



# DNA-Sequenzierung: Methode/Nutzen für Forschung und Praxis



**Lena Fritsch**

16.02.2024

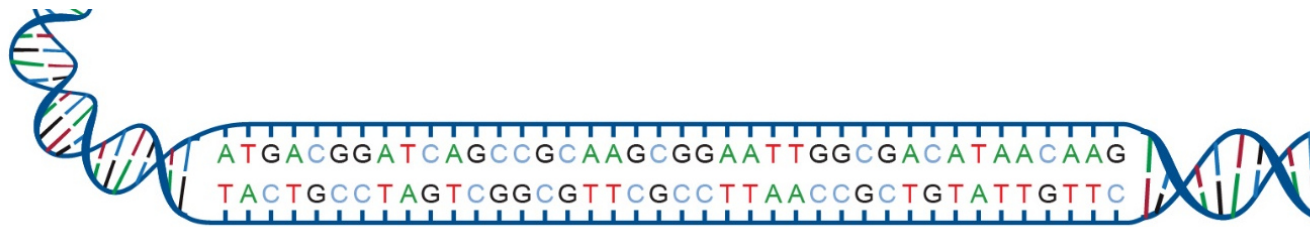


# Traktanden

- Sequenzierung
  
- Verwendung in der Praxis
  - Nachverfolgung
  - Kontaminationsquelle
  - Persistenz
  
- Forschungsthemen
  - GWAS
  - Virulenz
  - Source attribution
  
- Fazit



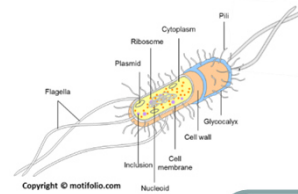
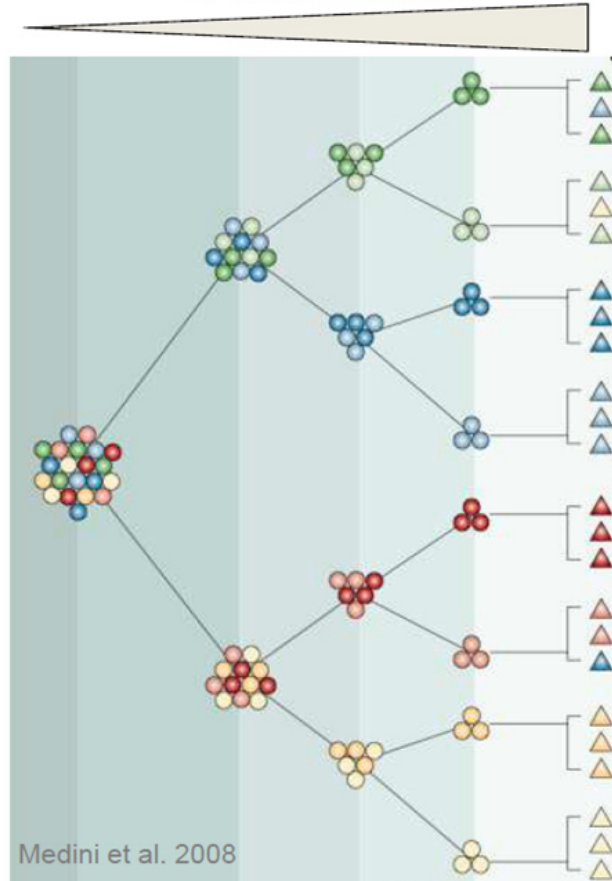
- DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül



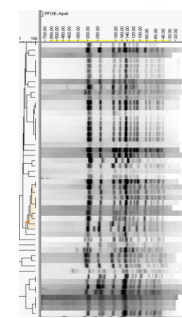
- hohe Unterscheidungskraft von WGS im Vergleich zu herkömmlichen molekularen Typisierungsinstrumenten

