

Potenziamento della sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria grazie al sequenziamento del genoma batterico

Identificazione completa
degli isolati patogeni tramite
il sequenziamento Illumina
e la SRST2 BaseSpace™ App

illumina®

Introduzione

Le infezioni correlate all'assistenza (HAI, Health care-Associated Infection) sono una delle principali preoccupazioni sanitarie, specialmente nei pazienti gravemente malati e immunocompromessi. Le HAI non solo minacciano la salute e la vita dei pazienti, ma comportano anche un ulteriore onere economico per i pazienti e il sistema sanitario, tra cui la perdita economica diretta e lunghi ricoveri.^{1,2} La sorveglianza dei ceppi batterici patogeni nell'ambito dell'assistenza sanitaria può contribuire a prevenire l'impatto delle HAI. I metodi di laboratorio, come la qPCR e la spettrometria di massa, forniscono una rapida identificazione dei patogeni, permettendo di prendere decisioni terapeutiche tempestive. Tuttavia, questi metodi non sono sufficienti a tracciare le epidemie o a eseguire indagini sulla trasmissione.

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS, Next-Generation Sequencing) consente la caratterizzazione completa dei genomi batterici, fornendo informazioni per la sottotipizzazione, la differenziazione tra isolati, l'evidenziazione degli isolati in un cluster e la resistenza antimicrobica (AMR, Amicromicrobic Resistance) e i marcatori di virulenza.³ L'analisi e l'interpretazione rapida dei dati di sequenziamento consentono al personale di controllo delle infezioni di rispondere rapidamente a potenziali epidemie e di risalire alla fonte per prevenire ulteriori trasmissioni e infezioni. Dopo un flusso di lavoro completo di sequenziamento dell'intero genoma (WGS, Whole-Genome Sequencing) che può essere completato in due giorni, la diffusione dei patogeni responsabili delle HAI può essere monitorata in modo efficiente e gestita correttamente.

Lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) è un patogeno multifarmaco-resistente con tassi di morbilità e mortalità più elevati rispetto ai ceppi di *S. aureus* meticillino-sensibile. Le infezioni causate da ceppi di *S. aureus* meticillino-resistente associato all'ospedale (HA-MRSA, Hospital-Associated Methicillin-Resistant *S. aureus*) richiedono una degenza ospedaliera più lunga rispetto a quelle causate da ceppi di *S. aureus* meticillino-sensibile associato all'ospedale e sono solitamente resistenti agli antibiotici non β -lattamici e β -lattamici.

Per caratterizzare gli isolati di HA-MRSA o altre specie batteriche, Illumina offre la SRST2* App come parte di una soluzione WGS completa che include la preparazione e il sequenziamento delle librerie Illumina (Figura 1). Disponibile nel BaseSpace Sequence Hub, la SRST2 App segnala la presenza di tipi di sequenza (ST, Sequence Type) da un database di tipizzazione di sequenze multi-locus (MLST, Multi-Locus Sequence Typing)⁴ e geni di riferimento da un database di sequenze per geni di virulenza, geni di resistenza e repliconi di plasmidi con confronto campione-campione su oltre 150 generi e specie batterici. La SRST2 App è stata aggiornata per aggiungere il Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) e l'ARG-Annot Database oltre a ResFinder.

Questa nota sull'applicazione dimostra le capacità della SRST2 App aggiornata di identificare e caratterizzare gli isolati patogeni, rendendo la sorveglianza delle HAI accessibile ai laboratori senza precedente esperienza con il NGS.

*Tipizzazione della sequenza a lettura breve



Figura 1: flusso di lavoro di sorveglianza delle HAI. La SRST2 BaseSpace App fa parte di un flusso di lavoro NGS completo per la sorveglianza delle HAI che include la preparazione e il sequenziamento delle librerie Illumina.

Metodi

Campioni

Per questo studio, nel 2016 sono stati raccolti isolati di *S. aureus* (1 da liquido pleurico, 1 da liquido dell'anca, 1 da osso, 1 da liquido corporeo indefinito e 23 da sangue) da più siti clinici nelle contee di Hennepin e Ramsey in Minnesota nell'ambito della normale sorveglianza da parte del Minnesota Department of Health (MDH).⁵

Preparazione dei campioni

Gli isolati sono stati ottenuti come criostock dall'MDH, strisciati su piastre di agar sangue standard e incubati a 37 °C per ottenere colonie singole, che sono state inoculate e coltivate durante la notte a 37 °C in brodo di soia triptico. Il DNA genomico è stato isolato utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, n. di catalogo 51304), integrando il tampone AL con lisostafina. La concentrazione e la qualità del DNA sono state determinate utilizzando un NanoDrop 2000 Spectrophotometer e un Qubit Flex Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, n. di catalogo Q33327).

