

Statusartikel

Ugeskr Læger 2023;185:V11220690

Fuldgenom-DNA-sekventering til overvågning af bakterielle infektionssygdomme

Michael Kemp^{1, 2}, Xiaohui Chen Nielsen², Mette Damkjær Bartels³, Henrik Hasman⁴ & Eva Møller Nielsen⁵

1) Institut for Regional Sundhedsforskning, Syddansk Universitet, 2) Den Regionale Afdeling for Klinisk Mikrobiologi, Region Sjælland, Sjællands Universitetshospital, Køge, 3) Klinisk Mikrobiologisk Afdeling, Københavns Universitetshospital – Amager og Hvidovre Hospital, 4) Referencelaboratoriet for Antibiotikaresistens og Stafylokokker, Statens Serum Institut, 5) Afdeling for Bakterier, Parasitter og Svampe, Statens Serum Institut

Ugeskr Læger 2023;185:V11220690

Fuldgenom-DNA-sekventering (whole genome sequencing (WGS)) anvendes i stigende grad til fastlæggelse af spredningsveje af bakterier både på hospitaler og i resten af samfundet. WGS er inde i en rivende udvikling med mange nye anvendelser inden for infektionsforebyggelse [1]. Særligt i forbindelse med overvågning og inddæmning af smitte med hospitalsassocierede bakterier og fødevarebårne infektioner er WGS et uvurderligt støtteværktøj til den epidemiologiske kortlægning og afbrydelse af smitteveje.

HOVEDBUDSKABER

- Gennem de seneste ti år er fuldgenomsekventering (WGS) blevet standardmetode til typning og undersøgelse for specifikke gener i bakterier.
- Undersøgelserne har hidtil taget flere uger, men kan nu rutinemæssigt udføres på få dage.
- WGS kan dermed få kliniske konsekvenser og udbrud og smitekilder kan hurtigt identificeres.

Ved mistanke om udbrud med en klon af bakterier er det vigtigt af hensyn til smitteopsporing og afbrydelse af smitteveje hurtigt at fastslå, om et givet bakterieisolat kan være identisk med udbrudstypen. Hertil anvendes i dag forskellige WGS-baserede typningsmetoder, der med større eller mindre detaljeringsgrad kan afklare, hvor beslægtede forskellige isolater af samme bakterieart er.

Udbrud skyldes ikke altid kun spredning af en bestemt klon, men kan også relateres til overførsel og spredning af antibiotikaresistens på tværs af arter og subtyper af bakterier. Antibiotikaresistensgener og andre genetiske egenskaber kan spredes via mobile DNA-sekvenser (plasmider), der koder for egenskaberne [2-4]. I de tilfælde er identifikation af resistensgener og plasmider lige så vigtige for overvågningen som artsidentifikation og typning af bakterierne [5, 6]. Jo hurtigere typning kan foretages, og genetiske egenskaber kan fastlægges, desto hurtigere kan man drage epidemiologiske konklusioner og kliniske konsekvenser.

WGS kan anvendes til alle bakteriearter og kan i dag erstatte tidligere brugte typningsmetoder, der ofte er artsspecifikke og kræver særlige reagenser for hver enkelt art. Derudover er WGS-data entydige, og sekvenser kan nemt udveksles digitalt ved undersøgelser på tværs af hospitaler. Det er dog en udfordring, at der hverken i Danmark eller internationalt er konsensus om tolkning af reglerne for akut udveksling af bakterielle sekvenser

med eller uden ledsagende personhenførbare data. Dette til trods for, at de samme genomsekvenser i forbindelse med videnskabelige publikationer ofte gøres offentligt tilgængelige i internationale genbanker. De største ulemper ved WGS i klinisk sammenhæng er, at metoden traditionelt tager flere dage og er relativt omkostningstung. Nye udviklinger i sekventeringsmetoderne muliggør, at WGS kan udføres hurtigere, i nogle tilfælde helt ned til otte timer. Denne udvikling ændrer mulighederne for tidlig opsporing af smitteveje og -kilder.

Den omfattende WGS af SARS-CoV-2, der har været omtalt i medierne, har haft en positiv afsmitning på organisering af bakteriel WGS. Danske læger vil med stigende hyppighed støde på situationer, hvor WGS er indgået i udredning af udbrud på hospitaler og det øvrige samfund. Formålet med denne artikel er at give læseren en opdatering på baggrund, metode, status og fremtid for anvendelse af WGS i overvågning og udbrudshåndtering af bakterielle infektioner.

