

## Die nächste Revolution in der klinischen Mikrobiologie

## «Whole genome sequencing»

Dr. Dominik Meinel<sup>a,b</sup>, PhD; Dr. Helena M. B. Seth-Smith<sup>a,b</sup>, PhD; PD Dr. med. Dr. phil. Adrian Egli<sup>a,b</sup><sup>a</sup>Klinische Mikrobiologie, Universitätsspital Basel, Basel<sup>b</sup>Applied Microbiology Research, Departement Biomedizin, Universität Basel, Basel

Die Sequenzierung und Analyse des gesamten Genoms von Pathogenen («whole genome sequencing») innerhalb weniger Tage eröffnet neuartige Möglichkeiten. Molekulare Epidemiologie, Detektion aller im Genom kodierten Virulenzfaktoren und Antibiotikaresistenzmechanismen wie auch die Bestimmung des Mikrobioms sind für viele klinischen Disziplinen von höchstem Interesse. Dieser Übersichtartikel zeigt die Möglichkeiten und Herausforderungen an Beispielen aus der Praxis.

## Einführung und Hintergrund

Das Fachgebiet der klinischen Mikrobiologie hat in den letzten Jahren eine Reihe von substantiellen und weitreichenden technischen Entwicklungen erfahren. Die Automation in der Auf- und Bearbeitung von Proben [1, 2] sowie die massenspektrometrischen Untersuchungen mittels der MALDI-TOF («matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight»)-Technologie zur raschen Identifikation von Bakterien und Pilzen [3, 4] haben zu einer deutlichen Optimierung und Beschleunigung der Arbeitsprozesse geführt. Die Identifikation von Bakterien bis auf die Speziesebene ist in den meisten Fällen 24 Stunden schneller verfügbar als mit konventionellen Methoden [5]. Dies hat ohne Zweifel auch für das klinische Management weitreichende Konsequenzen. In gleichem Masse ist es in der molekularen Diagnostik zu grossen Fortschritt gekommen: Panel PCR erlauben durch die Abklärungen von klinischen Syndromen wie zum Beispiel Meningitis/Enzephalitis oder respiratorischen Infekten eine breite mikrobiologische Abklärung durch die Detektion einer Vielzahl von möglichen Pathogenen [6, 7]. Mit der Möglichkeit zur Sequenzierung des gesamten Genoms («whole genome sequencing», WGS) von Bakterien, Viren und Pilzen ist es wohl aber zu einer echten Revolution gekommen [8–12]. Die WGS-Technologie erlaubt Untersuchungen mit einer bisher nicht erreichten Genauigkeit und einem bisher nicht erreichten Informationsgehalt.

Um diese neuen Technologien effizient zu nutzen, ist es wichtig, mit den klinischen Kollegen die Möglichkeiten der neuen technologischen Errungenschaften zu diskutieren und dabei die Lücken und Herausforderungen nicht zu vergessen. Getrieben durch die

technische Entwicklung haben das Wissen und die Genauigkeit in der klinischen Mikrobiologie und im ärztlichen Alltag bereits stark zugenommen [13]. In den 1980ern waren knapp 1000 bakterielle Spezies mit validen publizierten Namen bekannt. Im 2012 waren es bereits knapp 14 000 bakterielle Spezies [14]. Resistenzmechanismen und Virulenzfaktoren können durch hochauflösende genetische Daten detailliert beschrieben und mit dem Krankheitsbild assoziiert werden. Durch den Austausch mit anderen Fachdisziplinen kann mikrobiologische Information in einem personalisierten Kontext verstanden und angewandt werden. Während WGS vor wenigen Jahren durch die hohen Material- und Reagenzkosten limitiert war, wurde dieses Hindernis durch die zunehmende Verfügbarkeit und Entwicklung der Technologie überwunden. Zeitgleich hat die Bioinformatik zur Analyse der grossen und komplexen Datenmengen riesige Fortschritte gemacht. Obwohl die meisten bakteriellen Genome «nur» zwischen zwei und neun Megabasen an Basenpaar-Informationen haben, können die zu analysierenden Daten durch mehrfache Abdeckung («coverage») beim Sequenzieren ein Vielfaches der Grösse erreichen. In der bioinformatischen Analyse müssen deshalb leistungsstarke Computer verwendet werden. Die Definition von vorgefertigten Analyseabläufen («analytical pipelines») mittels kommerzieller Software erlaubt eine relative rasche Aufarbeitung der Daten in wenigen Stunden.

In welcher Form findet die WGS-Technologie in der modernen Mikrobiologie der Schweiz ihren Platz? Aktuelle und wichtige Probleme in der klinischen Mikrobiologie sind die rasante Entwicklung von Antibiotikaresistenzen [15–17] und die Ausbreitung von virulenten Pathogenen [18–20]. Diese mikrobiologischen und kli-



