

Next Generation Sequencing zum Virus-Nachweis in Lebensmitteln

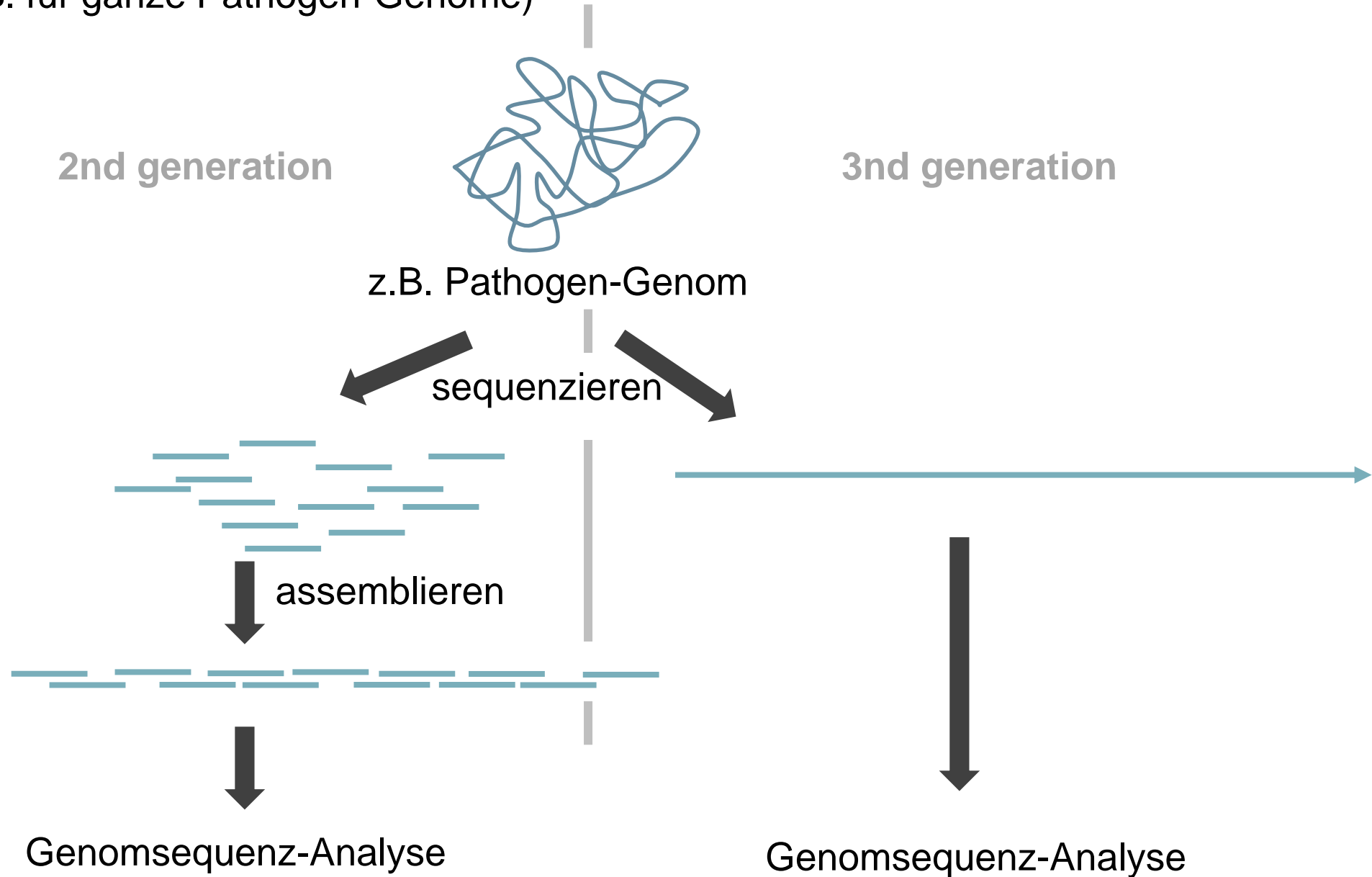
Reimar Johne,
Bundesinstitut für Risikobewertung