FULDGENOMSEKVENTERING TIL OVERVÅGNING OG UDBRUDSEFTERSPORING I DANMARK OG INTERNATIONALT

Referencelaboratoriet for Tarmbakteriologi på Statens Serum Institut (SSI) indførte som det første laboratorium på SSI WGS til den nationale overvågning af *Listeria monocytogenes* i 2013. WGS viste sit værd, da man vha. den afslørede et stort udbrud af listeriose i 2014 og bidrog til identifikation af et bestemt parti rullepølse som kilden til udbruddet [7]. Siden fulgte den nationale typning af de hospitalsassocierede bakterier vancomycinresistente enterokokker (VRE), extended spectrum beta lactamase-producerende *Escherichia coli* og carbapenemaseproducerende organismer [8]. Andre bakterier, som fødevejebårne patogener [9, 10] og tuberkulosebakterier [11, 12], er senere føjet til listen over bakterier, der fuldgenomsekventeres på SSI til national og international overvågning og udbrudseftersporing [13, 14]. SSI har fra starten delt relevante fuldgenomsekvenser og i nogle tilfælde tilhørende bioinformatiske analyser med de lokale klinisk mikrobiologiske afdelinger og dermed løftet en vigtig lokal infektionshygiejnisk opgave.

Blandt de lokale klinisk mikrobiologiske afdelinger startede Amager/Hvidovre Hospital allerede i 2013 med rutinemæssig WGS af alle methicillinresistente *Staphylococcus aureus* og VRE mhp. overvågning og udbrudseftersporing [15]. Indførelsen af WGS forbedrede smitteopsporingen markant og førte bl.a. til opdagelse af et langvarigt hospitalsudbrud, hvor halvdelen af patienterne først blev fundet methicillinresistent *S. aureus*-positive længe efter udskrivelse, hvorfor det var WGS-data, der rejste mistanken om et udbrud [16]. Blandt andre tidlige gennembrud var klarlægning af person til person-spredning på institutioner som årsag til dødeligt forløbende infektioner af husdyrassocierede methicillinresistente *S. aureus* [17]. Siden fulgte andre hospitaler med anvendelse af lokal WGS til smitteopsporing og afklaring af lokale udbrud af bl.a. legionærsyge, VRE-infektioner og methicillinresistent *S. aureus*-sygdom [18-20].

I dag har mange klinisk mikrobiologiske afdelinger fast etablerede WGS-grupper, der på daglig basis bistår i lokal og national overvågning og udbrudseftersporing. Dermed er der potentiale til tæt samarbejde på tværs af hospitaler og regioner.

På europæisk plan er det Den Europæiske Fødevarer sikkerhedsautoritet og Det Europæiske Center for Forebyggelse af og Kontrol med Sygdomme, der varetager overvågningen af patogener hhv. i fødevarer og hos mennesker. Her samarbejder SSI på lige fod med de andre europæiske nationale referencelaboratorier om grænseoverskridende spredning af mikrobielle agens.

TEKNOLOGIER: SEKVENTERING OG SEKVENSANALYSER

I dag anvendes der langt overvejende to teknologier til bakteriel WGS. Short read-sekventering, som hyppigst

udføres med teknologi fra firmaet Illumina, har længe været den altdominerende metode. I de senere år har long read-sekventering, især med anvendelse af firmaet Oxford Nanopore Technology (ONT)s metode vundet fremgang. De to metoder har forskellige fordele og ulemper (Figur 1). Der findes andre producenter af sekventeringsudstyr, men de to nævnte er langt de mest udbredte både i Danmark og internationalt.

