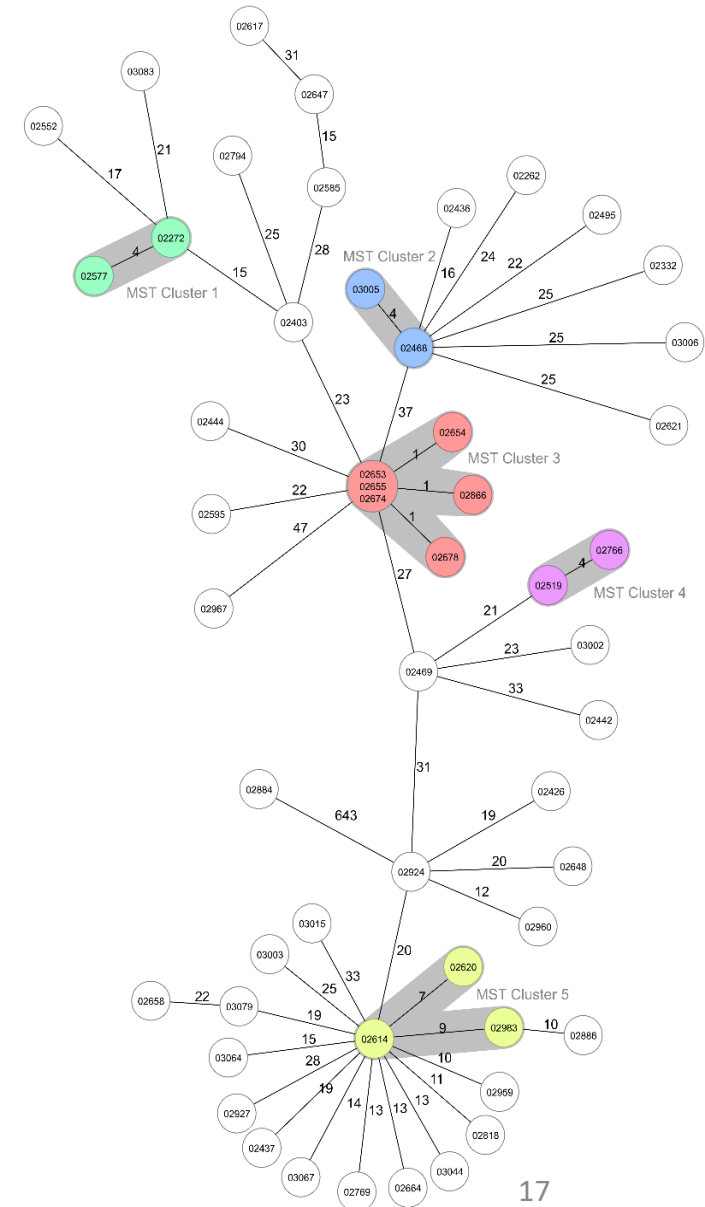
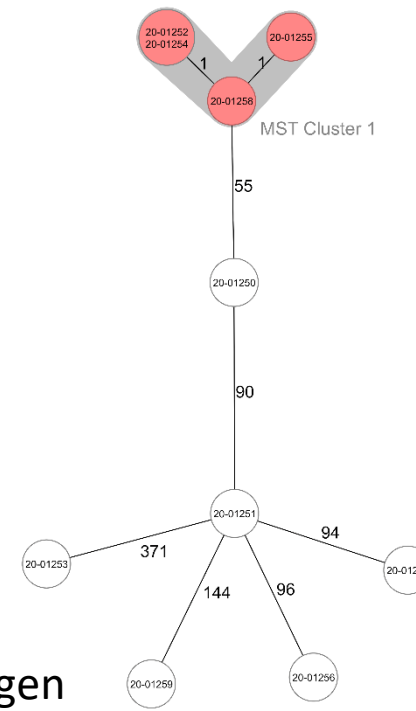
Multicenter Study > J Clin Microbiol. 2023 Mar 23;61(3):e0187322. doi: 10.1128/jcm.01873-22.

Epub 2023 Feb 22.

## Multicenter Preparedness Exercise Enables Rapid Development of Cluster-Specific PCR-Based Screening Assays from Bacterial Genomic Data

Janina Treffon <sup>1 2</sup>, Karola Prior <sup>3</sup>, Johannes Dreesman <sup>4</sup>, Richard Egelkamp <sup>4</sup>, Antje Flieger <sup>5</sup>, Barbara Middendorf-Bauchart <sup>1 2</sup>, Michaela Projahn <sup>6</sup>, Anne Richter <sup>5</sup>, Elisabeth Schuh <sup>6</sup>, Dag Harmsen <sup># 3</sup>, Alexander Mellmann <sup># 1 2</sup>