Prinzip des Next Generation Sequencing (NGS)

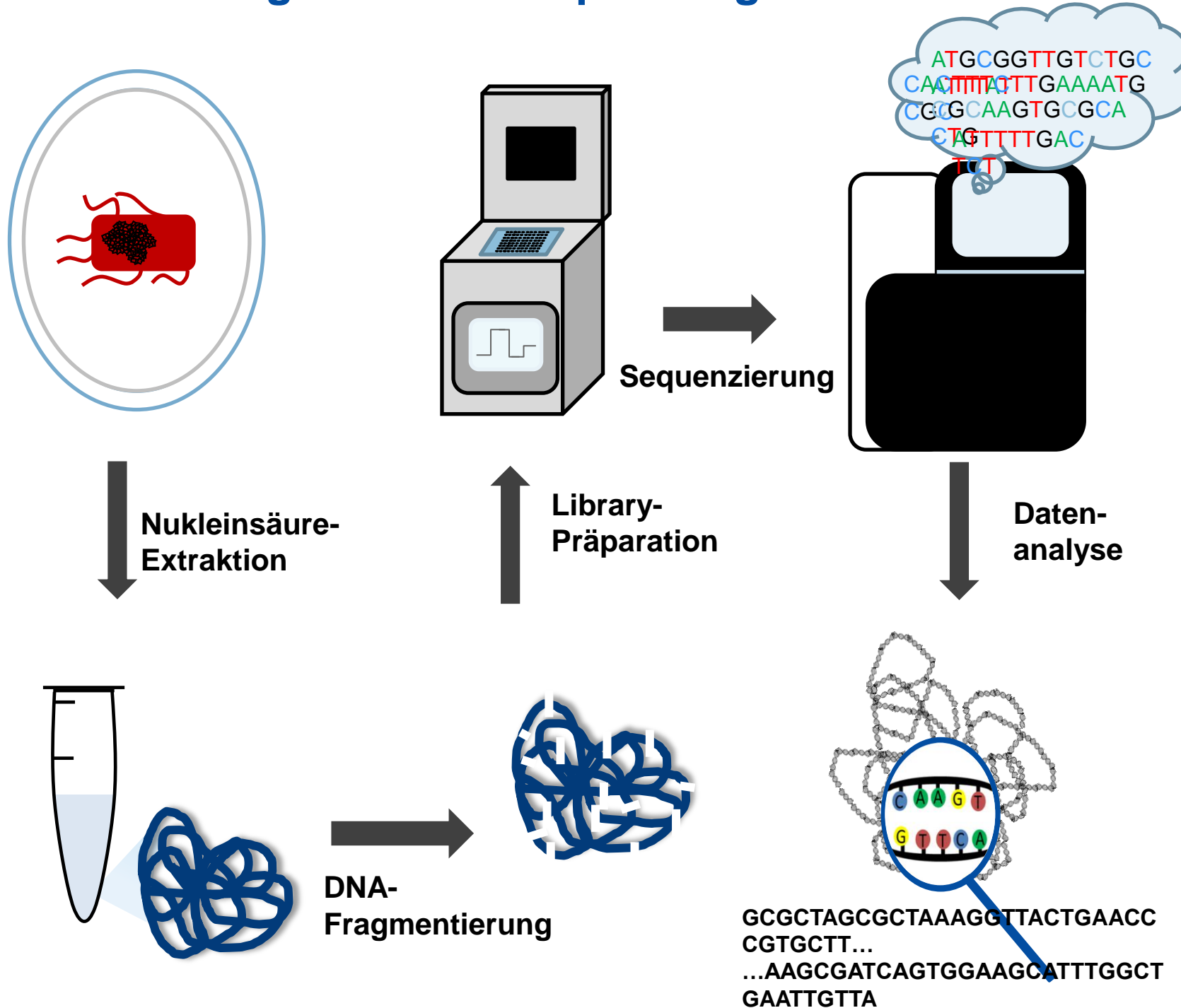
- Generierung großer Mengen von Sequenzdaten aus einer Probe (z.B. für ganze Pathogen-Genome)