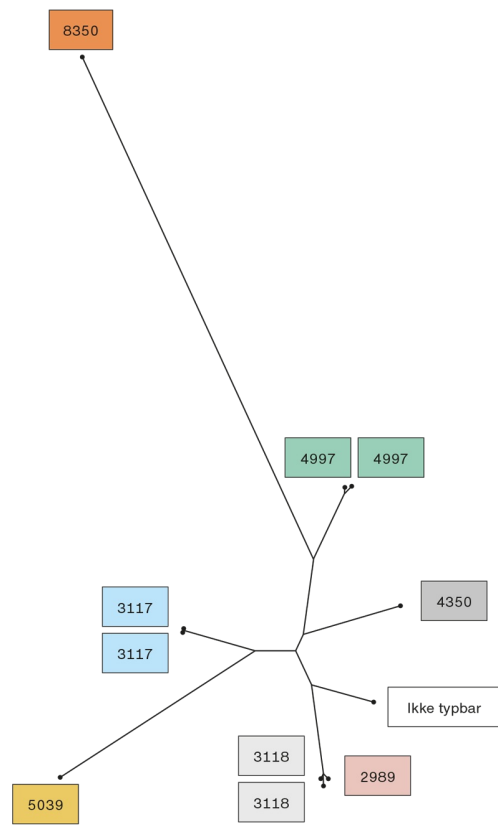
FIGUR 1 DNA-sekvenatorer til mikrobiologisk fuldgenom-sekventering. Til højre vises et ældre instrument, der i en del år har været anvendt til short read-fuldgenomsekventering af bakterier. De to instrumenter til venstre er forskellige udgaver af long read-sekvenatorer. Det lille instrument foran computer-skærmen har indbygget computer, er transportabelt og egnet til små laboratorier med mindre sekventeringsbehov.



Med WGS kan næsten hele genomsekvenser fastlægges i én arbejdsgang, og sekvenser i udvalgte genfragmenter kan ekstraheres med bioinformatiske værktøjer. Forskellige sekvenser i et antal (ofte syv) genfragmenter sammenstilles i overordnede typer. Metoden benævnes multi locus sequence typing (MLST), og de individuelle typer betegnes sekvenstype (ST) efterfulgt af et tal. Højere opløselighed kan opnås ved at udvide antallet af genfragmenter, der anvendes til MLST-typning til op til flere tusinde. Dette kaldes kernegenom MLST (cgMLST) [21-24]. I Danmark har cgMLST ud over til afgrænsning af udbrud også været anvendt til vurdering af varighed af udbrud [25].

Hvis der ønskes endnu større opløselighed, kan bakteriers fuldgenomsekvenser sammenlignes på variationer på enkelte nukleotider (single nucleotide variation (SNV) eller single nucleotide polymorphism (SNP)) (Figur 2). Til undersøgelserne anvendes en referencesekvens, der i dag ofte består af en præcis og komplet genomsekvens for et centralt isolat, f.eks. et af de første isolater fra et udbrud. Komplette fuldgenomsekvenser opnås ved at kombinere data fra Illumina- og ONT-sekventering.

FIGUR 2 Eksempel på tilgang til udredning af hypotetisk udbrud. Her er anvendt data fra *Listeria monocytogenes*. Alle isolater er indledningsvis bestemt som multi locus sequence typing (MLST)-sekvens type 8. Ved core genome (cg)MLST er der fundet complex-typer benævnt med de anførte tal. Et isolat kunne ikke tildeles en kendt cgMLST-typebetegnelse, hvilket ikke er ualmindeligt. Endelig er der udført sammenligning på basis af enkeltnukleotidvariationer i genomerne. Jo længere afstand mellem to isolater, desto flere variationer og dermed fjernere beslægtet er isolaterne indbyrdes. Ved at anvende en komplet genomsekvens af et lokalt sekvens type 8-isolat som reference i sammenligningerne er der opnået meget høj dækningsgrad (97% af alle positioner findes i alle undersøgte isolater) og dermed stor sikkerhed af analyseresultatet. Den komplette genomsekvens for referenceisolatet er opnået ved at kombinere short read- og long read-data. Referencen indgår ikke blandt de viste isolater. Analysen er udført med et online-redskab (CSIPhylogeny 1.4) fra Danmarks Tekniske Universitet. Analysen viser, at der højst er to isolater inden for hver cgMLST-complex-type, og at isolaterne inden for de enkelte complex-typer er meget ens. Complex-typerne 3118 og 2989 er tæt beslægtede og bør betragtes som muligt epidemiologisk relaterede. Der er således ikke observeret ophobninger på mere end højst tre tæt beslægtede isolater, hvilket indikerer, at der ikke umiddelbart er omfattende klonale udbrud. Denne type analyser bør altid sammenholdes med epidemiologiske data for at opnå en komplet vurdering.



De genetiske analyser kan anvendes til identificering af smittekilder (inficerede personer, fødevarer, vandforsyninger, afløb, mv.), idet beslægtede bakterier i praksis ofte antages at være af klonal oprindelse og dermed epidemiologisk relaterede.