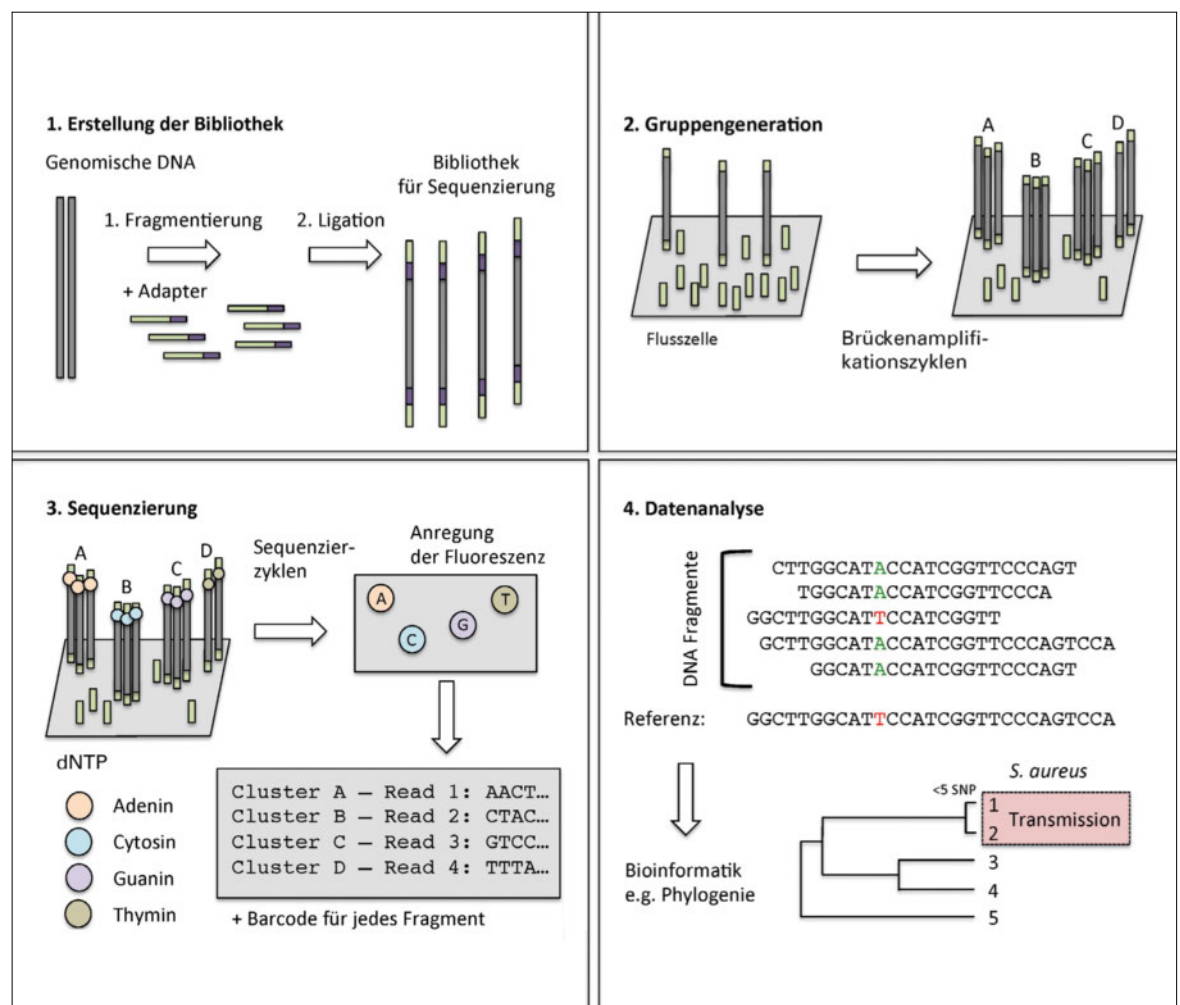
Dominik Meinel

nischen Herausforderungen können mit der WGS-Technologie untersucht und verstanden werden. Durch die rasche Ausbreitung von virulenten und multiresistenten Pathogenen sind jedoch vernetzte Überwachungsdatenbanken für die Schweiz, aber auch global wichtig. Obwohl eine schweizweite Vernetzung bereits heute technisch möglich wäre, findet nur ein zögerlicher Aufbau statt, da die Finanzierung fehlt und die Nachhaltigkeit der wichtigen Investition in eine solche Infrastruktur unterschätzt wird. Die Zirkulation von multiresistenten oder virulenten Pathogenen zwischen verschiedenen Wirten und Reservoirs – Mensch, Tier und Umwelt im Sinne eines «one health»-Konzepts, wie zum Beispiel bei *Salmonella* spp. oder enteropathogene *Escherichia coli*, kann letztlich nur durch vernetzte kantonsübergreifende Datenbanken für die öffentliche Gesundheit genutzt werden [8, 9, 12, 21]. Im folgenden Artikel möchten wir die WGS-Technologie detailliert für mikrobiologische Anwendungen

erklären und anhand von Beispielen aus der Routinediagnostik Vorteile, aber auch die Herausforderungen aufzeigen.

### Technische Aspekte des «whole genome sequencing» (Abb. 1)

Das WGS-Prinzip mit der «Sequenzierung-durch-Synthese»-Methode ist technologisch an die seit Jahren verwendete und bekannte Sequenzierung nach Sanger mittels Kapillarelektrophorese [22] angelehnt. Die DNA-Polymerase ist dafür verantwortlich, dass fluoreszenzmarkierte DNA-Bausteine (Desoxyribonucleotid Triphosphate, dNTP) in den anhand der DNA-Matrize (Vorlagestrang, engl. «DNA template») synthetisierten DNA-Strang schrittweise eingebaut werden. Der kritische Unterschied zur Sanger-Technologie ist, dass nicht nur ein einzelnes DNA-Fragment gemessen



**Abbildung 1:** Technischer Ablauf der Sequenzierung.

Die vier Hauptschritte sind (1) Erstellung einer Sequenzierungs-Bibliothek, (2) Gruppengenerationen, (3) Sequenzierung und (4) Datenanalysen. dNTP = Desoxyribonucleotid Triphosphate, SNP = «single nucleotide polymorphisms».

werden kann, sondern im gleichen Ansatz Millionen von Sequenzierungsreaktionen parallel durchgeführt und gemessen werden («massive parallel sequencing»). Dies geschieht auf einem speziellen Mikrochip, der nicht grösser als 20 mm<sup>2</sup> (!) ist. WGS erfolgt dabei in vier Kernschritten (siehe Abb. 1).

### **Erstellung einer Sequenzierungs-Bibliothek («library preparation»)**

Die DNA eines Pathogenes wird enzymatisch oder mit Ultraschall zerkleinert und die entstandenen Fragmente durch Ligation an den 5'- und 3'-Enden der DNA mit einem Sequenzierungsadapter markiert («barcoding»). Durch diesen Barcode können später mehrere Pathogene parallel sequenziert werden, da jeder Barcode für beispielsweise ein spezielles Pathogen eines Patienten verwendet wird und so eine Zuordnung der sequenzierten Fragmente erlaubt.

### **Gruppengeneration («cluster generation»)**

Die Bibliothek wird in die Flusskammer («flow cell») geladen, in der die Sequenzierungsadapter mit komplementären DNA-Fragmenten auf der Flusskammer hybridisieren können. Danach erfolgt die sogenannte Brückenamplifikation. Dies ist eine PCR («polymerase chain reaction»), bei der die Primer (Oligonukleotide) an der Oberfläche der Flusskammer immobilisiert sind. Dadurch entstehen lokal auf der Oberfläche fixierte Gruppen/Ansammlungen («cluster») an identischen, durch Brückenamplifikation vermehrten DNA-Fragmenten. Dies dient in der anschliessenden Sequenzierung zur Signalverstärkung.

### **Sequenzierung**

Die Illumina®-Technologie verwendet eine reversible Ketten-Abbruchmethode («reversible terminated chemistry»). Hierbei sind immer alle dNTP (A,G,C und T) gleichzeitig verfügbar und es kommt aufgrund der Basenpaarung zum Einbau des durch den Vorlage-Strang vorgegebenen dNTP. Durch das für jedes dNTP spezifische Fluoreszenzsignal kann das jeweilig eingebaute dNTP identifiziert werden. Da der Fluoreszenzfarbstoff das 3'-Ende der eingebauten Base blockiert, kann in jedem Schritt nur eine Base eingebaut werden. Um die nächste Base zu sequenzieren, kann der Farbstoff chemisch abgespalten und das 3'-Ende für den nächsten Reaktionsschritt freigegeben werden. So wird während der Sequenzierungszyklen Schritt für Schritt die Nukleotid-Sequenz gemessen. Im Gegensatz dazu misst die «Ion Torrent™»-Technologie freigesetzte Protonen (durch die Phosphatabspaltung in der Sequenzierung) mittels hochsensitiver Veränderungen im pH.