Prinzip des Next Generation Sequencing (NGS)

→ Generierung großer Mengen von Sequenzdaten aus einer Probe
(z.B. für ganze Pathogen-Genome)

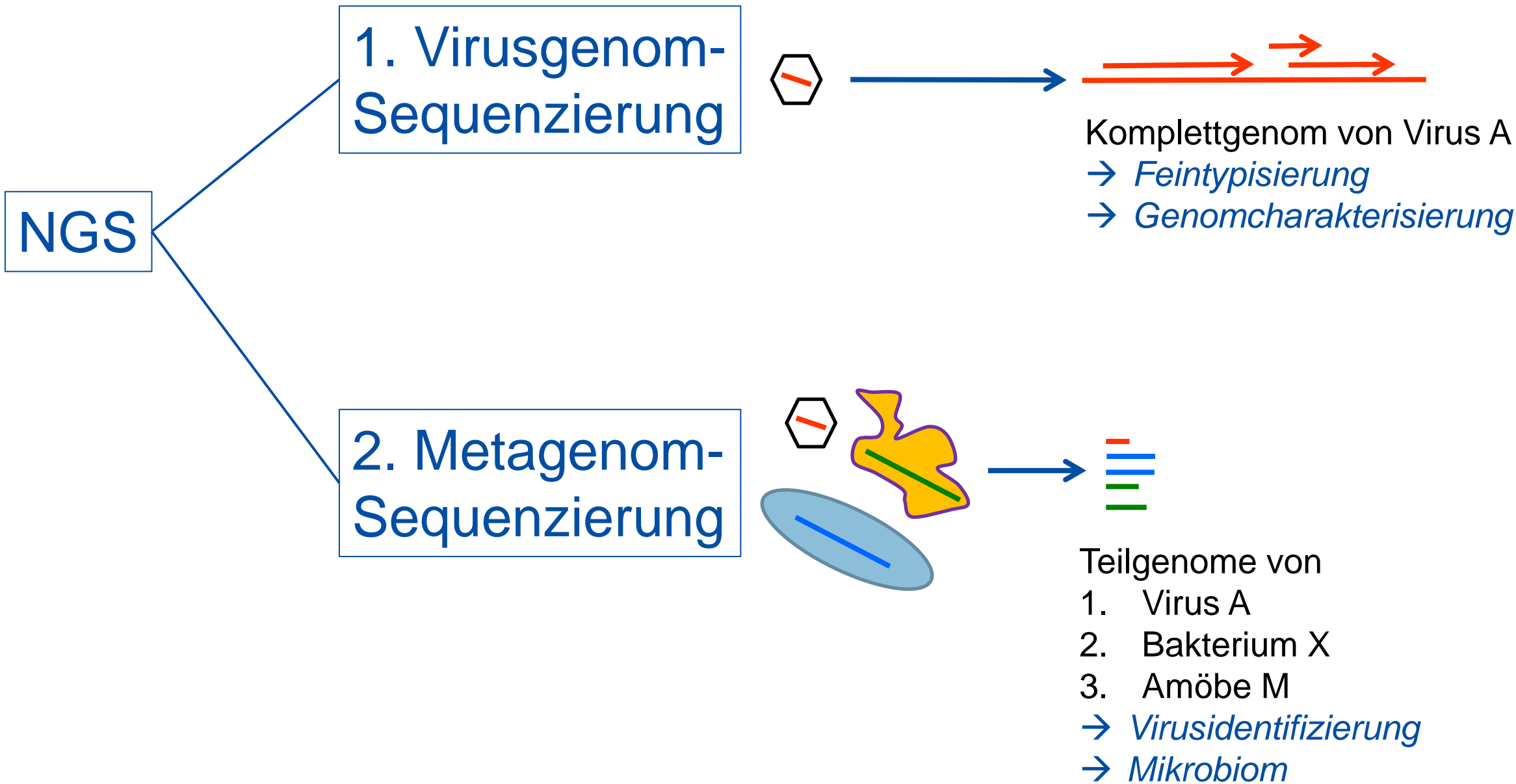


Illumina: Second generation sequencing workflow



NGS für Lebensmittel-assoziierte Viren

NGS für Lebensmittel-assoziierte Viren



1. Virusgenom-Sequenzierung

- gereinigte oder angereicherte Viruspräparationen vorteilhaft

→ gut geeignet sind Zellkultur-Überstände, aber auch andere Flüssigkeiten

- Beispiele:
