

Next Generation Sequencing - Möglichkeiten und Grenzen beim Gesundheitsschutz von Mensch und Tier

Mitteilung Nr. 022/2020 des BfR vom 14. Mai 2020

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat eine Stellungnahme zum möglichen Nutzen des „Next Generation Sequencing (NGS)“ für eine Anwendung in lebensmittelbedingten Ausbruchsuntersuchungen und bei der Testung von Lebensmitteln auf mikrobielle Krankheitserreger veröffentlicht. In dem Dokument mit dem Titel „Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms“ geht es darüber hinaus um den Mehrwert der neuen molekularen Labormethoden für die Risikobewertung in der Lebensmittelüberwachung. Vor- und Nachteile der verschiedenen NGS-Methoden werden dazu im Hinblick auf die in der aktuellen Gesetzgebung der Europäischen Union verankerten mikrobiologischen Methoden analysiert.

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hat in Abstimmung mit dem Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) die Anwendung der NGS-Methoden in den Bereichen Lebensmittelsicherheit und Tiergesundheit basierend auf der EFSA-Stellungnahme bewertet. Thematisiert sind dabei auch Herausforderungen beim Datenaustausch und beim Vereinheitlichen der neuen Methoden in den unterschiedlichen Laboren. Zielgruppe sind alle Mitarbeitenden in Institutionen, Laboren und Behörden, die mit der Typisierung und Charakterisierung von Krankheitserregern in Lebensmitteln und Tieren befasst sind.

NGS steht für die zweite und dritte Generation der Sequenzierung von Erbmaterial und bietet die höchst mögliche Auflösung, um die Nukleotidabfolge eines DNA-Moleküls oder Genoms zu bestimmen.

Für leicht kultivierbare Erreger, die in reiner Form vorliegen, hat sich weltweit als eine NGS-Methode die Gesamtgenomsequenzierung (engl.: whole genome sequencing, WGS) etabliert. Dabei wird die Erbsubstanz des ursächlichen Keims von Erkrankten isoliert und mit Isolaten des gleichen Erregers aus Lebensmitteln oder Tieren verglichen. So lassen sich genetische Verwandtschaften im Erbmaterial erkennen und die Erkrankungsfälle den Krankheitsausbrüchen an verschiedenen Orten zuordnen. Bei einer anderen NGS-Methode, der Sequenzierung des gesamten Metagenoms (engl.: whole metagenome sequencing), wird die Erbsubstanz etwa aus einer Lebensmittel- oder Tierprobe direkt gewonnen, die oft verschiedene Keime enthält. Damit lassen sich auch schwer bis nicht kultivierbare Mikroorganismen wie Parasiten oder Viren nachweisen. Die Metagenomsequenzierung eignet sich als eine Methode zur ersten Diagnostik, wenn kein Verdacht auf einen konkreten Erreger vorliegt. Sie ermöglicht es zudem auch, neue und bisher unbekannte Erreger zu entdecken, wie im Jahr 2011 das Schmallenbergvirus.

Bewertung des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) in Abstimmung mit dem Friedrich-Loeffler-Institut (FLI) zu den in der Stellungnahme der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) getroffenen Feststellungen

Die EFSA führt seit einigen Jahren verschiedene Aktivitäten durch, um das Potential von Next Generation Sequencing- (NGS) beziehungsweise Whole Genome Sequencing- (WGS) Methoden für die Erregercharakterisierung und Typisierung, für Untersuchungen bei lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen und für zielgerichtete Risikobewertungen zu evaluieren. Über die von der EFSA genannte Erregercharakterisierung und Typisierung hinaus eignen sich NGS-Methoden insbesondere für die Erregeridentifikation (sog. Metagenomics). Große Gemeinsamkeiten bestehen hier zur Tiergesundheit und insbesondere bei der Bekämpfung und Vermeidung von Tierseuchen, auch wenn für die beiden Bereiche unterschiedliche Rechtssetzungen gelten. Der Fokus der EFSA liegt dabei mandatsbedingt auf der Lebensmittelsicherheit und den Lebensmittel-assoziierten Ausbrüchen, dennoch müssen die Potentiale der NGS- bzw. WGS-Methoden sektorenübergreifend betrachtet werden, aber auch sektorenspezifische Unterschiede müssen berücksichtigt werden.

Beispiele für Aktivitäten der EFSA sind die Erstellung wissenschaftlicher Stellungnahmen, die Ko-Finanzierung von Forschungsprojekten zu WGS und der erstellte Technische Report zur Erweiterung der molekularen Datenbank des Europäischen Zentrum für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten (ECDC) und EFSA bezüglich WGS-Daten (EFSA 2019a). Die jüngste Aktivität hierzu war die Erstellung einer wissenschaftlichen Stellungnahme als Selbstmandat des EFSA-Gremiums für Biologische Gefahren (BIOHAZ Panel) zur Anwendung von WGS und Metagenomics für die o. g. Bereiche, auf die Bezug genommen wird (EFSA BIOHAZ Panel 2019).