Preparazione delle librerie e sequenziamento

Le librerie di sequenziamento sono state preparate utilizzando il Nextera™ XT DNA Library Preparation Kit, 24 samples (Illumina, n. di catalogo FC-131-1024) e sottoposte a multiplex utilizzando Nextera XT Index Kit v2 Set A (Illumina, n. di catalogo FC-131-2001). Il WGS è stato eseguito su un Illumina MiSeq™ System utilizzando una corsa paired-end di 2 × 300 bp.

Analisi dei dati

I file di sequenziamento sono stati analizzati con la SRST2 App in BaseSpace Sequence Hub.

Risultati

In base a più database, la SRST2 App ha rivelato che gli isolati possono essere raggruppati in due cluster distinti (Figura 2). Diversi alleli MLST differenziano questi due cluster principali e li suddividono in cluster più piccoli di isolati strettamente correlati (Figura 3). Utilizzando il CARD, la SRST2 App rileva diversi geni di resistenza come *ErmA*, che è associato alla resistenza agli antibiotici macrolidi, una delle classi di antibiotici per uso orale più prescritte negli Stati Uniti (Figura 4).⁶

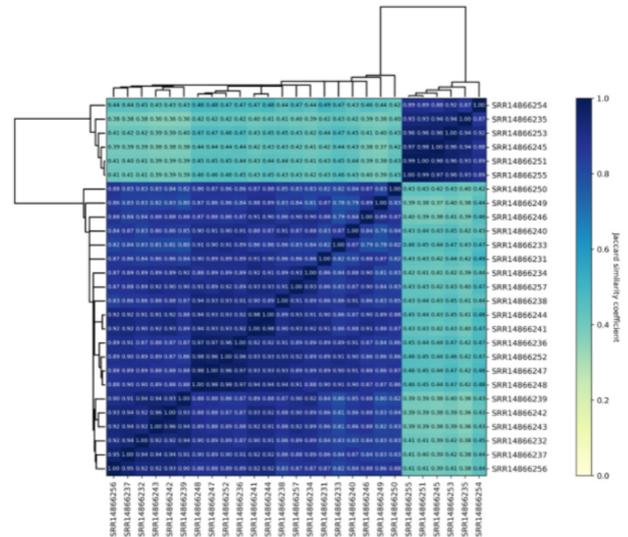
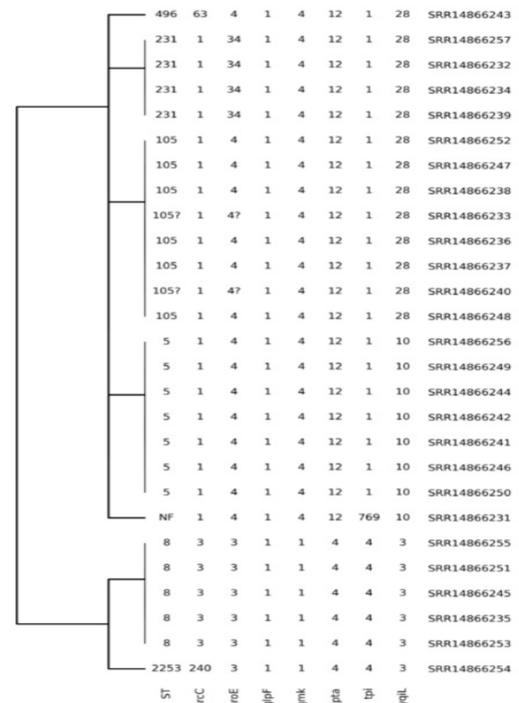


Figura 2: cluster degli isolati con la SRST2 App. Analisi di cluster di dati WGS di isolati simili (blu scuro) in base agli alleli rilevati in più database.

MLST

Scheme	Numero dello schema di loci analizzati
<i>Staphylococcus aureus</i>	7

Dendrogramma



"NF" è utilizzato per indicare combinazioni di alleli non trovate nel database MLST
 (?) viene utilizzato per indicare l'incertezza nei tipi di sequenza identificati
 (*) viene utilizzato per indicare corrispondenze imprecise nei tipi di sequenza identificati

Figura 3: profili di alleli MLST calcolati da WGS. La SRST2 App raggruppa in cluster gli isolati in base al numero di alleli condivisi.