- Rotavirus aus Zellkultur-Überstand (Trojnar et al., 2013) oder Kotproben (Masuda et al., 2014)
 - Hepatitis A-Virus aus Zellkultur-Überstand (Chiapponi et al., 2014)
 - Norovirus in Stuhlproben von Patienten (Parra et al., 2017)
 - Hepatitis E –Virus in Gallenflüssigkeit (Sotomayor-González et al., 2018)

2. Metagenom-Sequenzierung

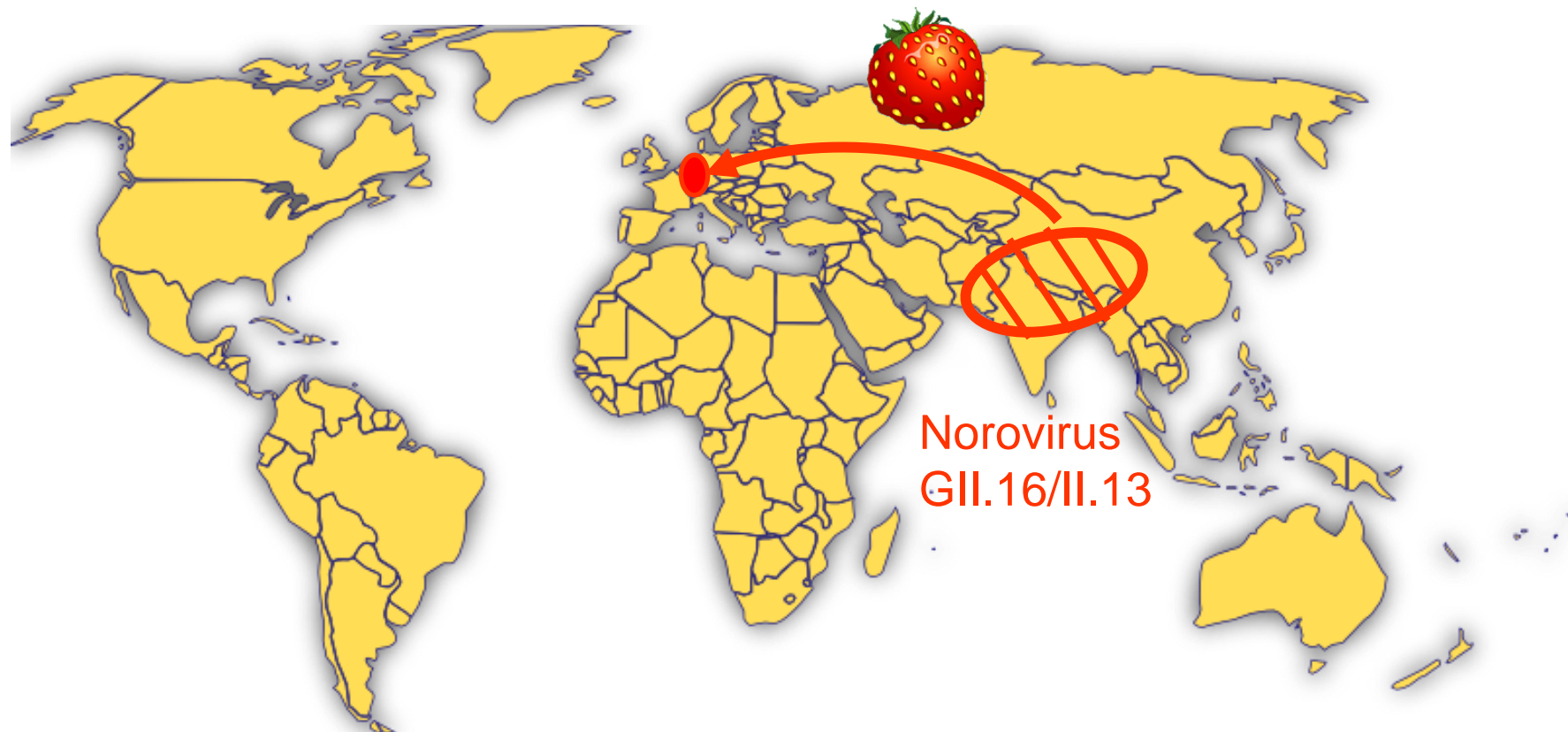
- prinzipiell sind alle Matrices möglich
- schwierig, da oft wenig Viren-Genom im Verhältnis zu anderem genetischen Material vorhanden