Folgende Themen (auch als Terms of References, ToRs, in der EFSA-Stellungnahme bezeichnet) wurden in dieser bearbeitet:

ToR1: Die Evaluierung von NGS für eine mögliche Anwendung in lebensmittelbedingten Ausbruchsuntersuchungen und der Gefahrenidentifizierung unter Berücksichtigung von Aktivitäten und Erfahrungen verschiedener Staaten sowie der Mehrwert für die Risikobewertung.

ToR2: Vor- und Nachteile sowie Grenzen von existierenden NGS-Methoden, die vergleichbare Ergebnisse mit den in der aktuellen EU-Gesetzgebung verankerten mikrobiologischen Methoden (z. B. *Salmonella*-Serotypie, Monitoring von Shigatoxin-bildenden *E. coli* (STEC) und Antibiotikaresistenztestung) ergeben würden, sind kritisch zu analysieren. Leistungsvergleichsstudien sind dabei zu berücksichtigen.

Ein Grund für die EFSA, diese wissenschaftliche Stellungnahme als Selbstmandat beauftragt zu haben, ist die Erwägung darüber, zukünftig Ergebnisse von NGS-Methoden in bestehende gesetzgebende Regulierungen einzubeziehen und/oder sogar auf weitere NGS-Methoden zu erweitern. An der Arbeitsgruppe, die die Stellungnahme erarbeitet hat, nahm auch ein Vertreter des BfR teil. Dadurch war es möglich, die Erfahrungen auf dem Gebiet des WGS, die das BfR durch die Typisierung von lebensmittelassoziierten Erregern mit dem WGS erlangt hat, mit einzubringen.

Die Schlussfolgerungen zum ToR 1 (Seite 50 der EFSA-Stellungnahme) fassen das Potential und die Einsatzbereiche von WGS und Metagenomics für die o. g. Themen wie folgt zusammen:

Das WGS ermöglicht demnach im Vergleich zu konventionellen Typisierungsmethoden ein wesentlich detaillierteres Ergebnis, d. h. eine höhere Auflösung der Phylogenie. Daraus ergeben sich neue Ansätze für die Durchführung von differenzierteren Typisierungen im Rahmen von Ausbruchsuntersuchungen, Source-Attribution-Studien und Gefahrenidentifizierungen als Teil der Risikobewertung bei lebensmittel- und tierseuchenrechtlichen Fragestellungen.

Weiterhin wurde festgestellt, dass WGS nützlich für vielseitige Anwendungen unter Benutzung spezifischer bioinformatischer Analysen sein kann. Genomsequenzen können in aktuellen Ausbruchsgeschehen verwendet werden, wobei das Auflösungsvermögen alle bisher verwendeten Methoden (z. B. Serotypie, MLST) überragt und eine hochauflösende molekulare Epidemiologie ermöglicht. Mit Krankheitserregern belastete Lebensmittel können so beispielsweise zu sporadischen humanen Fällen zugeordnet und so die epidemiologische Aufklärung von örtlich verschiedenen auftretenden Ausbrüchen vereinfacht werden. Das FLI ergänzt, dass das Gleiche bei Tierseuchenausbrüchen, wie z. B. bei Brucellose, Rindersalmonellose oder Geflügelpest, gilt. Es wird betont, dass das Setzen von Schwellenwerten, ob ein Isolat zu einem Ausbruch gezählt wird oder nicht, kein absolutes Kriterium sein darf. Weitere diagnostische bzw. epidemiologische Daten müssen für die Definition eines Ausbruchs hinzugezogen werden.

Für die Source-Attribution, d. h. die Quellenzuordnung bestimmter Erreger-Subtypen zu bestimmten Lebensmitteln oder Tierarten, soll durch die Entwicklung von verfeinerten Modellen, die Genomsequenzierungsdaten berücksichtigen, eine höhere Genauigkeit erreicht werden. Aber auch hier gilt, dass Datensätze mit epidemiologischen Daten verknüpft werden sollten. Metagenomics als kultur-unabhängiges NGS-Verfahren bietet ein weiteres großes Potential zur Erkennung von Ausbrüchen, für Source-Attribution-Studien und Risikobewertungen bei nicht-kultivierbaren oder langsam wachsenden Mikroorganismen oder zur Identifikation ganz neuer Erreger, wie zum Beispiel des Schmallenbergvirus im Jahr 2011. Ähnlich wie bei WGS ist der Nachweis genetischer Marker beispielsweise für Resistenz gegen Antibiotika oder von Virulenzmarkern möglich. Die Bedeutung und Anwendung von Metagenomics wird in Zukunft je nach Anwendungsbereich von der Weiterentwicklung und Harmonisierung sowie der möglichen Sensitivität der Methoden abhängen. Im Bereich des Nachweises neuer viraler Erreger nimmt Metagenomics in jedem Fall schon jetzt eine führende Rolle ein. Diese kann sie in Zukunft auch bei der Identifizierung von Genen gegen antimikrobielle Resistenzen (AMR) in Proben erlangen.