Resistance Gene Database - CARD

Show 25 entries Search:

Sample	ANT4_Agly	APH3_Agly	Erm_MLS	FosB_Fcyn	MphC_MLS	MsrA_MLS	NoriA_Flg
SRR14866251	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866252	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866253	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866254	ant4-1d_128*	-	ermA_2135*	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866255	-	aph3-111a_155	ermC_v1_2138*	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866256	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866257	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866258	ant4-1d_128*	aph3-111a_155	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866259	ant4-1d_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866260	ant4-1d_128*	aph3-111a_155	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866261	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866262	ant4-1d_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866263	ant4-1d_128*	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866264	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866265	-	aph3-111a_155	-	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866266	ant4-1d_128	-	ermC_v1_2138	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866267	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866268	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866269	-	-	ermC_v1_2138	fosB_1_1906*	-	-	noriA_1920*
SRR14866270	-	aph3-111a_155	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866271	-	aph3-111a_155	-	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866272	-	-	ermA_2135	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866273	-	aph3-111a_155	ermC_v2_2139*	fosB_1_1906	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*
SRR14866274	-	-	ermC_v2_2139*	fosB_1_1906	-	-	noriA_1920*
SRR14866275	-	aph3-111a_155	-	fosB_1_1906*	mphC_v1_2177	msrA_v1_2191*	noriA_1920*

Showing 1 to 25 of 27 entries

Figura 4: report dei geni di resistenza. La SRST2 App include una tabella interattiva che indica gli alleli del CARD rilevati in ciascun isolato.

Riepilogo

Le HAI sono una delle principali preoccupazioni per l'assistenza sanitaria e contribuiscono a un'elevata morbilità e mortalità dei pazienti e all'aumento dei costi sanitari. Utilizzando un flusso di lavoro NGS che presenta l'analisi dei dati con la SRST2 App, è possibile rilevare la presenza di geni collegati a fenotipi clinicamente rilevanti, inclusi geni di virulenza, geni AMR o determinanti dei sierotipi. Grazie alla rapida preparazione delle librerie Illumina e al MiSeq System, i genomi batterici possono essere completamente sequenziati e analizzati entro due giorni, consentendo una sorveglianza tempestiva delle HAI.

illumina®

Numero verde 1.800.809.4566 (U.S.A.) | Tel. +1.858.202.4566
techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2023 Illumina, Inc. Tutti i diritti riservati. Tutti i marchi di fabbrica sono di proprietà di Illumina, Inc. o dei rispettivi proprietari. Per informazioni specifiche sui marchi di fabbrica, visitare la pagina web www.illumina.com/company/legal.html.
M-GL-01570 ITA v1.0

Solo a uso di ricerca. Non usare in procedimenti diagnostici.

Maggiori informazioni

[SRST2 BaseSpace App](#)

Bibliografia

- Henderson A, Nimmo GR. [Control of healthcare- and community-associated MRSA: recent progress and persisting challenges](#). *Br Med Bull*. 2018;125(1):25-41. doi:10.1093/bmb/ldx046.
- Jia H, Li L, Li W, et al. [Impact of Healthcare-Associated Infections on Length of Stay: A Study in 68 Hospitals in China](#). *Biomed Res Int*. 2019;2019:2590563. Pubblicato il 18 aprile 2019. doi:10.1155/2019/2590563.
- Mirande C, Bizine I, Giannetti A, Picot N, van Belkum A. [Epidemiological aspects of healthcare-associated infections and microbial genomics](#). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(5):823-831. doi:10.1007/s10096-017-3170-x.
- Huang W, Wang G, Yin C, et al. [Optimizing a Whole-Genome Sequencing Data Processing Pipeline for Precision Surveillance of Health Care-Associated Infections](#). *Microorganisms*. 2019;7(10):388. Pubblicato il 24 settembre 2019. doi:10.3390/microorganisms7100388.
- Khan SA, Gudeta DD, Aljahdali N, et al. [Draft Genome Sequences of 27 Hospital-Associated Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains Isolated in Minnesota](#). *Microbiol Resour Announc*. 2022;11(2):e0118621. doi:10.1128/mra.01186-21.
- Centers for Disease Control and Prevention. [Outpatient antibiotic prescriptions — United States, 2021](#). [cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html](https://www.cdc.gov/antibiotic-use/data/report-2021.html). Aggiornato il 4 ottobre 2022. Consultato il 25 gennaio 2023.