Softwareløsninger

Danmarks Tekniske Universitet har udviklet en række online »plug'n play« analyseværktøjer, der ikke forudsætter et dybereliggende kendskab til bioinformatik. Værktøjerne er gratis at benytte og vedligeholdes bl.a. i samarbejde med SSI. I både Danmark og udlandet har disse værktøjer bidraget til udbredelsen af anvendt WGS [4, 26]. Andre organisationer tilbyder også enkle og klinisk relevante bioinformatiske værktøjer, enten gratis eller mod betaling [27].

Specielt til typning findes forskellige bioinformatiske værktøjer til bearbejdning af de meget omfattende data, der opnås med WGS. Enkle og umiddelbart intuitive softwareløsninger fra bl.a. firmaerne 1928 Diagnostics, BioNumerics og Ridom muliggør MLST og cgMLST af bakterier. Med disse løsninger kan man anvende WGS til overvågning i enheder med begrænset bioinformatisk ekspertise [28, 29]. Da systemerne gemmer data, og nogle af dem automatisk advarer ved ophobninger af beslægtede bakterier, afslører de både potentielle nye udbrud og langvarige udbrud med sjældent forekommende bakteriestammer.

SENESTE UDVIKLING OG FREMTID

Dag til dag-ONT-WGS udføres nu i udvalgte tilfælde i Region Sjælland ved mistanke om udbrud. Hurtig genomisk udrådning har for nylig været anvendt til potentielle eller bekræftede udbrud af panoftalmi, *Pseudomonas aeruginosa*-infektioner og listeriose. I fremtiden vil der i mange sammenhænge kunne sekventeres akut, og fuldgenomsekvenser vil kunne sammenlignes med sekvenser fra andre laboratorier for hurtigt at fange regional eller international spredning. For at få det fulde udbytte af overvågning baseret på WGS arbejder SSI og de kliniske mikrobiologiske afdelinger på at udvikle en fælles analyseplatform med indbyggede kvalitetsvurderinger og fælles databaser, der er tilgængelige for alle de diagnostiske laboratorier og hygiejnenheder på hospitalerne. Herudover findes der kommercielle platforme, som tillader deling af fuldgenomsekvenser blandt flere brugere på tværs af institutioner og landegrænser [30]. Flere danske regioner bruger det nationale danske computercenter Computerome til opbevaring, bearbejdning og deling af bakterielle fuldgenomsekvenser.

Prisen for at udføre WGS er fortsat relativt høj, ofte tusind kroner eller mere pr. isolat alene i forbrugsvarer, men den kan nedbringes væsentligt ved stordrift. Enkelte danske hospitaler udfører WGS på et meget stort antal bakterielle isolater og ikke kun på bakterier, der ud fra artsidentifikation eller særlige resistensegenskaber umiddelbart rejser mistanke om mulig spredning. Dermed opnås vigtige oplysninger om underliggende spredningsveje på hospitalerne, længe inden de viser sig ved spredning af særligt problematiske bakterier som f.eks. multiresistente bakterier.

I tillæg til typning indeholder fuldgenomsekvenser også meget anden vigtig information, som indgår i karakterisering og genkendelse af udbrudsstammer. Identifikation af antibiotikaresistensgener og resistensskabende mutationer [29], virulensfaktorer [15], samt markører for oprindelse (f.eks. husdyrsassocierede methicillinresistente *S. aureus* [17, 20]) kan alt sammen fastlægges ud fra fuldgenomsekvenser. Fremover må det forventes, at disse informationer bliver inddraget i stigende grad til både behandling og overvågning.

DISKUSSION OG KONKLUSION

Indførelse af WGS i overvågning af bakterielle infektionssygdomme har grundlæggende ændret effektiviteten af overvågning og udbrudshåndtering af bakterier.

Hvor det før som regel var epidemiologiske data, der gav mistanke om udbrud, er det i dag ofte WGS-data, der

giver anledning til at undersøge, om der kan påvises en sammenhæng mellem patienter i tid og/eller sted. WGS har ført til, at flere udbrud påvises. Metoden giver langt flere og mere entydige resultater end tidligere teknikker og kan appliceres på alle dyrkbare bakterier.

WGS har fundet en plads i overvågning af bakterielle infektioner lokalt, nationalt og internationalt. WGS kan udføres på ned til en dag, og data kan umiddelbart deles mellem laboratorier til gavn for smitteopsporing. De tekniske løsninger er tilgængelige, men der mangler stadig finansiering og organisering, for at dette kan implementeres fuldt ud til gavn for fødevarerikkerhed og infektionsforebyggelse på hospitaler og på institutioner.