Zusammenfassend kann eingeschätzt werden, dass das WGS aufgrund der fortgeschrittenen Etablierung in den Laboren und technologischen Ausgereiftheit eine der bedeutendsten Methoden im Bereich der Mikrobiologie geworden ist. Es gilt daher, die Methode weiter zu fördern und Daten, die mit dem WGS gewonnen werden können, in die Modelle der Risikobewertungen einzubeziehen, um das Potential auszuschöpfen. Gleiches gilt für Metagenomics, die in den Laboren oftmals nicht zuletzt aufgrund der kostenintensiven Anwendungen noch nicht immer etabliert ist, aber für die nicht-kultivierbaren Mikroorganismen, einschließlich Viren, ein sehr großes Potential für differenziertere Risikobewertungen und Ausbruchsuntersuchungen bietet. Targeted (gezielte) Metagenomics, d. h. der Nachweis von im Voraus bestimmten genetischen Markern mittels Sequenzierung komplexer Proben, könnte eine

kostengünstigere Alternative als der ungezielte Nachweis darstellen. Targeted Metagenomics erlaubt aber eben nicht, bisher unbekannte genetische Marker nachzuweisen.

Die Schlussfolgerungen zum ToR 2 beinhalten folgende Feststellungen (Seite 50/51 der EFSA-Stellungnahme):

Das WGS ermöglicht, Informationen zu Serotypen für *Salmonella* und STEC und zur Anwesenheit von genetischen Resistenz-Determinanten zu erheben. Es können hohe Übereinstimmungen zwischen den klassisch mikrobiologischen und WGS-basierten Methoden erreicht werden. Darüber hinaus kann mittels WGS für die durch konventionelle Verfahren (Agglutination) nicht serotypisierbaren *Salmonella*- und STEC-Isolate der Serotyp vorhergesagt werden. Es wird empfohlen, WGS-basierte Serotypisierung in die EU-Regularien, in denen die Serotypisierung von *Salmonella* und *E. coli* gefordert ist (z. B. (EU) No. 200/2010, 517/2011, 200/2012 und 1190/2012 in Übereinstimmung mit (EC) No. 2160/2003), mit aufzunehmen, da sie ein wesentlich genaueres und differenzierteres Bild der Typen wiedergibt, als es mit den jetzt gängigen Methoden möglich ist. Da das White-Kauffmann-Le Minor (WKL) Schema (Grimont and Weill 2007) zur Bestimmung der Serotypen bei *Salmonella* auf Antigen-Antikörper-Reaktionen beruht, kann es zu inkorrekten bzw. nicht vollständigen Serotypie-Ergebnissen kommen. Genotypische Daten zu Serotypen sollten daher in das WKL-Schema integriert werden, um die Differenzen, die zurzeit in der Ungenauigkeit des WKL-Schemas liegen, zu beschreiben und dieses zukünftig dann ersetzen.

Differenzen zwischen dem Phänotyp und dem Genotyp bei der Bestimmung der Antibiotikaresistenz können aufgrund der variablen Expression von Resistenzgenen vorkommen (induzierte Resistenz). WGS liefert daher über die Expression hinaus Daten, ob Antibiotikaresistenzgene im Genom vorhanden sind und potentiell für die Übertragung auf andere Bakterien zur Verfügung stehen. Eine schrittweise Integration von WGS-Daten in die harmonisierten AMR-Monitoringprogramme wurde in einer früheren technischen Spezifikation der EFSA empfohlen (EFSA 2019b).

Mit dem Wechsel zu den NGS-basierten Methoden in den Referenzzentren wird es zu neuen Herausforderungen bezüglich des Datenaustausches und der Methodenstandardisierung kommen. Metagenomics wird als Methode mit sehr hohem Potential angesehen, hat aber auch noch Grenzen im Vergleich zu WGS-basierten Methoden (wie Sensitivität und Fehlen von Harmonisierungen). Für den Nachweis neuer viraler und bakterieller Erreger ist die Anwendung von Metagenomics nach Ansicht von BfR und FLI jedoch unerlässlich.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass WGS-Methoden den mikrobiologischen Verfahren gleichgestellt werden sollten. Dies bedeutet, Serotyp-Vorhersagen mittels WGS-Methoden für *Salmonella* und *E. coli* anzuerkennen, Virulenzgene mit der WGS für STEC zu identifizieren und Antibiotikaresistenzgene im Rahmen der antimicrobial resistance (AMR)-Monitoringprogramme systematisch zu erfassen. Um die Entwicklung, Validierung und Standardisierung solcher WGS-Methoden zwischen den Laboratorien weiter zu optimieren, sollten dazu Projekte einschließlich eines Kapazitätsaufbaus in den EU-Mitgliedsländern gefördert werden. BfR und FLI gehen davon aus, dass dies u. a. die Förderung von NGS-basierten Untersuchungen zur molekularen Epidemiologie von Erregern bei Wild-, Haus- und Nutztieren sowie Ausbruchsuntersuchungen in der Primärproduktion umfasst. Dies dient der Tiergesundheit, dem Tierwohl, der Agrarwirtschaft und dem gesundheitlichen Verbraucherschutz, da die Übertragung zoonotischer Erreger über Lebensmittel begrenzt wird.

