

Vollständige Genomsequenzierung

IDF Faktencheck 1/2019

Jüngste Fortschritte in der schnellen Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierung haben die biologische Forschung revolutioniert und werden derzeit in der „Mikrobiologischen Risikoabschätzung“ (MRA) genutzt, um die Lebensmittelsicherheit sowie den Verbraucherschutz zu verbessern. „Sequenzierungstechnologien der nächsten Generation“ haben eine Bandbreite an Anwendungen, wie beispielsweise die Sequenzierung von mikrobiellen Genomen und die kulturfreie Identifikation von mikrobiellen Gemeinschaften.

Behörden nutzen dieses Werkzeug zur:

- Rückverfolgung der Herkunft bakterieller Verunreinigungen,
- Identifizierung einzelner Zwischenfälle beim Menschen, welche durch den Verzehr einzelner Lebensmittel entstanden sind,
- Erkennung, Untersuchung und Kontrolle von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen.

Lebensmittelhersteller nutzen es um:

- Verderbs-Gemeinschaften in der Verarbeitungsumgebung zu identifizieren,
- Lebensmittel-Mikrobiota zu charakterisieren,
- eine Nicht-Involvierung in spezifischen Fällen von Ausbrüchen zu belegen,
- die Herkunft von Lebensmitteln zu authentifizieren.

Diese Hochdurchsatz-Technologien sind in der Lage, mit hohem Tempo Genomsequenzen von Schlüssel-Krankheitserregern, wie z.B. *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* und *Cronobacter* spp., zu produzieren. Der Vergleich dieser Sequenzen mit den isolierten Sequen-

zen der betroffenen klinischen Patienten erlaubt ein gezielteres Erkennen von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen im Frühstadium. Darüber hinaus können Ausbrüche sowie deren geografische Herkunft zurückverfolgt werden.

Taxonomie von Mikroben

Eine bakterielle Art kann anhand von Stämmen, welche einen hohen Grad an phänotypischen und / oder genotypischen Ähnlichkeiten zum Typ-Stamm der Art aufweist, erkannt werden. Während bereits die Möglichkeit besteht, objektive Messungen für die Ähnlichkeit vorzuschlagen, z.B. prozentuale Genom-Hybridisierung oder Sequenzähnlichkeit, gibt es noch keine praxistaugliche und einvernehmliche Definition, um für bakterielle Arten eine taxonomische Einheit zu bilden.

Eine prokaryotische Art ist wie folgt definiert:

- Es ist eine stammesgeschichtliche Komponente vorhanden. Dies ist das kleinste diagnosefähige Cluster individueller Organismen worin elterliche Muster der Abstammung vorhanden sind.
- Ebenfalls muss eine taxonomische Komponente vorhanden sein. Diese ist eine Gruppe ähnlicher Organismen, welche von anderen ähnlichen Gruppen mithilfe bestimmter genotypischer, phänotypischer und / oder ökologischer Charakteristiken unterschieden werden kann.

Innerhalb einer Art ist ein Stamm ein spezifisches Isolat, welches von einem anderen Stamm der gleichen Art zu unterscheiden ist. Hierfür wurden im letzten Jahrhundert mehrere Techniken entwickelt. Am Ende gipfelten jene Techniken in der Genomsequenzierung als endgültige Lösungstechnologie zur Unterscheidung von Stämmen und der Ableitung ihrer Stammesgeschichte.



GERMANY

Vollständige Genomsequenzierung als Typisierungstechnik für die Herkunftsanalyse

Die Vollständige Genomsequenzierung (engl.: whole genome sequencing - WGS) wurde zum ersten Mal in den USA im Jahr 2008 für die Herkunftsanalyse eingesetzt. Im Anschluss ersetzte sie binnen kurzer Zeit die vorher gängige Pulsfeld-Gelelektrophorese und wurde zur bevorzugten Methode der Nahrungs- und Arzneimittelbehörde für die Identifikation sowie der Ortung krankheitserregender Isolate aus Lebensmittelproben. Diese Technik wird heutzutage weltweit von vielen Behörden im Bereich der Lebensmittelsicherheit verwendet.

Die WGS ist eine analytische Technik, welche erlaubt, das komplette DNS Genom eines Mikroorganismus zu bestimmen. Die WGS verbessert die Erkennung, Überwachung und Reaktion auf lebensmittelbedingte Krankheiten und Ausbrüche. Diese Technologie bietet ein einheitliches Typisierungssystem innerhalb des Umwelt-, Tier-, Lebensmittel- und Humansektors.

Die WGS ist wiederholbarer und reproduzierbarer als bisher genutzte Techniken, wie beispielsweise die Pulsfeld-Gelelektrophorese. Aufgrund der digitalen Natur genomischer Daten, kann die Stamm-Level Identifikation von Laboren auf der ganzen Welt, unter Verwendung einer offenen Datenbank, wie GenomeTrakr, geteilt und verglichen werden. Lebensmittelmikrobiologen sowie klinische Mikrobiologen können nun die Herkunft von Lebensmittelkontaminationen mithilfe des Vergleichs klinischer Isolate und epidemiologisch Daten lokalisieren. Folglich können damit Lebensmittelerkrankungen leicht auf ihren Ursprungsort zurückverfolgt werden.

Regulatorische Institutionen können die Herkunft kleiner Ausbrüche mit einer kleinen Anzahl klinischer Isolate identifizieren oder langanhaltende Kontaminationen in Verbindung zu sporadisch auftretenden Fällen in der Bevölkerung bringen.