- Zwei Ringversuche für den Nachweis von *E. coli*-Clustern
- **Ringversuch 1:** kein Zeitlimit → Assayentwicklung in 8 – 80 Tagen
- **Ringversuch 2:** Zeitlimit von zwei Wochen → Assayentwicklung in 4 – 13 Tagen



# Es geht auch schneller...

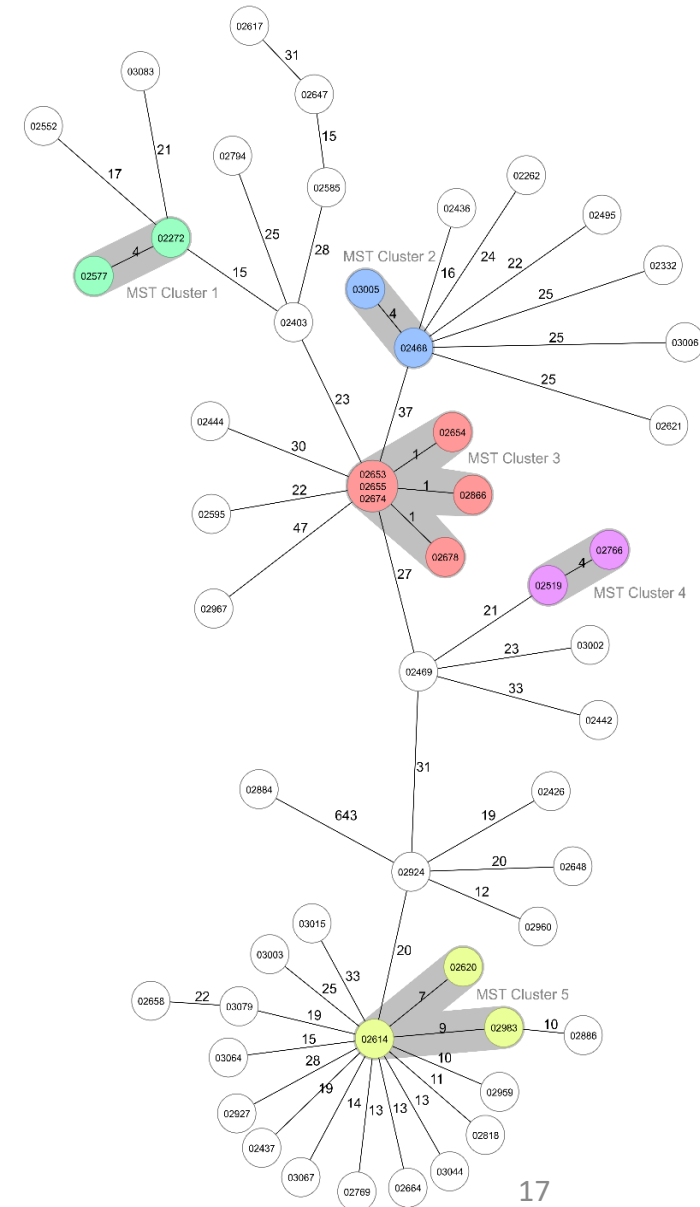
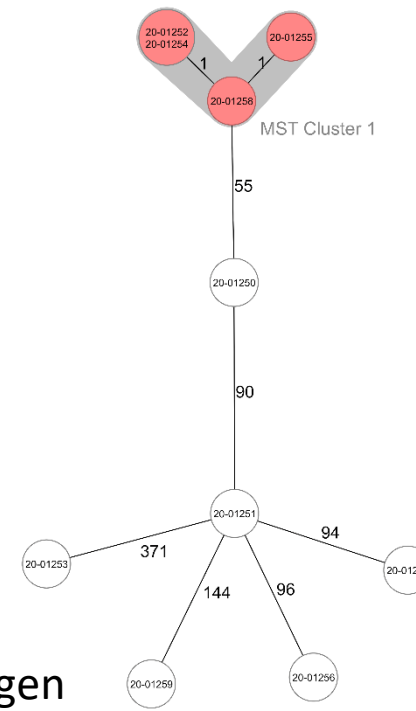
Multicenter Study > J Clin Microbiol. 2023 Mar 23;61(3):e0187322. doi: 10.1128/jcm.01873-22.

Epub 2023 Feb 22.