- Beispiele:
- Rota- und Picobirnaviren in Salatproben (Aw et al., 2016)
 - Noroviren in Japanischen Austern (Imamura et al., 2017)
 - Hepatitis E-Virus in Wurst (Kubacki et al., 2017)
 - Nachweis von Norovirus und HAV nach artifizieller Kontamination von Sellerie mit geringen Mengen (10^3 Kopien) (Yang et al., 2017)

Beispiel:

Norovirus-Ausbruch in Deutschland, 2012

Beispiel: Norovirus-Ausbruch in Deutschland, 2012



Oktober/November 2012:

→ **10.974 erkrankte Kinder/Jugendliche** nach
Verzehr von importierten Tiefkühl-Erdbeeren

Beispiel: Norovirus-Ausbruch in Deutschland, 2012

Untersuchungen an den Tiefkühl-Beeren in 2012:

- Norovirus mittels real-time RT-PCR nachweisbar (in 7 von 11 Teilproben)
- Sequenzierung von zwei RT-PCR-Fragmenten: **Norovirus GII.P16/GII.13**
- Quantifizierung mittels real-time RT-PCR: **257** Norovirus-**Genomkopien**/25 g

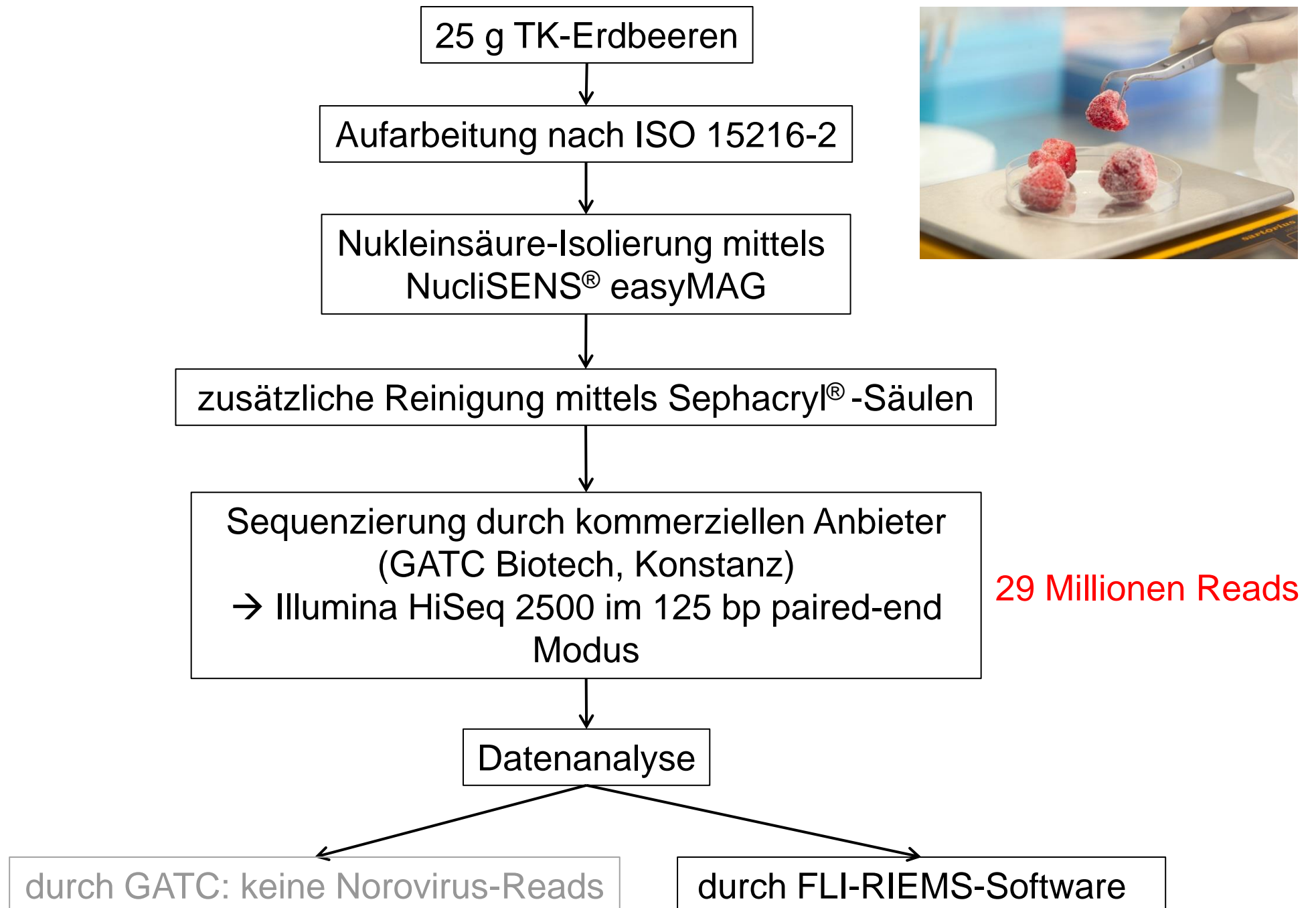
Beispiel: Norovirus-Ausbruch in Deutschland, 2012