# 🇨🇭 Typisierungsmethoden hier am Bsp.: *L.monocytogenes*

## 1 -Discrimination

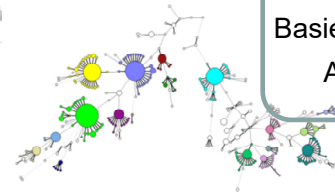


Molekulare und konventionelle Serotypisierung



PFGE : Basierend auf zwei Restriktionsenzymen

MLST :  
Basierend auf 7 Housekeeping Genen  
Aufteilung in Clonal Komplexe

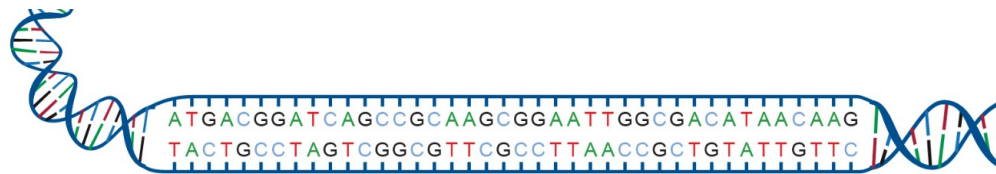


cgMLST : Basierend auf mehr als 1700 loci

SNP calling  
Analyse des gesamten Kern-Genomes



- DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül

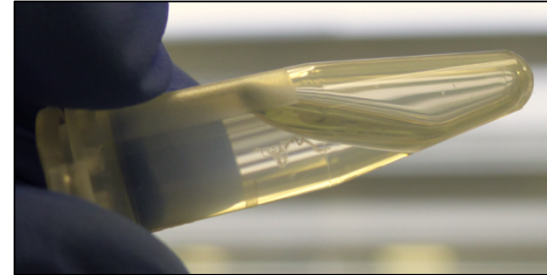


- hohe Unterscheidungskraft von WGS im Vergleich zu herkömmlichen molekularen Typisierungsinstrumenten
- WGS wird zunehmend als vorausschauendes Überwachungsinstrument für lebensmittelbedingte Krankheiten akzeptiert