Nach Einschätzung des FLI wird NGS im Tierbereich aber bisher nur sehr begrenzt eingesetzt. Mittel zum Kapazitätsaufbau sind in allen Bundesländern und für die Bundesinstitute dringend nötig, auch um international den methodischen Anschluss zu halten. Dies beinhaltet die Anschaffung von Hardware (z. B. Sequenziergeräte, Hochleistungsrechner, schnelle Internetverbindung), Software und die Einstellung von spezialisiertem Personal. In Abstimmung und direkter Zusammenarbeit zwischen BfR, FLI und Robert Koch-Institut (RKI) werden bioinformatische Methoden für NGS-basierte molekulare Epidemiologie und Ausbruch-untersuchungen entwickelt. Eine Validierung der Methodik nach ISO 17025:2018 wird angestrebt, um den Einsatz bei der Tiergesundheitsüberwachung zu gewährleisten.

Antworten des BfR und des FLI zu weiteren Fragenstellungen:

- 1. Artikel 34 der Verordnung (EU) 2017/625 sieht vor, dass die für Laboranalysen verwendeten Methoden den Anforderungen nach Anhang III der genannten Verordnung genügen müssen. Welche der genannten Merkmale des Anhang III Verordnung (EU) 2017/625 werden durch (welche) Whole Genome Sequencing (WGS)-Methoden erfüllt?**

WGS-Methoden erzeugen möglichst vollständig abgedeckte DNA-Sequenzen eines Genoms (z. B. Genom eines Bakterienisolats), die anschließend für die Typisierung bzw. für die Identifizierung bestimmter Eigenschaften des Isolates bzw. Genoms genutzt werden. Die Merkmale, die eine Sequenz erfüllen muss, um der Qualität für eine nachfolgende Analyse zu genügen (Akzeptanzparameter), sind in der ISO/CD 23418(E) niedergelegt (Table A2). Dieses Dokument entspricht noch keinem ISO-Standard und befindet sich derzeit in der Kommentierung. Daher sind Änderungen möglich. Die den Akzeptanzparametern genügenden DNA-Sequenzen können schließlich für die Typisierung bzw. Identifizierung von Genomeigenschaften herangezogen werden. Dabei gilt, dass die alternative Typisierungsmethode (hier die WGS-basierte Typisierung/Identifizierung) validiert sein muss. Welche Anforderungen an die Validierung einer alternativen Typisierungsmethode bestehen, ist in dem Entwurf ISO/FDIS 16140-6 "Microbiology of the food chain - Method validation - Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures" niedergelegt. Hier wird die Referenzmethode mit der alternativen Methode verglichen (Bestimmung der Inklusivität und Exklusivität in Studienversuchen und Methodenringversuchen) und im Ergebnis ein Standard definiert.

Für die Bestimmung z. B. des Serotyps eines Salmonellen-Isolates auf Grundlage von WGS-Daten werden folgende Merkmale aus dem Anhang III der Verordnung (EU) 2017/625 erfüllt: Selektivität, Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit. Da es sich im Allgemeinen bei Typisierungsmethoden nicht um qualitative oder quantitative Nachweismethoden handelt, treffen die im Anhang III der Verordnung (EU) 2017/625 aufgelisteten Merkmale für alternative Typisierungsmethoden zumeist nicht zu. Im Übrigen gelten die im Rahmen der Akkreditierung nach DIN EN ISO/IEC 17025 von der Deutschen Akkreditierungsstelle (DAkkS) geforderten Validierungsvorschriften für Prüfverfahren (Dokument 71 SD 4 019 vom 14.01.2015).

Metageomische Ansätze zur Erregerdetektion, insbesondere viraler Erreger, erfüllen neben der Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit das in Anhang III Absatz 3 der Verordnung genannte Merkmal („Analysemethoden, die sich einheitlich auf verschiedene Produktgruppen anwenden lassen, sollten gegenüber Methoden bevorzugt werden, die nur bei einzelnen

Produkten anwendbar sind“). Am FLI wurde bereits gezeigt, dass die für den Erregernachweis etablierten Methoden sich auf diverse Probenmatrices unterschiedlichster Herkunft anwenden lassen. Welche weiteren Anforderungen des genannten Anhangs erfüllt werden, muss, wie auch die Sensitivität, weiter erforscht werden.