Untersuchungen an den Tiefkühl-Beeren:

- Norovirus mittels real-time RT-PCR nachweisbar (in 7 von 11 Teilproben)
- Sequenzierung von zwei RT-PCR-Fragmenten: Norovirus GII.P16/GII.13
- Quantifizierung mittels real-time RT-PCR: 257 Norovirus-Genomkopien/25 g

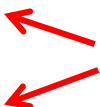


→ Analyse mittels NGS in 2017?

Analyse-Schema für NGS bei TK-Erdbeeren



Ergebnisse: NGS bei TK-Erdbeeren aus Ausbruch 2012

→ die jeweils 5 häufigsten Organismen der verschiedenen Reiche:





Organism	Family (genome type)	Species	counts	Sequence Identity (%)	
Eukaryote	Rosaceae	Sanguisorba sitchensis	15346144	89.8 - 100	 <p>Erdbeerpflanze</p>
	Hydrangeaceae	Jamesia americana	2486369	97.47	
	Rosaceae	Fragaria vesca	2355716	68.0 - 100	
	Saccharomycetaceae	Saccharomyces cerevisiae	892091	70.0 - 90.0	
	Rhizopodaceae	Rhizopus stolonifer	595163	84.91 - 100	
Bacteria	Erwiniaceae	Tatumella citrea	3119912	71.43 - 100	 <p>Pflanzen- pathogene Bakterien</p>
	Enterobacteriaceae	Salmonella enterica	221477	70.32 - 100	
	Enterobacteriaceae	Kosakonia oryzae	107219	74.16 - 90.39	
	Rhodanobacteraceae	Frateuria aurantia	17074	74.29 - 100	
	Rhodanobacteraceae	uncultured Frateuria sp	10321	97.79 - 100	
Viruses	Alphaflexiviridae (+ssRNA)	Strawberry mild yellow edge virus	1208	83.5 - 95.15	 <p>Pflanzen- pathogene Viren</p> <p>Bakterio- phagen</p>
	Caulimoviridae (dsDNA-RT)	Strawberry vein banding virus	292	97.83 - 100	
	Myoviridae (dsDNA)	Escherichia phage ESCO13	218	68.97 - 86.0	
	Podoviridae (dsDNA)	Pantoea virus Limelight	217	68.46 - 91.49	
	Myoviridae (dsDNA)	Enterobacteria phage ECGD1	183	68.0 - 97.14	