### **Datenanalyse**

Die Analyse der DNA-Fragmente (mit Barcode) kann auf zwei Arten erfolgen: ein sogenanntes «de novo»-Zusammensetzen der überlappenden DNA-Fragmente («assembly») oder der Vergleich zu einer bekannten Referenzsequenz des gleichen Pathogenes («mapping»). Durch die zunehmende Verfügbarkeit von Genomen unterschiedlicher Pathogene ist die zweite Methode bioinformatisch weniger aufwendig und deutlich schneller. Die Rekonstruktion des gesamten Genoms und die Analyse der darin enthaltenen Daten erlaubt eine Reihe von wichtigen Rückschlüssen für einzelne Pathogene oder auch Gruppen von Pathogenen. Diese sollen im Folgenden dargestellt werden.

### **Typisierung und molekulare Epidemiologie**

Übertragungen von Bakterienstämmen zwischen Patienten stellen die Spezialisten der Spitalhygiene oft vor Herausforderungen. Bei Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder bei multiresistenten *Enterobacteriaceae* muss zum Beispiel die Anzahl betroffener Patienten zuerst eruiert und mit einem Kontaktscreening abgeklärt werden. Die Suche nach einer Quelle ist nicht immer einfach, braucht Zeit, ist ressourcenaufwendig und zum Teil auch nicht vollständig möglich. Gleiches gilt bei Übertragungen in der Öffentlichkeit. Bei durch Lebensmittel vermittelten Infektionen können die Probleme herausfordernd sein, wie das Beispiel der Shiga-Toxin produzierenden *E. coli*-Infektion in Deutschland aufgezeigt hat [23, 24]. Zusätzlich ist in den letzten Jahren eine deutliche Zunahme von multiresistenten Bakterien zu verzeichnen [15–17]. Die schweizerische Antibiotikaresistenz-Überwachung Anresis berichtet über eine besorgniserregende Zunahme der «extended β-lactamase»(ESBL)-produzierenden *Enterobacteriaceae* von 1% im Jahre 2004 auf über 10% im Jahre 2015 [25]. Aber auch weitere resistente Keime wie Carbapenemase-produzierende *Enterobacteriaceae* und nicht fermentierende gramnegative Bakterien oder plasmidische Colistin-Resistenz bei *E. coli* werden immer häufiger [26]. Multiresistente Keime sind eine grosse Bedrohung in der modernen Medizin und die Ausbreitung muss verhindert werden. Um die Zusammenhänge der einzelnen Isolate zueinander respektive die Klonalität zu bestimmen, stehen unterschiedliche Typisierungsmethoden zur Verfügung. Im Anschluss erfolgt die Datenanalyse um eine Phylogenie (Verwandtschaftsbaum zwischen Pathogenen) zu erstellen.

Gängige Methoden für die Typisierung sind die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), das «multilocus sequence typing» (MLST), das «spa-typing» bei *S. aureus*

und das Ribotyping bei *Clostridium difficile*. Diese Technologien sind durch unterschiedliche Auflösungskapazität und Arbeitsaufwand für das Labor charakterisiert (Tab. 1). Die Auflösungskapazität wird mittels eines Diversitätsindex gemessen, zum Beispiel «Simpson's Index of Diversity», wobei hier 1,0 die grösste mögliche Auflösungs-fähigkeit darstellt.

Mittels WGS kann durch den Vergleich des gesamten Genoms zwischen unterschiedlichen Pathogenen die

höchste mögliche Auflösung zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse erreicht werden. Hierbei werden die Gene, die bei allen Bakterien einer Spezies vorkommen zum sogenannten Kerngenom («core genome») zusammengefasst und gegeneinander verglichen. Diejenigen Gene, die nicht alle Bakterien dieser Spezies aufweisen – etwa bestimmte Resistenzgene –, werden im sogenannten Zusatzgenom («accessory genome») erfasst und nicht in der initialen Analyse berücksichtigt. Der Vergleich zwischen Isolaten basiert in der Regel auf dem Kerngenom, analog zu einer MLST-Analyse, jedoch mit einem Hundertfachen der Gene («core genome MLST»).

Durch den direkten Vergleich von Isolaten können so einzelne Punktmutationen («single nucleotide polymorphisms», SNP) zwischen den Bakterien gefunden werden. Dieser Ansatz hilft, die Verwandtschaftsverhältnisse mit sehr hoher Genauigkeit darzustellen (siehe Beispiel in Abb. 2). Eine Übertragungskette kann von Patient zu Patient rekonstruiert werden und die epidemiologischen Angaben ergänzen.

Diese Methodik funktioniert bereits sehr gut für MRSA [32–37], *Enterococcus faecium* [38], ESBL-produzierende *Enterobacteriaceae* [17, 39–41], Carbapenemase-produzierende *Enterobacteriaceae* [42–45], *Neisseria meningitidis* [46], *Mycobacterium tuberculosis* [47–50] und viele andere Erreger mehr.

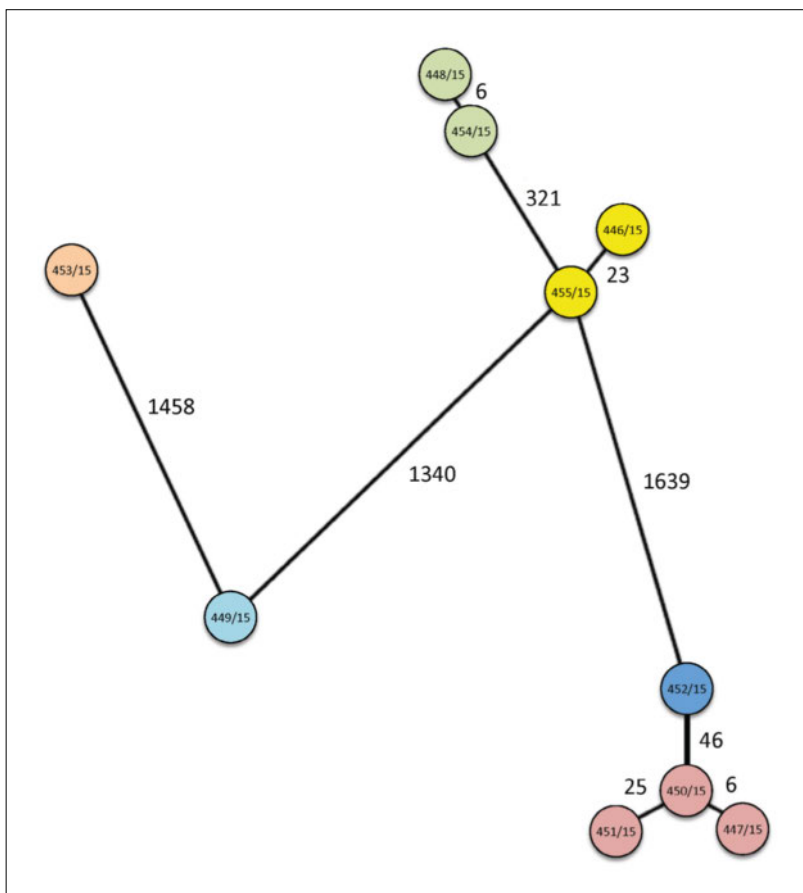
Als zusätzlicher Mehrwert können, da die spontane Mutationsrate von vielen Bakterienspezies bekannt ist, durch diese Methodik auch die Übertragungsdynamik respektive die Zeiträume abgeschätzt werden. Dies kann zum Beispiel helfen, eine Quelle oder einen möglichen Risikofaktor je nach Bakterienspezies bis auf wenige Wochen einzugrenzen [51] und Ausbruchsgeschehen besser nachzuvollziehen.