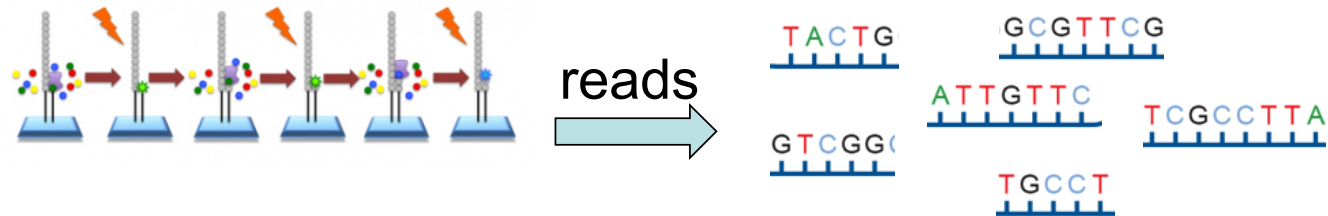
# Wet lab

- Extraktion der DNA



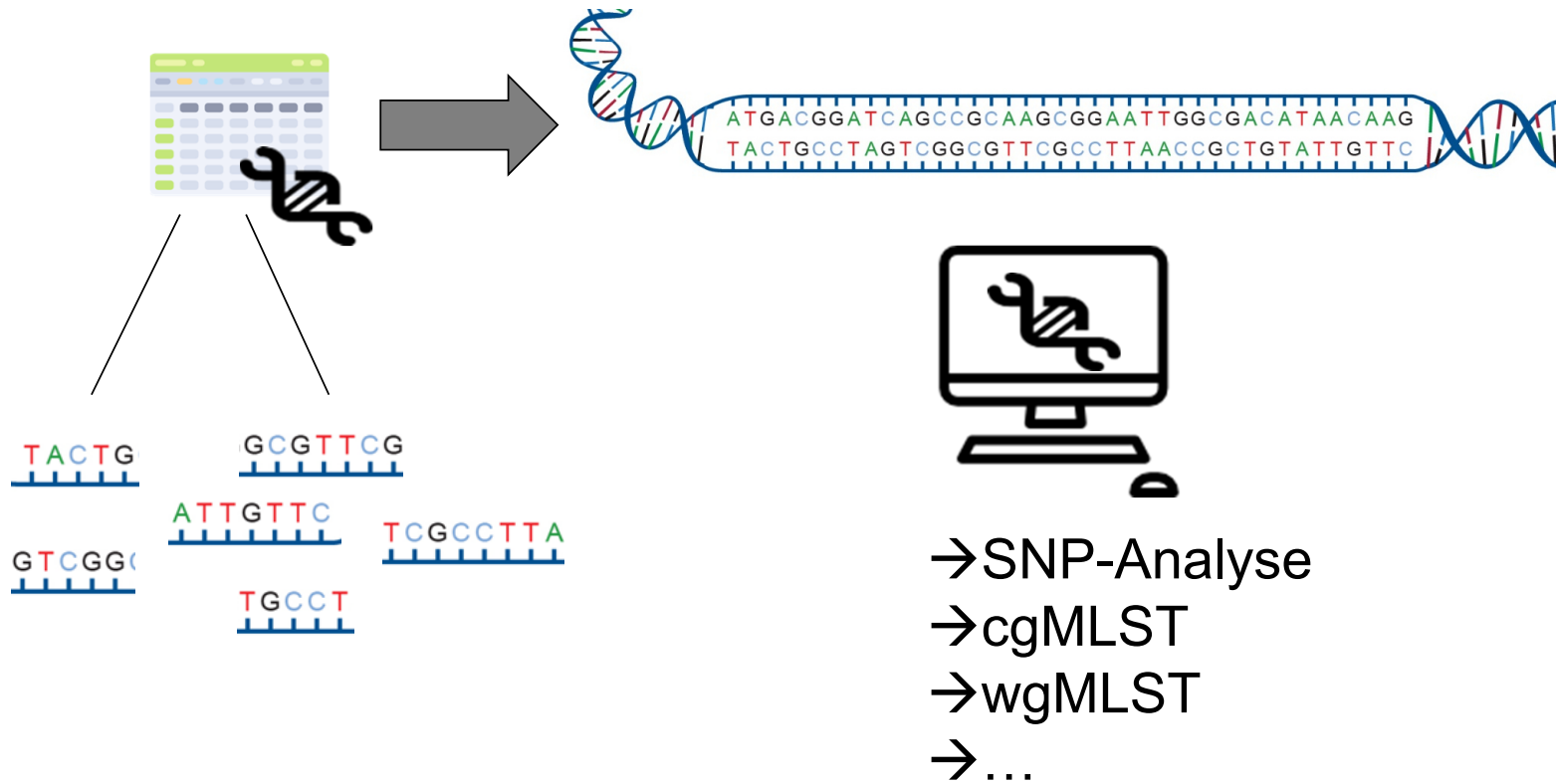
- Quantitätskontrolle

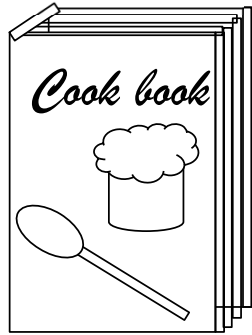
- Sequenzierung (z.B. Illumina)