2. Die Verordnungen (EG) Nr. 2160/2003 und (EG) Nr. 2073/2005 gehen von der Anwendung bestimmter Methoden aus. Welche zusätzlichen und weitergehenden Ergebnisse für die Überprüfung der in den genannten Verordnungen beschriebenen Kriterien (für die VO (EG) Nr. 2160/2003 sind dies Informationen, die über die Kriterien für die Bestimmung der *Salmonella*-Serotypen hinausgehen und zusätzliche Informationen z. B. über die Pathogenität liefern) können durch die Anwendung von Whole Genome Sequencing (WGS)-Methoden erhalten werden, die gegebenenfalls für die Risikobewertung von Bedeutung sind?

Durch die Anwendung von WGS-Methoden kann auf Grundlage der Bestimmung der Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Pathogenitätsgenen eine Risikobewertung bestimmter Erregertypen erfolgen. Ein typisches Beispiel ist die Identifizierung von *stx*-Gentypen bei STEC. Die Bestimmung solcher STEC-Varianten wird bereits mit Hilfe von PCR-Verfahren durchgeführt, kann aber durch WGS-Methoden abgelöst werden. Darüber hinaus können die abrufbaren Charakteristika (d. h. Repertoire von Pathogenitätsgenen eines Isolats) deutlich erweitert werden, so dass sich für die Risikobewertung wesentlich differenziertere und detailreichere Datensätze als bisher herstellen lassen. Im Allgemeinen gilt dies für alle in der Lebensmittelüberwachung relevanten Bakterien-Spezies und weitere Mikroorganismen (z. B. für die Tiergesundheit relevante Erreger). Neben der Bestimmung von Pathogenitätsgenen in einem Genom eines Stammes können für eine Risikobewertung z. B. folgende Gene von Interesse sein: 1.) Bestimmung von Genen, die zu einer Biofilmbildung beitragen, 2.) Resistenzgene, die für die Unempfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen und Desinfektionsmitteln verantwortlich sind, 3.) Determinanten, die für die Mobilität von Genen eine Rolle spielen (Plasmide, Transposons, IS Elemente, Phagen) und 4.) Gene, die für bestimmte metabolische Eigenschaften eines Keims verantwortlich sind und z. B. ein Überleben unter Stressbedingungen fördern.

3. Sind Whole Genome Sequencing (WGS)-Methoden schon jetzt geeignet, die Unterschiede der für die öffentliche Gesundheit relevanten pathogenen Mikroorganismen, wie z. B. für Salmonellen, *Campylobacter* spp. und Listerien zu differenzieren und damit z. B. bisher gebräuchliche Charakteristika von Mikroorganismen, wie z. B. Serotyp, Phagentyp etc. zu ersetzen (s. Schlussbemerkungen des Kapitels 3.4.3 der o. g. EFSA-Stellungnahme)?

Die Vorhersage der Charakteristika von Mikroorganismen auf Grundlage von Genomsequenzen, wie z. B. des Serotyps und der Antibiotikaresistenz, ist in bereits darauf spezialisierten Laboren grundsätzlich möglich. Jedoch ist die Genauigkeit einer solchen Vorhersage von dem Umfang und vom Inhalt der Sequenz- und Wissensdatenbanken (z. B. bekannte genetische Marker für Antibiotikaresistenz) abhängig, die für eine solche Abfrage verwendet werden müssen. Der Umfang dieser Datenbanken schwankt erregerspezifisch sehr. Weiterhin hängt sie von der Verfügbarkeit bioinformatischer Programme und zur Verfügung stehender IT-Hardware ab, um die Charakteristika bestimmen zu können. Die Pflege von Sequenzdatenbanken sowie die Entwicklung und Validierung von bioinformatischen Programmen, die relevante Charakteristika bestimmen können, wird in Zukunft darüber entscheiden,

wie zuverlässig die erhaltenen Ergebnisse aus einer Genomanalyse sind. Für die derzeit laut EU-Regularien zu bestimmenden Charakteristika (Serotypen für Salmonellen bzw. *E. coli*, Antibiotikaresistenz) sind die WGS-Methoden bereits gut etabliert und können die klassische mikrobiologische Bestimmung ersetzen.