Korrespondance *Michael Kemp*. E-mail: mkemp@regionsjaelland.dk

Antaget 30. marts 2023

Publiceret på ugeskriftet.dk 29. maj 2023

Interessekonflikter ingen. Forfatterens ICMJE-formularer er tilgængelige sammen med artiklen på ugeskriftet.dk

Artikelreference Ugeskr Læger 2023;185:V11220690

SUMMARY

Whole genome sequencing for surveillance of bacterial infectious illnesses

Michael Kemp, Xiaohui Chen Nielsen, Mette Damkjær Bartels, Henrik Hasman & Eva Møller Nielsen

Ugeskr Læger 2023;185:V11220690

This review summarises the current knowledge of whole genome sequencing (WGS) which has become the standard method for genetic characterisation of bacteria in surveillance and outbreak investigation. Although the method offers many advantages, its use in outbreak investigations is hampered by the relatively slow turn-around time. Using new approaches to perform WGS, typing and gene detection can now be completed within one day. This break-through allows clinical consequences to be taken almost immediately after detection of relevant bacteria and may have a huge impact on the future prevention of transmission of infectious diseases.

REFERENCER

1. Kemp M, Maiers M. Editorial: Application of next generation sequencing (NGS) in infection prevention. *Front Public Health*. 2022;10:945595. doi:10.3389/fpubh.2022.945595.
2. Samuelsen Ø, Hansen F, Aasnæs B et al. Dissemination and characteristics of a novel plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase, OXA-436, found in isolates from four patients at six different hospitals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 62(1):e01260-17. doi:10.1128/AAC.01260-17.
3. Hammerum AM, Hansen F, Nielsen HL et al. Use of WGS data for investigation of a long-term NDM-1-producing *Citrobacter freundii* outbreak and secondary in vivo spread of blaNDM-1 to *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Nov;71(11):3117-3124. doi:10.1093/jac/dkw289.
4. Kemp M, Jespersen MG, Toft A, Holm A. Free online genome analyses reveal multiple strains in the beginning of a hospital outbreak of *Enterobacter hormaechei* carrying bla OXA-436 carbapenemase gene. *J Infect Prev*. 2022;23(5):243-247. doi:10.1177/17571774221107293.
5. Pinholt M, Bayliss SC, Gumpert H et al. WGS of 1058 *Enterococcus faecium* from Copenhagen, Denmark, reveals rapid clonal expansion of vancomycin-resistant clone ST80 combined with widespread dissemination of a vanA-containing plasmid and acquisition of a heterogeneous accessory genome. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(7):1776-1785. doi:10.1093/jac/dkz118.
6. Pinholt M, Gumpert H, Bayliss S et al. Genomic analysis of 495 vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* reveals broad dissemination of a vanA plasmid in more than 19 clones from Copenhagen, Denmark. *J Antimicrob Chemother*.