Vollständige Genomsequenzierung und Lebensmittelsicherheit: Jenseits der Identifikation

Die WGS ist genauer als ein Serotyp und liefert eine größere Unterscheidungskraft als die Pulsfeld-Gelelektrophorese, die Ribotypisierung, die zufällig vervielfältigte polymorphe DNA (RAPD) oder der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). In Verbindung mit epidemiologischen Daten ist es möglich, schneller Beziehungen zwischen unterschiedlichen Isolaten zu finden.

- Die WGS bietet die Möglichkeit:
- Quellen der Kontaminationen zu unterscheiden, selbst bei gleichzeitigem Ausbruch.
- Herauszufinden, welche Bestandteile eines Produktes durch den Krankheitserreger kontaminiert wurden und folglich die Eingrenzung auf der Suche nach der Herkunft der Kontamination.
- Unerwartete Vektoren für die Lebensmittelkontamination ausfindig zu machen und Informationen für eine Ursachenanalyse bereitzustellen.
- Phänotypische Eigenschaften von Isolaten, wie zum Beispiel antibiotische Resistenzen, Virulenz, Sensitivität zu Reinigungsmitteln oder Anhaftung am Produkt zu bestimmen.

Herausforderungen und Grenzen der WGS

Seit der Einführung wächst, zumindest in Nordamerika, Europa und im Asiatisch Pazifischen Raum, die Nutzung von WGS exponentiell.

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wurde als der „Gold Standard“ für die Stammtypisierung mehr als 30 Jahre lang genutzt. Aufgrund des Kapazitätsaufbaus, z.B. Training, Ausrüstung, Räumlichkeiten, Datenverarbeitung, kann diese Technologie nicht kurzfristig durch eine Methodik, welche weder standardisiert noch harmonisiert

ist, ersetzt werden. Darüber hinaus ist die Pulsfeld-Gelelektrophorese für eine globale Nutzung immer noch kosteneffektiver als die WGS.

Derzeit sind die größten Herausforderungen in der Anwendung der WGS:

- Teurer als andere Typisierungsmethoden.
- Es fehlt ein technischer Standard.
- Es fehlen internationale Grenz- und Schwellenwerte, welche zwischen Stämmen differenzieren (Einzel-Nukleotid-Polymorphismen - ENP). Die gezählten Einzel-Nukleotid-Polymorphismen können für jeden Mikroorganismus spezifisch sein.
- Die Interpretation der Ergebnisse bedarf der Anwesenheit von Bioinformatikspezialisten.
- Bisher gibt es keine international akzeptierte Vorgehensweise, um WGS-Daten in Datenbanken vor Missbrauch zu schützen.

Es ist zu betonen, dass Lebensmittelsicherheitskrankheiten oder Zwischenfälle nicht allein mit WGS-Daten gelöst werden können, sondern immer mit Hilfe von epidemiologischen Daten abgesichert werden müssen.

Was macht die Milchindustrie?

Die WGS erlaubt die Identifikation und Charakterisierung von Mikroorganismen mit einem hohen Maß an Sensibilität und Spezifität. Die Technologie entwickelt sich weiterhin schnell, aber zurzeit sind nur wenige Standards vorhanden. IDF unterstützt aktiv die ISO-Arbeitsgruppe zur Erstellung eines WGS-Standards, z.B. mit den Anforderungen an Spezifität, Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit.

Prozessumwelt, Monitoring, Sammeln von Isolaten und WGS-Analyse zur Identifizierung und Unterscheidung von ansässigen und vergänglichen Stämmen wird empfohlen, um Kontaminationen von fertigen Produkten zu verhindern und negative Folgen an Verbrauchern zu vermeiden. Die Technik kann auch für die Sicherheitsbestätigung von mikrobiologischen Lebensmittelkulturen genutzt werden.

Literatur

EFSA (European Food Safety Authority), García Fierro R, Thomas-Lopez D, Deserio D, Liebana E, Rizzi V and Guerra B, 2018. Outcome of EC/EFSA questionnaire (2016) on use of Whole Genome Sequencing (WGS) for food- and waterborne pathogens isolated from animals, food, feed and related environmental samples in EU/EFTA countries. EFSA supporting publication 2018:EN-1432, 49 pages

ISO/TC34/SC9, 2018. Microbiology of the Food Chain — Genomic sequencing of foodborne microorganisms — General requirements and guidance for bacterial genomes. N2133, working document

FAO-WHO, 2016. Applications of Whole Genome Sequencing in food safety management. Technical Background Paper. Available at: <http://www.fao.org/3/a-i5619e.pdf>

Jackson B.R., Tarr C., Strain E., Jackson K.A., Conrad A., Carleton H., Katz L.S., Stroika S., Gould L.H., Mody R.K., Silk B.J., Beal J., Chen Y., Timme R., Doyle M., Fields A., Wise M., Tillman G., Defibaugh-Chavez S., Kucerova Z., Sabol A., Roache K., Trees E., Simmons M., Wasilenko J., Kubota K., Pousee H., Klimke W., Besser J., Brown E., Allard M., Gerner-Smidt P., Implementation of Nationwide Real-



time Whole-genome Sequencing to Enhance Listeriosis Outbreak Detection and Investigation. Clin Infect Dis. 2016 Aug 1;63(3):380-6.

Kovac, J., den Bakker, H., Carroll, L.M., Wiedmann, M., 2017. Precision food safety: A systems approach to food safety facilitated by genomics tools. Trends in Analytical Chemistry 96 52-61

Technical University of Denmark - National Food Institute; Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana; Federal Institute for Risk Assessment; National Institute of Public Health – National Institute of Hygiene; National Veterinary Research Institute; Public Health England; Animal and Plant Health Agency, and Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2018. Final report of ENGAGE - Establishing Next Generation sequencing Ability for Genomic analysis in Europe. EFSA supporting publication 2018:EN-1431. 252 pages.

*Quelle: IDF Factsheet "Whole Genome Sequencing"
001/2019-04*