Durch die Etablierung automatisierter Auswertesoftware können alle zusätzlichen genetisch fixierten Charakteristika eines Isolates erfasst werden. Dies beinhaltet beispielsweise MLST-Typen aller Gene oder Einzelnukleotidänderungen im gesamten Genom. Diese Charakteristika ergänzen klassische Charakteristika (z. B. Serotyp) und erlauben eine höhere Auflösung. Durch die Vielzahl der zusätzlich gewonnenen Informationen des WGS können regelmäßig neu definierte Charakteristika hinzugefügt werden.

Die Vorhersage des Phagentyps, z. B. von Salmonellen, durch WGS-Daten wird derzeit nicht weiterverfolgt, da inzwischen wesentlich differenziertere sequenzbasierte Ansätze zur Bestimmung von phylogenetischen Eigenschaften zur Verfügung stehen (z. B. MLST, rMLST, cgMLST, SNP-Analysen). Internationalen Abstimmungsbedarf gibt es jedoch noch in der Nomenklatur von Typbezeichnungen bei solchen neuen Verfahren, um sie laborübergreifend vergleichen zu können.

4. In der Stellungnahme 047/2019 des BfR vom 28. November 2019 zu „Erbmaterial von Erregern vergleichen, um Krankheitsausbrüche aufzuklären“ wird die Qualitätssicherung im Labor betont und auf die Aktivitäten einer § 64 LFGB-Arbeitsgruppe hingewiesen. Welche qualitätssichernden Laborstandards sind erforderlich, um sowohl die Ergebnisse, die mit einer Methode von verschiedenen Anwendern gewonnen werden, als auch die Übereinstimmung zwischen verschiedenen Laboren (in verschiedenen Institutionen) zu überprüfen?

Qualitätssichernde Laborstandards einer Methode bzw. eines Prüfverfahrens sind grundsätzlich von der DAkkS beschrieben worden (Dokument 71 SD 4 019 vom 14. Januar 2015) und innerhalb der ISO-Normen (DIN EN ISO/IEC 17025, DIN EN ISO 15189) geregelt. Dies gilt sowohl für den Lebensmittelbereich als auch für den Bereich Tiergesundheit. Die dort beschriebenen Anforderungen müssen Labore erfüllen, um für das Prüfverfahren akkreditiert zu werden. Unterschieden werden müssen grundsätzlich Normverfahren, die normativ im Anwendungsbereich des Verfahrens eingesetzt werden und nicht normierte Prüfverfahren (z. B. Hausverfahren). In jedem Fall gilt, dass das Prüfverfahren validiert sein muss. Der Umfang der zu ermittelnden Verfahrenskenngrößen hängt davon ab, ob es sich um ein qualitatives oder quantitatives Verfahren handelt. Zur Verifizierung eines bereits validierten Verfahrens (z. B. Normverfahren), welches in verschiedenen Laboren etabliert ist, sollte eine Leistungseignungsprüfung des Labors regelmäßig durch eine geeignete Stelle (z. B. Nationales Referenzlabor (NRL)) erfolgen.

In der § 64 LFGB-Arbeitsgruppe „NGS-Bakteriencharakterisierung“ werden normativ Prüfverfahren entwickelt (Szabo et al. 2019). Hier werden Validierungen durchgeführt, die zeigen, dass das Verfahren in der Lage ist, zuverlässig richtige Ergebnisse zu erzielen und diese zwischen den Laboratorien vergleichbar sind. Die Validierung umfasst eine Vergleichsstudie in einem Labor, welche die Selektivität (Inklusivität und Exklusivität) ermittelt und eine Laborvergleichsstudie, die mit mindestens acht Laboren durchgeführt wird. Bei Vorliegen einer Referenzmethode erfolgt die Einbeziehung dieser in die Vergleichsstudie. Die Laborvergleichsstudien sind in der WGS sehr umfangreich, da für jeden Zielorganismus die zu ermit-

telnden Charakteristika vergleichend untersucht werden müssen. Dies betrifft sowohl die qualitätssichernden Parameter der zu erzeugenden Rohsequenzen als auch die folgenden bioinformatischen Analyseschritte bis zum Ergebnis. Zurzeit ist in der § 64 LFGB-Arbeitsgruppe „NGS-Bakteriencharakterisierung“ eine Studie in Bearbeitung, welche prüft, ob die Verfahren für die Erkennung von Clustern bei *Listeria (L.) monocytogenes* im Rahmen der Untersuchung von Krankheitsausbrüchen geeignet sind. Da es bisher kein Referenzverfahren gibt, werden die Merkmale zur Vergleichspräzision (zufällige Abweichungen von Labor zu Labor) und Messunsicherheiten analysiert. Aufgrund der notwendig durchzuführenden Laborvergleichsstudien für die vier lebensmittelassoziierten Erreger *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Campylobacter* und STEC wird die Erstellung von Normverfahren sukzessive erfolgen und noch mehrere Jahre benötigen.