## Detektion von Virulenzfaktoren

Virulenzfaktoren beeinflussen die Pathogenität von Bakterien massgeblich. Sie sind eine wichtige Möglichkeit, die Transmission auf neue Wirte zu sichern, etwa durch Adhäsionsfaktoren, die an die Epithelien des Wirts oder an andere Oberflächen binden [52]. Ebenfalls können Virulenzfaktoren helfen, in der Konkurrenz um Nährstoffe gegenüber anderen Spezies zu bestehen [53]. Auch die Pathogenität im menschlichen Wirt wird durch Virulenzfaktoren massgeblich beeinflusst, zum Beispiel Toxic-Shock-Syndrom-Toxine bei *S. aureus*, Diarrhoe-vermittelndes Toxin bei *Vibrio cholerae* oder Rachendiphtherie durch Toxine bei *Corynebacterium diphtheriae*. Die Vielfalt von bakteriellen Virulenzfaktoren ist immens [52–56], aber der Einfluss von individuellen Faktoren auf den Krankheitsverlauf

**Tabelle 1:** Vergleich von unterschiedlichen Typisierungsmethoden: PFGE = Pulsfeld-Gelelektrophorese, MLST = «multilocus sequence typing», WGS = «whole genome sequencing», SI = «Simpson's Index of Diversity». Kosten werden anhand der Analyseliste mittels PCR-Positionen zum Nachweis eines Genes definiert.

Methode	Keime	Turnaround time	Kosten in CHF pro Probe	Auflösung (SI diversity)	Referenzen
PFGE	Multiple	1 Woche	180	0,87–0,99	[27–30]
MLST	Multiple	1 Woche	180–360	0,9–0,95	[27, 28, 31]
Ribotyping	<i>Cl. difficile</i>	3–4 Tage	180	–	–
<i>spa</i> -Typing	<i>S. aureus</i>	3–4 Tage	180	0,95	[30]
WGS	Multiple	3–4 Tage	540	0,99	–



**Abbildung 2:** «Whole genome sequencing»-basierte Typisierung von MRSA-Isolaten. Drei Cluster sind ersichtlich: grün, gelb und rot. Die Zahlen zeigen die Anzahl genetischer Veränderungen (SNP oder Allel-Unterschiede). Pro SNP benötigt MRSA zirka acht Wochen. MRSA = meticillinresistente *Staphylococcus aureus*; SNP = «single nucleotide polymorphisms».



oftmals ungenügend beschrieben. Für die klinische Praxis fällt dabei besonders ins Gewicht, dass nur für wenige Virulenzfaktoren – zumeist in Referenzzentren – einzelne PCR zum Nachweis existieren. Die vielfältigen Eigenschaften der Bakterien werden aktuell auch noch nicht in den klinischen Entscheidungsprozess einbezogen und durch technische Fortschritte in der Molekular- und Mikrobiologie kommen immer mehr Virulenzfaktoren hinzu. Die Zeit, bis ein PCR-Resultat vorliegt, ist oftmals bei einer Toxin-vermittelten Reaktion zu langsam, um eine klinische Entscheidung zu beeinflussen. Ein gutes Beispiel ist das Toxic-Shock-Syndrom bei *S. aureus*. Die klinischen Symptome dominieren hierbei initial die Wahl der antibiotischen Therapie und das Toxin wird in der Regel nur retrospektiv bestimmt. Das Vorhandensein des Toxic-Shock-Syndrom-Toxins kann jedoch zu einer überschiessenden Immunantwort und massiven Komplikationen führen. Auch andere Virulenzfaktoren wie Adhäsionsfaktoren finden bisher kaum Einfluss auf den klinischen Entscheidungsprozess. Aus den genomischen Daten können bereits jetzt für *S. aureus* mit wenig technischem Aufwand bis zu 60 verschiedene Virulenzfaktoren dargestellt werden. Dies erlaubt, das individuelle Risiko eines Patienten etwa im Bezug auf mögliche Komplikationen (Bildung von Biofilmen oder Abszessen, Schock und Übertragungsrisiken etc.) genau einzuschätzen. Bei *C. diphtheriae* können neben dem Diphtheria-Toxin auch wichtige Adhäsionsfaktoren für das Rachenepithel nachgewiesen werden. Gerade diese Isolate mit beiden Virulenzfaktoren bedürfen spezieller Aufmerksamkeit. Die Diskussion mit Kollegen der Infektiologie, Spitalhygiene und Intensivmedizin wird in der Zukunft umso entscheidender, damit die vielfältigen mikrobiologischen Informationen für ein individuelles Patientenmanagement optimal genutzt werden.