## Multicenter Preparedness Exercise Enables Rapid Development of Cluster-Specific PCR-Based Screening Assays from Bacterial Genomic Data

Janina Treffon <sup>1 2</sup>, Karola Prior <sup>3</sup>, Johannes Dreesman <sup>4</sup>, Richard Egelkamp <sup>4</sup>, Antje Flieger <sup>5</sup>, Barbara Middendorf-Bauchart <sup>1 2</sup>, Michaela Projahn <sup>6</sup>, Anne Richter <sup>5</sup>, Elisabeth Schuh <sup>6</sup>, Dag Harmsen <sup># 3</sup>, Alexander Mellmann <sup># 1 2</sup>

- Zwei Ringversuche für den Nachweis von *E. coli*-Clustern
- **Ringversuch 1:** kein Zeitlimit → Assayentwicklung in 8 – 80 Tagen
- **Ringversuch 2:** Zeitlimit von zwei Wochen → Assayentwicklung in 4 – 13 Tagen
- Einfluss durch Oligonukleotid-Hersteller (Sonden!), Priorisierung, Wissen über bioinformatische Tools und Assaydesign (PCR, HRM-PCR, Melt-MAMA-PCR, TaqMan-PCR)



# Automatisiertes Screening

OutbreakChecker-Projekt in Zusammenarbeit mit



GEFÖRDERT VOM



Bundesministerium  
für Bildung  
und Forschung

- Analyse von Abstrichtupferproben
- Vollautomatisiertes mikrofluidisches System (DNA-Isolation, real-time PCR)
- Ergebnisse nach 1 h 10 min

# Vielen Dank für die Aufmerksamkeit!

Dr. Janina Treffon  
Universitätsklinikum Münster  
Institut für Hygiene

[Janina.Treffon@ukmuenster.de](mailto:Janina.Treffon@ukmuenster.de)  
[Alexander.Mellmann@ukmuenster.de](mailto:Alexander.Mellmann@ukmuenster.de)

<https://www.biosciencetoday.co.uk/university-invests-science/dna-bright-blue-3>

# Anhang

---

# NCBI Nucleotide BLAST-Analyse

→ Kontrolle der Cluster-spezifischen SNPs/Sequenzen

**Enter Query Sequence**

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [Clear](#)

GCAATGGAAGTTTCATCCCACGGGCTGGTTCAACACCGTGGCGGCAT  
 TGAATTTGCGGCGTCGGTCTTACCAACTTAAGCCGCGATCACCTTGATT  
 ATCATGGTGATATGGAACACTACGAAGCCGCGAAATGGCTCTTATTCTG  
 CACATCATT

Query subrange

From

To

Or, upload file  Keine Datei ausgewählt.

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search

Align two or more sequences

**Choose Search Set**

Database  Standard databases (nr etc.)  rRNA/ITS databases  Genomic + transcript databases  Betacoronavirus

**New**  Experimental databases [Try experimental taxonomic nt databases](#) [Download](#)

For more info see [What are taxonomic nt databases?](#)

Nucleotide collection (nr/nt)

Organism   exclude [Add organism](#)

Enter organism common name, binomial, or tax id. Only 20 top taxa will be shown

Exclude  Models (XM/XP)  Uncultured/environmental sample sequences

Limit to  Sequences from type material

Entrez Query  [YouTube](#) [Create custom database](#)

Enter an Entrez query to limit search

**Program Selection**

Optimize for  Highly similar sequences (megablast)  More dissimilar sequences (discontiguous megablast)  Somewhat similar sequences (blastn)

Choose a BLAST algorithm

**BLAST** Search database nt using Megablast (Optimize for highly similar sequences)

Show results in a new window

SNP kommt nur in Cluster-Isolat vor

Query range 6: 301 to 360

Query	301	ATTGGCGAAACCAGCGCGGTAATGGGCACCGTTGGTAACGGCCTGCTGGGGAAAGTGATC	360
<a href="#">CP096110.2</a>	4145502	C.....	4145443
<a href="#">CP135709.1</a>	3786904	C.....	3786963
<a href="#">CP135685.1</a>	3972235	C.....	3972176
<a href="#">CP135664.1</a>	802860	C.....	802919
<a href="#">CP135697.1</a>	3667455	C.....	3667514
<a href="#">CP135653.1</a>	859178	C.....	859237
<a href="#">CP135691.1</a>	3633390	C.....	3633449
<a href="#">CP135656.1</a>	1763327	C.....	1763268
<a href="#">CP135646.1</a>	3854572	C.....	3854513
<a href="#">CP135458.1</a>	3979451	C.....	3979392

SNP kommt auch in Nicht-Cluster-Isolaten vor

Query range 6: 301 to 348

Query	301	TCAATCGACACCGTTTTCGGTGCCCTGTACATCCCCGTAAACAT	348
<a href="#">CP096110.2</a>	2440047	.....	2440000
<a href="#">CP135664.1</a>	2508322	.....	2508369
<a href="#">CP135697.1</a>	343498	.....	343545
<a href="#">CP135653.1</a>	2613566	.....	2613613
<a href="#">CP135691.1</a>	343127	.....	343174
<a href="#">CP135458.1</a>	2311497	.....	2311450
<a href="#">CP135210.1</a>	342575	.....	342622
<a href="#">CP135233.1</a>	344008	.....	344055
<a href="#">CP135221.1</a>	344581	.....	344628
<a href="#">CP134898.1</a>	2335473	.....	2335426