Im Bereich der Tiergesundheit (§ 27 TierGesG) werden entsprechende diagnostische Verfahren ebenfalls entwickelt und validiert. Es wurde begonnen, Pilotstudien zu Laborvergleichsverfahren mit ausgewählten Bundesländern und internationalen Partnern durchzuführen.

Für qualitätssichernde Maßnahmen ist weiterhin notwendig, sogenannte Referenzgenomesätze herzustellen und zu etablieren. Auch Referenzstämme müssen definiert und zur Verfügung gestellt werden. Diese Referenzstämme benötigen die Labore, um 1.) intern ihre WGS-Verfahren regelmäßig zu verifizieren und 2.) Anpassungen im WGS-Verfahren zu validieren.

Die Validierung von WGS-Verfahren betrifft nicht nur laborbezogene Arbeiten, sondern ist auch im Besonderen für die bioinformatische Auswertung der WGS-Daten von Bedeutung. Aufgrund der vielen verschiedenen Algorithmen, die es für die Auswertung von WGS-Daten gibt, sind auch für diesen Teil Vergleichsuntersuchungen notwendig, um sich auf robuste Standards festzulegen. Die § 64 LFGB-Arbeitsgruppe „NGS-Bakteriencharakterisierung“ und das FLI berücksichtigen diesen Teil der Validierung mit.

Sowohl in der Lebensmittelüberwachung als auch in der Tiergesundheit wird man jedoch ohne das Hinzuziehen individueller epidemiologischer Daten zu den Isolaten keine Festlegungen treffen können, wann ein Isolat zu einem Ausbruchsgeschehen zählt.

BfR und FLI nehmen regelmäßig u. a. an Ringversuchen des United Nations Secretary General's Mechanism (UNSGM) teil. Diese werden vom RKI organisiert und beinhalten Versuche mit NGS-Verfahren für hochpathogene bakterielle und virale Erreger (BSL3).

Weitere Informationen auf der BfR-Website zum Thema Next Generation Sequencing

Stellungnahme 047/2019 des BfR vom 28. November 2019

<https://www.bfr.bund.de/cm/343/erbmaterial-von-erregern-vergleichen-um-krankheitsausbrueche-aufzuklaeren.pdf>

Anwendung des Whole Genome Sequencing zur Aufklärung von lebensmittelbedingten Krankheitsausbrüchen (2020). BfR Wissenschaft. Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin
<https://www.bfr.bund.de/cm/350/anwendung-des-whole-genome-sequencing-zur-aufklaerung-von-lebensmittelbedingten-krankheitsausbruechen.pdf>

Forschungsprojekt *Errichtung der Next-Generation-Sequenzierung für die Genomanalyse von bakteriellen Erregern in Europa* (ENGAGE)

https://www.bfr.bund.de/de/errichtung_der_next_generation_sequenzierung_fuer_die_genomanalyse_von_bakteriellen_erregern_in_europa_engage_-202736.html

Externe Links zu Next Generation Sequencing

Weltweite Initiative *Global Microbial Identifier* zum Aufbau einer DNA Genom Datenbank zur Identifizierung und Diagnostik mikrobieller Krankheitserreger, an dem auch das BfR mitarbeitet:

[:https://www.globalmicrobialidentifier.org/](https://www.globalmicrobialidentifier.org/)



„Stellungnahmen-App“ des BfR

5. Referenzen

Commission Regulation (EU) No 200/2010 of 10 March 2010 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council as regards a Union target for the reduction of the prevalence of *Salmonella* serotypes in adult breeding flocks of *Gallus gallus* (Text with EEA relevance). OJ L 61, 11.3.2010, p. 1–9.

Commission Regulation (EU) No 517/2011 of 25 May 2011 implementing Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council as regards a Union target for the reduction of the prevalence of certain *Salmonella* serotypes in laying hens of *Gallus gallus* and amending Regulation (EC) No 2160/2003 and Commission Regulation (EU) No 200/2010 (Text with EEA relevance). OJ L 138, 26.5.2011, p. 45–51.

Commission Regulation (EU) No 200/2012 of 8 March 2012 concerning a Union target for the reduction of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella* Typhimurium in flocks of broilers, as provided for in Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council (Text with EEA relevance). OJ L 71, 9.3.2012, p. 31–36.

Commission Regulation (EU) No 1190/2012 of 12 December 2012 concerning a Union target for the reduction of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium in flocks of turkeys, as provided for in Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council (Text with EEA relevance). OJ L 340, 13.12.2012, p. 29–34.

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. OJ L 338, 22.12.2005, p. 1–26.