### Detektion von Resistenzmechanismen

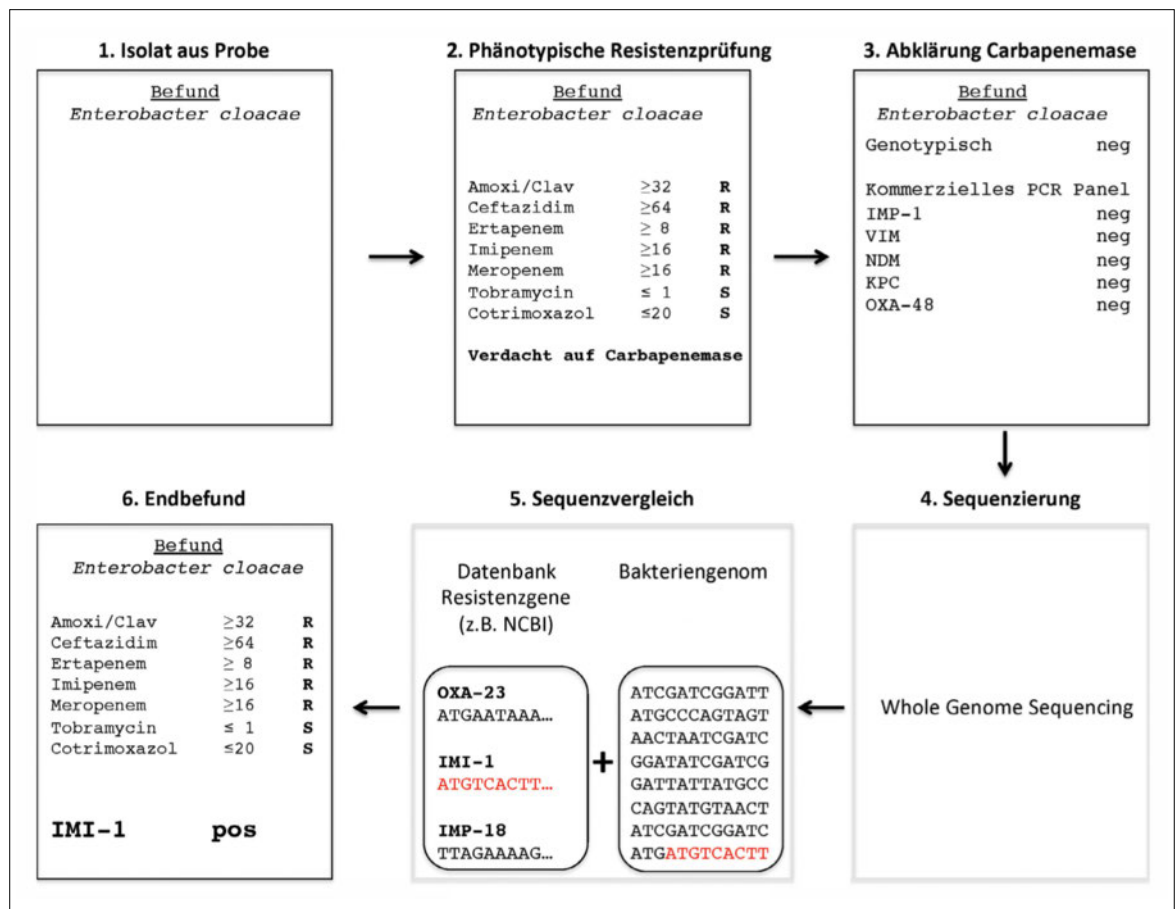
Die Abklärung eines Resistenzmechanismus ist wichtig, um neben der effizienten Therapie auch ein epidemiologisches Verständnis zur aktuell rasanten Ausbreitung von multiresistenten Bakterien zu erlangen. Im mikrobiologischen Labor stehen hierfür eine Reihe von phäno- und genotypische Methoden zur Verfügung. Die Vielfalt an ESBL-, AmpC- und Carbapenemase-kodierenden Genen macht es jedoch unmöglich, für jedes einzelne Gen eine spezifische PCR zur Verfügung zu haben. Auch hier kann die WGS-Analyse gute Dienste leisten und eine finale Aufklärung bringen. In Abbildung 3 ist dies am Beispiel der IMI-1-Carbapenemase aufgezeigt, welche durch WGS detektiert werden konnte, aber in gängigen diagnostischen Tests fehlt.

Der grösste klinische Nutzen wird sich jedoch bei langsam wachsenden Bakterien wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* zeigen. Die Resultate der phänotypischen Resistenzprüfung sind oft erst spät verfügbar und verzögern die Initiierung einer optimalen antibiotischen Therapie gerade bei multiresistenten *M. tuberculosis*-Isolaten. Hier könnte die WGS-Methode eine deutliche Beschleunigung durch Sequenzanalysen der Resistenzgene sogar direkt aus der Patientenprobe mit sich bringen [57–60]. Dies wäre analog zu einer bereits in spezialisierten Laboratorien verwendeten Testung der Resistenzen mittels PCR/Hybridisierung für *M. tuberculosis*. WGS liefert jedoch deutlich mehr genetische Informationen, da nicht nur einzelne Gene analysiert werden. Im Moment wird zum Beispiel daran geforscht, auf diese Weise die genotypische Resistenzprüfung noch präziser zu machen und auch die Antibiotikaresistenzen für den Fall von Mischinfektion im Patienten genotypisch zu ermitteln. Zusätzlich können die Informationen aus dem WGS für epidemiologische Fragestellungen verwendet werden.

Ebenfalls ist es möglich, Resistenzmechanismen durch funktionelle Genetik zu verstehen. Die Detektion von Porinverlusten bei *Enterobacteriaceae* und nicht fermentierenden gramnegativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* war bis anhin eine Ausschlussdiagnose. Ein phänotypisches Resistenzmuster wurde genotypisch mit einem breiten Spektrum an einzelnen PCR abgeklärt und schliesslich, nach allen negativen Testergebnissen, die Möglichkeit eines Porinverlusts in Betracht gezogen. Porinverluste sind aktuell häufiger als Plasmid-vermittelte Carbapenem-Resistenzen. Durch die WGS-Analyse können Mutationen etwa im *oprD*-Gen von *P. aeruginosa* annotiert werden und der Einfluss auf die Durchgängigkeit des Porins für Carbapenem kann direkt postuliert werden (Abb. 4).

### Herausforderungen und Limitationen von WGS in der klinischen Mikrobiologie

Obwohl die Kosten insgesamt deutlich gesunken sind, ist die Sequenzierung eines einzelnen Genoms noch relativ teuer. Es ist zu erwarten, dass die Reagenzienkosten in den nächsten Jahren mit der Weiterentwicklung der Technologie sinken werden. Dazu kommen jedoch eine Reihe von weiteren Kosten wie Geräteanschaffung, aufwendige Bioinformatik mit Software und analytischen Experten und der labortechnische Arbeitsaufwand. Die Bioinformatik stellt heute eindeutig die grösste Herausforderung dar. Die Analysen sind äusserst komplex und erfordern eine entsprechende Fachkenntnis und spezialisierte Ausbildung. Das entsprechende Fachpersonal ist nur schwierig zu finden.