- 2017;72(1):40-47. doi:10.1093/jac/dkw360
7. Jensen AK, Nielsen EM, Björkman JT et al. Whole-genome sequencing used to investigate a nationwide outbreak of listeriosis caused by ready-to-eat delicatessen meat, Denmark, 2014. *Clin Infect Dis*. 2016;63(1):64-70. doi:10.1093/cid/ciw192.
 8. Høg BB, Sönksen UW, red. DANMAP 2021. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. www.danmap.org/reports/2021 (3. jan 2023).
 9. Joensen KG, Kuhn KG, Müller L et al. Whole-genome sequencing of *Campylobacter jejuni* isolated from Danish routine human stool samples reveals surprising degree of clustering. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:201.e5-201.e8.
 10. Joensen KG, Schjørring S, Gantzhorn MR et al. Whole genome sequencing data used for surveillance of *Campylobacter* infections: detection of a large continuous outbreak, Denmark, 2019. *Euro Surveill*. 2021;26(22):2001396. doi:10.2807/1560-7917.ES.2021.26.22.2001396.
 11. Folkvardsen DB, Norman A, Rasmussen EM et al. Recurrent tuberculosis in patients infected with the predominant *Mycobacterium tuberculosis* outbreak strain in Denmark. *Infect Genet Evol*. 2020;80:104169. doi:10.1016/j.meegid.2020.104169.
 12. Bjorn-Mortensen K, Soborg B, Koch A et al. Tracing *Mycobacterium tuberculosis* transmission by whole genome sequencing in a high incidence setting: a retrospective population-based study in East Greenland. *Sci Rep*. 2016;6:33180. doi:10.1038/srep33180.
 13. Espenhain L, Riess M, Müller L et al. Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019. *Euro Surveill*. 2019;24(24):1900368. doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.24.1900368.
 14. Schjørring S, Lassen SG, Jensen T et al. Cross-border outbreak of listeriosis caused by cold-smoked salmon, revealed by integrated surveillance and whole genome sequencing (WGS), Denmark and France, 2015 to 2017. *Euro Surveill*. 2017;22(50):17-00762. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.50.17-00762.
 15. Bartels M, Larnar-Svensson H, Meiniche H et al. Monitoring meticillin resistant *Staphylococcus aureus* and its spread in Copenhagen, Denmark, 2013, through routine whole genome sequencing. *Euro Surveill*. 2015;20(17):21112. doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21112.
 16. Rubin IM, Hansen TA, Klingenberg AM et al. A sporadic four-year hospital outbreak of a ST97-IVa MRSA with half of the patients first identified in the community. *Front Microbiol*. 2018;9:1494. doi:10.3389/fmicb.2018.01494. eCollection 2018.
 17. Nielsen RT, Kemp M, Holm A et al. Fatal septicemia linked to transmission of MRSA clonal complex 398 in hospital and nursing home, Denmark. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(5):900-2. doi:10.3201/eid2205.151835.
 18. Hansen SK, Andersen L, Detlefsen M et al. Using core genome multilocus sequence typing (cgMLST) for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates to guide infection control interventions and end an outbreak. *J Glob Antimicrob Resist*. 2021;24:418-423. doi:10.1016/j.jgar.2021.02.007.
 19. Madsen AMR, Holm A, Jensen TG et al. Whole-genome sequencing for identification of the source in hospital-acquired Legionnaires' disease. *J Hosp Infect*. 2017;96(4):392-395. doi:10.1016/j.jhin.2017.04.020.
 20. Jensen MLS, Skov NM, Kristiansen HP et al. Core genome multi-locus sequence typing as an essential tool in a high-cost livestock-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 hospital outbreak. *J Hosp Infect*. 2020;104(4):574-581. doi:10.1016/j.jhin.2019.12.009.
 21. Mellmann A, Andersen PS, Bletz S et al. High interlaboratory reproducibility and accuracy of next-generation-sequencing-based bacterial genotyping in a ring trial. *J Clin Microbiol*. 2017;55(3):908-913. doi:10.1128/JCM.02242-16.
 22. De Been M, Pinholt M, Top J et al. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3788-97. doi:10.1128/JCM.01946-15.
 23. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJJ et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(4):350-354. doi:10.1016/j.cmi.2017.12.016.
 24. Cabal A, Rab G, Daza-Prieto B et al. Characterizing antimicrobial resistance in clinically relevant bacteria isolated at the human/animal/environment interface using whole-genome sequencing in Austria. *Int J Mol Sci*. 2022;23(19):11276. doi:10.3390/ijms231911276.
 25. Knudsen MJS, Rubin IMC, Gisselø K et al. The use of core genome multilocus sequence typing to determine the duration of

- vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreaks. *APMIS*. 2022;130(6):323-329. doi:10.1111/apm.13216.
26. Sonda T, Kumburu H, van Zwetselaar M et al. Molecular epidemiology of virulence and antimicrobial resistance determinants in *Klebsiella pneumoniae* from hospitalised patients in Kilimanjaro, Tanzania. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(10):1901-1914. doi:10.1007/s10096-018-3324-5.
 27. Carriço JA, Rossi M, Moran-Gilad J et al. A primer on microbial bioinformatics for nonbioinformaticians. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(4):342-349. doi: 10.1016/j.cmi.2017.12.015.
 28. Marbjerg L, Stougaard CL, Sørensen S-AG et al. A new tool for analyses of whole genome sequences reveals dissemination of specific strains of vancomycin-resistant *enterococcus faecium* in a hospital. *Front Med*. 2021;(27)8:733676. doi: 10.3389/fmed.2021.733676.
 29. Jensen MLS, Chen M, Detlefsen M et al. Whole-genome sequence analyses by a new easy-to-use software solution support the suspicion of a neonatal ward outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and transmission between hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022;43(7):947-949. doi: 10.1017/ice.2021.123.
 30. Dyrkell F, Fang H, Giske C et al. Vancomycin-resistant *enterococcus* (VRE) RapidShare study Europe: evaluating cloud based whole genome sequencing outbreak analysis between five European hospitals, 2021. Poster, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.