DAkkS (Deutsche Akkreditierungsstelle) (2015). Validierung und Verifizierung von Prüfverfahren nach den Anforderungen der DIN EN ISO/IEC 17025 für

Prüflaboratorien auf dem Gebiet der chemischen und chemisch-physikalischen Analytik im Bereich der Abteilung 4 Gesundheitlicher Verbraucherschutz

|Agrarsektor|Chemie|Umwelt). 71 SD 4 019, Revision: 1 vom 14. Januar 2015.

https://www.dakks.de/sites/default/files/71_sd_4_019_validierung_20150114_v1.1_0.pdf

DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03. Allgemeine Anforderungen an die Kompetenz von Prüf- und Kalibrierlaboratorien (ISO/IEC 17025:2017). <https://www.beuth.de/de/norm/din-en-iso-iec-17025/278030106>.

DIN EN ISO 15189:2014-11. Medizinische Laboratorien - Anforderungen an die Qualität und Kompetenz (ISO 15189:2012, korrigierte Fassung 2014-08-15); Deutsche Fassung EN ISO 15189:2012. <https://www.beuth.de/de/norm/din-en-iso-15189/223900218>.

EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bolton D, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Jenkins C, Malorny B, Ribeiro Duarte AS, Torpdahl M, da Silva Felício MT, Guerra B, Rossi M and Herman L (2019) Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms EFSA Journal 17:79 doi: [10.2903/j.efsa.2019.5898](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898)

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority), Van Walle I, Guerra B, Borges V, Carriço JA, Cochrane G, Dallman T, Franz E, Karpíšková R, Litrup E, Mistou M-Y, Morabito S, Mossong J, Alm E, Barrucci F, Bianchi C, Costa G, Kotila S, Mangone I, Palm D, Pasinato L, Revez J, Struelens M, Thomas-López D and Rizzi V (2019a) EFSA and ECDC technical report on the collection and analysis of whole genome sequencing data from food-borne pathogens and other relevant microorganisms isolated from human, animal, food, feed, and food/feed environmental samples in the joint ECDC-EFSA molecular typing database EFSA supporting publication 2019:EN-1337. 92 pp doi: [10.2903/sp.efsa.2019.EN-1337](https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1337)

EFSA (European Food Safety Authority), Aerts M, Battisti A, Hendriksen R, Kempf I, Teale C, Tenhagen B-A, Veldman K, Wasyl D, Guerra B, Liebana E, Thomas-López D and Beloeil P-A (2019b) Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. EFSA Journal 2019;17, e05709. doi: [10.2903/j.efsa.2019.5709](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5709)

EN ISO 16140-6: 2019. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures. International Organization for Standardization, Geneva.

Grimont PAD, Weill F-X. 2007. Antigenic formulae of the Salmonella serovars 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur Paris, France. https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf.

ISO/CD 23418(E). 2019. Microbiology of the Food Chain — Whole genome sequencing for typing and genomic characterization of foodborne bacteria — General requirements and guidance, International Standardisation Organisation, Geneva, Swiss.

Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. OJ L 325, 12.12.2003, p. 1–15.

Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. OJ L 165, 30.4.2004, p. 1–141.

Szabo K, Malorny B, Stoyke M (2019) Etablierung der § 64 LFGB Arbeitsgruppen „NGS – Bakteriencharakterisierung“ und „NGS – Speziesidentifizierung“ J Consum Prot Food Saf 15, 85-89. doi: 10.1007/s00003-019-01255-z

Verordnung (EU) 2017/625 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 15. März 2017 über amtliche Kontrollen und andere amtliche Tätigkeiten zur Gewährleistung der Anwendung des Lebens- und Futtermittelrechts und der Vorschriften über Tiergesundheit und Tierschutz, Pflanzengesundheit und Pflanzenschutzmittel, zur Änderung der Verordnungen (EG) Nr. 999/2001, (EG) Nr. 396/2005, (EG) Nr. 1069/2009, (EG) Nr. 1107/2009, (EU) Nr. 1151/2012, (EU) Nr. 652/2014, (EU) 2016/429 und (EU) 2016/2031 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Verordnungen (EG) Nr. 1/2005 und (EG) Nr. 1099/2009 des Rates sowie der Richtlinien 98/58/EG, 1999/74/EG, 2007/43/EG, 2008/119/EG und 2008/120/EG des Rates und zur Aufhebung der Verordnungen (EG) Nr. 854/2004 und (EG) Nr. 882/2004 des Europäischen Parlaments und des Rates, der Richtlinien 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EEG, 96/23/EG, 96/93/EG und 97/78/EG des Rates und des Beschlusses 92/438/EWG des Rates (Verordnung über amtliche Kontrollen)Text von Bedeutung für den EWR. OJ L 95, 7.4.2017, p. 1–142.

Über das BfR

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ist eine wissenschaftlich unabhängige Einrichtung im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL). Es berät die Bundesregierung und die Bundesländer zu Fragen der Lebensmittel-, Chemikalien- und Produktsicherheit. Das BfR betreibt eigene Forschung zu Themen, die in engem Zusammenhang mit seinen Bewertungsaufgaben stehen.