(Bartsch et al., 2018)

Ergebnisse: NGS bei TK-Erdbeeren aus Ausbruch 2012

→ die jeweils 5 häufigsten Organismen der verschiedenen Reiche:

Organism	Family (genome type)	Species	counts	Sequence Identity (%)
Eukaryote	Rosaceae	Sanguisorba sitchensis	15346144	89.8 - 100
	Hydrangeaceae	Jamesia americana	2486369	97.47
	Rosaceae	Fragaria vesca	2355716	68.0 - 100
	Saccharomycetaceae	Saccharomyces cerevisiae	892091	70.0 - 90.0
	Rhizopodaceae	Rhizopus stolonifer	595163	84.91 - 100
Bacteria	Erwiniaceae	Tatumella citrea	3119912	71.43 - 100
	Enterobacteriaceae	Salmonella enterica	221477	70.32 - 100
	Enterobacteriaceae	Kosakonia oryzae	107219	74.16 - 90.39
	Rhodanobacteraceae	Frateuria aurantia	17074	74.29 - 100
	Rhodanobacteraceae	uncultured Frateuria sp	10321	97.79 - 100
Viruses	Alphaflexiviridae (+ssRNA)	Strawberry mild yellow edge virus	1208	83.5 - 95.15
	Caulimoviridae (dsDNA-RT)	Strawberry vein banding virus	292	97.83 - 100
	Myoviridae (dsDNA)	Escherichia phage ESCO13	218	68.97 - 86.0
	Podoviridae (dsDNA)	Pantoea virus Limelight	217	68.46 - 91.49
	Myoviridae (dsDNA)	Enterobacteria phage ECGD1	183	68.0 - 97.14


Erdbeerpflanze

Pflanzen-pathogene Bakterien
Salmonella (!?)

Pflanzen-pathogene Viren

Bakteriophagen

→ nur sehr wenige Sequenzen von Säuger-Viren!

(Bartsch et al., 2018)