**Abbildung 3:** Molekulare Abklärung von Carbapenemasen mit «whole genome sequencing» (WGS).

Dieses Beispiel zeigt ein potentielles Einsatzgebiet von WGS in der Abklärung von Carbapenemasen. In diesem Fall wurde ein *Enterobacter cloacae* isoliert (1). Die phänotypische Antibiotikaresistenzprüfung (2) ergab dabei einen Hinweis auf eine Carbapenemase-Produktion. Zur weiteren Abklärung, um welchen Carbapenemase-Typen es sich handelt, wurde eine genotypische Abklärung (3) mittels kommerzieller Schnell-PCR durchgeführt (GeneXpert®, Cepheid). Diese konnte jedoch hier die Carbapenemase nicht identifizieren, da in dem Panel nur die häufigsten Carbapenemasen enthalten sind. Daraufhin wurde das Isolat mittels eines Illumina® MiSeq im 2 × 300 bp paired-end Modus sequenziert. Das Genom wurde assembliert und gegen eine Datenbank von bekannten Carbapenemasen verglichen (5). Dieser Sequenzvergleich ergab Übereinstimmung mit einer Carbapenemase vom Typ IMI-1 und erklärt somit die beobachtete Resistenz.

Grössere und zentrale Datenbanken sind auch in der Schweiz nötig, um die Überwachung von virulenten und resistenten Krankheitserregern über die Kantons Grenzen hinaus zu ermöglichen. Die Vorteile sind offensichtlich: Da sich die Patienten zwischen Spitälern und weiteren Institutionen des Gesundheitswesens rege hin und her bewegen, kommt es zu Exposition und Austausch mit möglichen Pathogenen. Ebenso kommen durch die zunehmende Reisetätigkeit der Bevölkerung und die Migration viele multiresistente Erreger in die Schweiz. Eine zentralisierte Datenbank hilft schlussendlich auch, Kosten der spezialisierten Diagnostik zu sparen durch die Vermeidung von multiplen Abklärungen des gleichen Sachverhaltes. Durch eine Datenbank können auch effiziente Analyseabläufe definiert und wichtige In-

formationen für die öffentliche Gesundheit effizienter übermittelt werden.

Neben den personellen und logistischen bestehen auch wichtige technische Herausforderungen, wie zum Beispiel kurze DNA-Fragmente. Gerade für die Analyse von Plasmiden, welche deutlich kürzere DNA-Sequenzen haben, die jedoch besonders viele technisch schwierig zu sequenzierende Wiederholungssequenzen aufweisen, sind Sequenzierungen von längeren DNA-Fragmenten wichtig. Hierfür sind sogenannte Nanoporen-Geräte wie die PacBio® oder MinIon in Aussicht [61].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist der Umgang, wie die komplexen WGS-Daten für den Kliniker verfügbar gemacht werden können. Für den Fall einer epidemiologischen Untersuchung bietet sich, wie auch bisher für andere Methoden üblich, eine Phylogenie der ana-

**A. Phänotypische Resistenzprüfung**

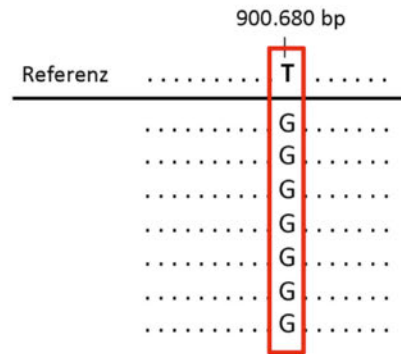
*Pseudomonas aeruginosa*:

Piperacillin – Tazobactam  
 Ceftazidim  
 Imipenem  
 Meropenem

Verdacht auf:

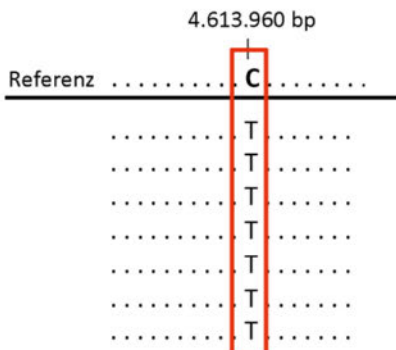
R |  
 R | AmpC-dereprimiert  
 R |  
 R | Porin-Verlust

**B. ampR-Gen**



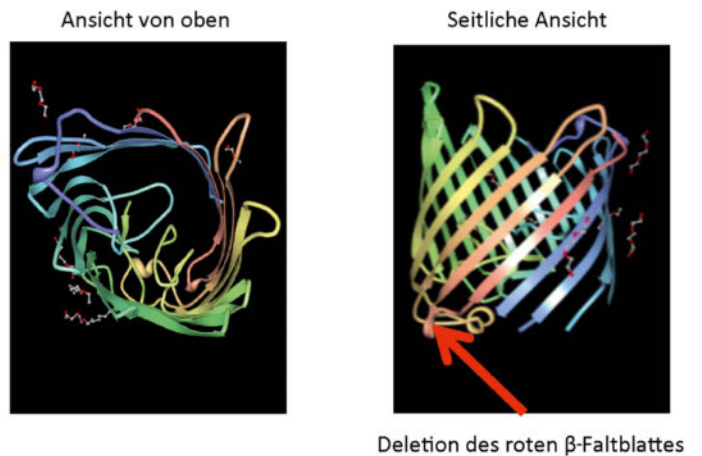
→ AmpR: D135G

**C. oprD -Gen**



→ Stopcodon  
 → C-terminus deletiert

**D. OprD3-D Struktur des Porins**



**Abbildung 4:** Abklärung eines Porinverlusts.

Ein *Pseudomonas aeruginosa*-Isolat zeigte in der phänotypischen Antibiotikaresistenzprüfung (A) Resistenz gegenüber Meropenem und Imipenem. Dies weist phänotypisch auf einen Porinverlust hin. Zusätzlich wurde Resistenz gegenüber die Betalactam-Antibiotika Piperacillin–Tazobactam und Ceftazidim beobachtet. Da *P. aeruginosa* eine chromosomal kodierte β-Laktamase, das *ampC*-Gen, trägt, dieses jedoch nicht exprimiert wird, lag der Verdacht nahe, dass die Expression des *ampC* induziert wurde («Dereprimierung»). Da keine phänotypischen Methoden zur Verfügung standen, wurde das Isolat mittels eines Illumina® MiSeq im 2 × 300 bp paired-end Modus sequenziert. Auffällig war dabei eine Punktmutation im *ampR*-Gen (B), das vermutlich zu einem Funktionsverlust des Gens führt. *ampR* kodiert für den Repressor, der die Bildung der AmpC-β-Laktamase unterdrückt. Dies erklärt direkt die Resistenz gegen Piperacillin–Tazobactam und Ceftazidim. Eine zusätzliche Mutation wurde im *oprD*-Gen gefunden (C). *oprD* kodiert dabei für ein Porin in der äusseren Zellmembran von *P. aeruginosa*, durch das neben Kohlenhydraten auch die Carbapeneme Meropenem und Imipenem in den Intermembranraum, den Ort ihrer Funktion, gelangen. Eine Punktmutation von C, in einem sensiblen Referenzstamm, zu T, in dem resistenten Stamm, führt dabei zu einem Stopcodon und so zu einer Deletion des C-terminalen β-Faltblattes. Da das Porin ein sogenanntes β-barrel bildet (D) [62], das in die Membran integriert wird, führt diese Deletion zu einer Instabilisierung und zum Funktionsverlust des Proteins. Durch Tandem-Massenspektromie konnten wir in Zusammenarbeit mit der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Dirk Bumann am Biozentrum der Universität Basel zeigen, dass, obwohl das Protein in sensiblen Stämmen nachweisbar ist, es in den resistenten Stämmen nicht mehr detektiert werden kann. Die Absenz des Porins erklärt somit die Imipenem- und Meropenem-Resistenz, da beide Antibiotika nicht mehr an den Ort ihrer Wirkung gelangen können.