Ergebnisse: NGS bei TK-Erdbeeren aus Ausbruch 2012

→ Sequenzen von Säuger-Viren

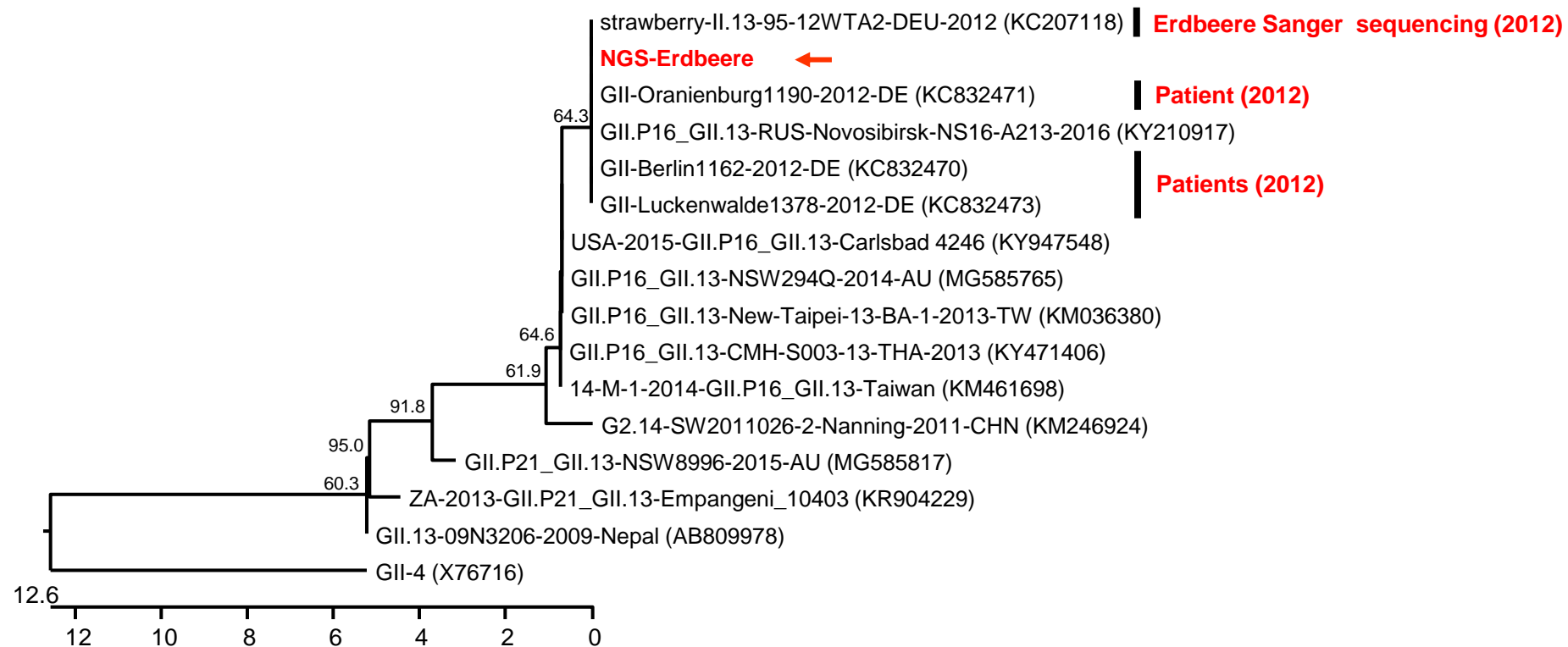
Family (genome type)	Species	Counts	Sequence identity (%)
Adenoviridae (dsDNA)	Bat mastadenovirus G	1	94.12
Astroviridae (+ssRNA)	Mamastrovirus 3	1	98.1
Caliciviridae (+ssRNA)	Norwalk virus	2	100
Flaviviridae (+ssRNA)	Dengue virus	1	83.08
Hepadnaviridae (dsDNA-RT)	Hepatitis B virus	1	89.13
Herpesviridae (dsDNA)	Elephantid betaherpesvirus 1	1	80.6
Papillomaviridae (dsDNA)	Alphapapillomavirus 9	1	87.5
Poxviridae (dsDNA)	Sea otter poxvirus	1	85.71
Retroviridae (+ssRNA-RT)	Human immunodeficiency virus 1	1	86.28
	Porcine type C oncovirus	1	98.25

← Astrovirus
← Norovirus

(Bartsch et al., 2018)

Ergebnisse: NGS bei TK-Erdbeeren aus Ausbruch 2012

→ Verwandtschaftsanalyse einer erhaltenen **Norovirus**-Sequenz



(Bartsch et al., 2018)

Zusammenfassung

- NGS kann zur **Gesamtgenom-Sequenzierung** von Viren oder zur **Metagenomanalyse** bei Lebensmitteln eingesetzt werden
- Prinzipiell ist durch die Metagenomanalyse die **Identifizierung von humanpathogenen Viren** in Lebensmitteln möglich, ohne zielgerichtet nach bestimmten Pathogenen zu suchen
- „offener Blick“ der Metagenomsequenzierung ermöglicht die **Identifikation unerwarteter Pathogene**
- Detektion von Viren durch Metagenomanalyse kann wegen geringer Mengen schwierig sein
- Anreicherung von Viruspartikeln (z.B. Ultrafiltration) oder Nukleinsäuren (z.B. DNase-Verdau) könnte Detektion verbessern
- Eine geeignete Sequenzdaten-Analyse kann entscheidend sein

Acknowledgements



BfR:

Christina Bartsch

LAV Sachsen-Anhalt:

Dietrich Mäde

FLI:

Dirk Höper



Project funding:
(no. 1332-647)



Bundesinstitut für Risikobewertung

DiedersdorferWeg 1 • D-12277 Berlin

Tel. 030 18412 - 1006 • Fax 030 18412 - 2064

Reimar.Johne@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de