---

Korrespondenz:  
PD Dr. med. Dr. phil.  
Adrian Egli  
Abteilung Klinische  
Mikrobiologie  
Universitätsspital Basel  
Petersgraben 4  
CH-4031 Basel  
adrian.egli[at]usb.ch

lysierten Isolate mit Interpretation der Verwandtschaftsverhältnisse an. Für Analysen vorhandener Antibiotikaresistenzen und Virulenzfaktoren muss in Zukunft ein intuitiv interpretierbarer Bericht erstellt werden, der die wichtigsten Virulenzfaktoren umfasst und dem Kliniker Hilfestellung für die Interpretation gibt.

---

## Das Wichtigste für die Praxis

- Die Sequenzierung des gesamten Genoms von Bakterien erlaubt es, deren Übertragungswege mit sehr hoher Auflösung darzustellen und zeitliche Rückschlüsse zur Übertragungsdynamik aufzuzeigen. Diese Auflösung kann mittels klassischer Typisierungsmethoden nicht erreicht werden.
- Zusätzlich können aus den genetischen Informationen sehr viele Resistenzen detektiert und funktionell verstanden werden.
- Ebenfalls ist es möglich, eine breite Zahl von Virulenzfaktoren zu bestimmen und diese mit dem klinischen Bild zu assoziieren und damit Krankheitsbilder auch besser zu verstehen.
- Durch die grossen Datenmengen, welche in Zukunft zur Verfügung stehen, wird die Interaktion zwischen dem Labor und den behandelnden ärztlichen Kolleginnen und Kollegen umso wichtiger – sodass die zusätzlichen vorhandenen Informationen auch optimal im klinischen Kontext genutzt werden können.

Bereits jetzt gibt es ebenfalls wissenschaftliche Versuche, kulturfrei aus Patientenmaterial Pathogene wie Bakterien, Viren oder auch Pilze durch WGS zu identifizieren und gleichzeitig Antibiotikaresistenzen zu ermitteln. Dies ist ein sich schnell entwickelndes Gebiet, das im Moment jedoch noch hauptsächlich wissenschaftlich verwendet wird. Dabei gibt es Schwierigkeiten zu lösen, wie etwa bei Proben von Mischinfektionen die Pathogene richtig zu bewerten. Besonders interessant erscheint dabei der Aspekt, dass WGS auch quantitative Daten liefert, die es ermöglichen, die vorliegenden Spezies zu quantifizieren und auf diese Weise zusätzliche Aussagen über eventuell dominierende Keime zu gewinnen. Es wird spannend sein, die Entwicklung auf diesem Gebiet weiterzuverfolgen.

### Disclosure statement

Die Autoren haben keine finanziellen oder persönlichen Verbindungen im Zusammenhang mit diesem Beitrag deklariert.

### Literatur

Die vollständige Literaturliste finden Sie in der Online-Version des Artikels unter [www.medicalforum.ch](http://www.medicalforum.ch).



## Literatur

- 1 Burnham CA, Dunne WM, Jr., Greub G, Novak SM, Patel R. Automation in the clinical microbiology laboratory. *Clinical chemistry*. 2013;59(12):1696–702.
- 2 Croxatto A, Prod'hom G, Faverjon F, Rochais Y, Greub G. Laboratory automation in clinical bacteriology: what system to choose? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2016;22(3):217–35.
- 3 Dierig A, Frei R, Egli A. The fast route to microbe identification: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(1):97–9.
- 4 Gautier M, Ranque S, Normand AC, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: revolutionising clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2014.
- 5 Egli A, Osthoff M, Goldenberger D, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) directly from positive blood culture flasks allows rapid identification of bloodstream infections in immunosuppressed hosts. *Transpl Infect Dis*. 2015;17(3):481–7.
- 6 Huh HJ, Park KS, Kim JY, et al. Comparison of the Anyplex(TM) II RV16 and Seeplex((R)) RV12 ACE assays for the detection of respiratory viruses. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014;79(4):419–21.
- 7 Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat JM, et al. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Meningitis Encephalitis Panel for the Detection of Bacteria, Viruses and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *Journal of clinical microbiology* 2016.
- 8 Deng X, den Bakker HC, Hendriksen RS. Genomic Epidemiology: Whole-Genome-Sequencing-Powered Surveillance and Outbreak Investigation of Foodborne Bacterial Pathogens. *Annual review of food science and technology*. 2016;7:353–74.
- 9 Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, Petri WA, Jr., Hewlett EL. Whole-genome sequencing in outbreak analysis. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):541–63.
- 10 Knight DR, Elliott B, Chang BJ, Perkins TT, Riley TV. Diversity and Evolution in the Genome of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Rev*. 2015;28(3):721–41.
- 11 Punina NV, Makridakis NM, Remnev MA, Topunov AF. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. *Human genomics*. 2015;9:19.
- 12 Takiff HE, Feo O. Clinical value of whole-genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(9):1077–90.
- 13 Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(8):574–85.
- 14 Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(9):2761–4.
- 15 Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae working g. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2015;20(45).
- 16 Babouee B, Widmer AF, Dubuis O, et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2011;16(11).
- 17 Woerther PL, Angebault C, Lescat M, et al. Emergence and dissemination of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the community: lessons from the study of a remote and controlled population. *J Infect Dis*. 2010;202(4):515–23.
- 18 Bakour S, Sankar SA, Rathored J, Biagini P, Raoult D, Fournier PE. Identification of virulence factors and antibiotic resistance markers using bacterial genomics. *Future microbiology*. 2016;11:455–66.
- 19 Dallman TJ, Byrne L, Ashton PM, et al. Whole-genome sequencing for national surveillance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157. *Clin Infect Dis*. 2015;61(3):305–12.
- 20 Shukla SK, Pantrangi M, Stahl B, et al. Comparative whole-genome mapping to determine *Staphylococcus aureus* genome size, virulence motifs, and clonality. *Journal of clinical microbiology* 2012;50(11):3526–33.
- 21 Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. *Pathology*. 2015;47(3):199–210.
- 22 Pallen MJ, Loman NJ, Penn CW. High-throughput sequencing and clinical microbiology: progress, opportunities and challenges. *Current opinion in microbiology*. 2010;13(5):625–31.
- 23 Frank C, Werber D, Cramer JP, et al. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N Engl J Med*. 2011;365(19):1771–80.
- 24 Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, et al. Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med*. 2011;365(8):709–17.
- 25 Anresis.ch. Anresis.ch: Meldungen ausgewählter multiresistenter Mikroorganismen in der Schweiz. *BAG Bulletin*. 2015;27:510–1.
- 26 Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2015.
- 27 Peacock SJ, de Silva GD, Justice A, et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(10):3764–70.
- 28 Johnson JK, Arduino SM, Stine OC, Johnson JA, Harris AD. Multilocus sequence typing compared to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(11):3707–12.
- 29 Ross IL, Heuzenroeder MW. A comparison of two PCR-based typing methods with pulsed-field gel electrophoresis in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International journal of medical microbiology: IJMM*. 2009;299(6):410–20.
- 30 Babouee B, Frei R, Schultheiss E, Widmer AF, Goldenberger D. Comparison of the DiversiLab repetitive element PCR system with spa typing and pulsed-field gel electrophoresis for clonal characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(4):1549–55.
- 31 Duarte A, Seliwiorstow T, Miller WG, et al. Discriminative power of *Campylobacter* phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of microbiological methods*. 2016;125:33–9.
- 32 Bartels MD, Larner-Svensson H, Meiniche H, et al. Monitoring methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and its spread in Copenhagen, Denmark, 2013, through routine whole genome sequencing. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2015;20(17).
- 33 Hamed M, Nitsche-Schmitz DP, Ruffing U, et al. Whole genome sequence typing and microarray profiling of nasal and blood stream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates: Clues to phylogeny and invasiveness. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2015;36:475–82.
- 34 Harris SR, Cartwright EJ, Torok ME, et al. Whole-genome

- sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(2):130–6.
- 35 Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, et al. Whole genome sequencing identifies zoonotic transmission of MRSA isolates with the novel *mecA* homologue *mecC*. *EMBO Mol Med.* 2013;5(4):509–15.
- 36 Koser CU, Holden MT, Ellington MJ, et al. Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak. *N Engl J Med.* 2012;366(24):2267–75.
- 37 Ugolotti E, Larghero P, Vanni I, et al. Whole-genome sequencing as standard practice for the analysis of clonality in outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a paediatric setting. *The Journal of hospital infection* 2016.
- 38 Brodrick HJ, Raven KE, Harrison EM, et al. Whole-genome sequencing reveals transmission of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a healthcare network. *Genome medicine.* 2016;8(1):4.
- 39 Haller S, Eller C, Hermes J, et al. What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ open.* 2015;5(5):e007397.
- 40 Schaufler K, Semmler T, Wieler LH, et al. Clonal spread and interspecies transmission of clinically relevant ESBL-producing *Escherichia coli* of ST410--another successful pandemic clone? *FEMS microbiology ecology.* 2016;92(1).
- 41 Valentin L, Sharp H, Hille K, et al. Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International journal of medical microbiology: IJMM.* 2014;304(7):805–16.
- 42 Marsh JW, Krauland MG, Nelson JS, et al. Genomic Epidemiology of an Endoscope-Associated Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae*. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144310.
- 43 Jiang Y, Wei Z, Wang Y, Hua X, Feng Y, Yu Y. Tracking a hospital outbreak of KPC-producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* with whole genome sequencing. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2015;21(11):1001–7.
- 44 Khong WX, Xia E, Marimuthu K, et al. Local transmission and global dissemination of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM): a whole genome analysis. *BMC genomics.* 2016;17(1):452.
- 45 Wu W, Feng Y, Carattoli A, Zong Z. Characterization of an *Enterobacter cloacae* Strain Producing both KPC and NDM Carbapenemases by Whole-Genome Sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6625–8.
- 46 Mustapha MM, Marsh JW, Krauland MG, et al. Genomic Epidemiology of Hypervirulent Serogroup W, ST-11 *Neisseria meningitidis*. *EBioMedicine.* 2015;2(10):1447–55.
- 47 Mokrousov I, Chernyaeva E, Vyazovaya A, Sinkov V, Zhuravlev V, Narvskaya O. Next-Generation Sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerging infectious diseases.* 2016;22(6):1127–9.
- 48 Nikolayevskyy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniewski F. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review. *Tuberculosis.* 2016;98:77–85.
- 49 Pankhurst LJ, Del Ojo Elias C, Votintseva AA, et al. Rapid, comprehensive, and affordable mycobacterial diagnosis with whole-genome sequencing: a prospective study. *The Lancet Respiratory medicine.* 2016;4(1):49–58.
- 50 Stucki D, Ballif M, Egger M, et al. Standard Genotyping Over-estimates Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among Immigrants in a Low-Incidence Country. *Journal of clinical microbiology.* 2016;54(7):1862–70.
- 51 Aandahl RZ, Stadler T, Sisson SA, Tanaka MM. Exact vs. approximate computation: reconciling different estimates of *Mycobacterium tuberculosis* epidemiological parameters. *Genetics.* 2014;196(4):1227–30.
- 52 Brouwer S, Barnett TC, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker MJ. *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. *FEBS letters* 2016.
- 53 Basler M. Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2015;370(1679).
- 54 do Vale A, Cabanes D, Sousa S. Bacterial Toxins as Pathogen Weapons Against Phagocytes. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:42.
- 55 Flores-Diaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, Alape-Giron A, Flieger A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR.* 2016;80(3):597–628.
- 56 Kedzierska B, Hayes F. Emerging Roles of Toxin-Antitoxin Modules in Bacterial Pathogenesis. *Molecules.* 2016;21(6).
- 57 Arnold A, Witney AA, Vergnano S, et al. XDR-TB transmission in London: Case management and contact tracing investigation assisted by early whole genome sequencing. *J Infect* 2016.
- 58 Datta G, Nieto LM, Davidson RM, et al. Longitudinal whole genome analysis of pre and post drug treatment *Mycobacterium tuberculosis* isolates reveals progressive steps to drug resistance. *Tuberculosis.* 2016;98:50–5.
- 59 Javid B, Torok ME. Whole-genome sequencing for the diagnosis of drug-resistant tuberculosis. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(1):17.
- 60 Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, Hinds J, Stoker NG, Butcher PD. Clinical use of whole genome sequencing for *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC medicine.* 2016;14:46.
- 61 Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, proteomics & bioinformatics.* 2015;13(5):278–89.
- 62 Eren E, Vijayaraghavan J, Liu J, et al. Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels. *PLoS biology.* 2012;10(1):e1001242..