# Dry lab





# Rezepte

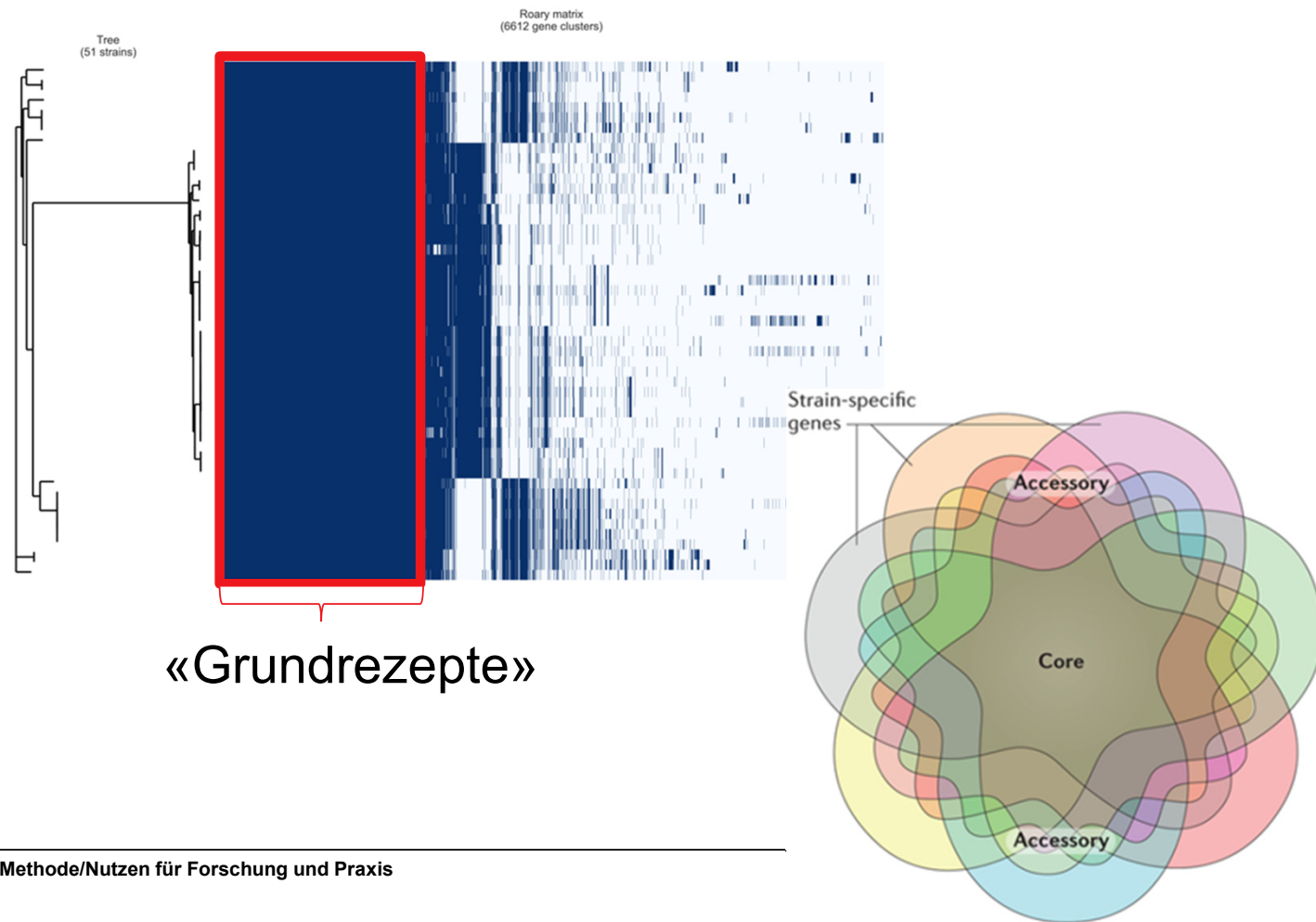
```
TGCAGCCTCCAGCTCTCCTGGTCTAATGTGAAAGTGGCCAGGTGAGGGCTTTGCTTC
CTGGAGACATTTGCCCCAGCTGTGAGCAGGGACAGGTCTGGCCACCGGGCCCTGGTTA
AGACTCTAAIGACCCCTGGTCTGAGGAAAGGCTGCTGACCCAAAGGATCTTCCCA
CAGACCCAGCACCCAGGAAATGGTCCGAAATTTCAGCCTCAGCCCCAGCCATCTGCCG
ACCCCCACCCACGGCCCTAATGGCCAGGCGGAGGGTTGAGAGGTAGGGAGATGG
GCTCTGAGACTTAAAGCCACCGGGCCACAGCCCTCAGCCCTCAGGACAGCTGC
ATCAGAAAGGCCATCAAGCAGGCTGTTCAGAGGCCCTTGGCTCAGGTGGCTCAGGA
TTCCAGGTTGGCTGGACCCAGGCCAGCTCTCAGCAGGGAGGAGCTGGCTGGGCTCG
TGAAGCATGGGGTTGAGCCACAGGCCCAAGCCAGGCCACTGGCCCTCAGCCCTGCC
```



```
TGCAGCCTCCAGCTCTCCTGGTCTAATGTGAAAGTGGCCAGGTGAGGGCTTTGCTTC
CTGGAGACATTTGCCCCAGCTGTGAGCAGGGACAGGTCTGGCCACCGGGCCCTGGTTA
AGACTCTAAIGACCCCTGGTCTGAGGAAAGGCTGCTGACCCAAAGGATCTTCCCA
CAGACCCAGCACCCAGGAAATGGTCCGAAATTTCAGCCTCAGCCCCAGCCATCTGCCG
ACCCCCACCCACGGCCCTAATGGCCAGGCGGAGGGTTGAGAGGTAGGGAGATGG
GCTCTGAGACTTAAAGCCACCGGGCCACAGCCCTCAGCCCTCAGGACAGCTGC
ATCAGAAAGGCCATCAAGCAGGCTGTTCAGAGGCCCTTGGCTCAGGTGGCTCAGGA
TTCCAGGTTGGCTGGACCCAGGCCAGCTCTCAGCAGGGAGGAGCTGGCTGGGCTCG
TGAAGCATGGGGTTGAGCCACAGGCCCAAGCCAGGCCACTGGCCCTCAGCCCTGCC
TGCAGCCTGGCTGTCCAGATCACTGTCTTGCCTGACAGGCCCTTGGATGGCCCTCC
TGCCTGTGGGCTGCTGGCCCTCTGGGACTTGAACAGCCAGCCAGCTTTTGGAAAC
AACACCTGTGGGCTCACACCTGGGAGGCTCTTACCTAGTGTCCGGGAACAGGCT
TCTTACACACCCAGACCCCGGGAGGACAGGAGCTGCAAGGTGAGCCACTGCC
ATTGCTGCCCTGGCCGCCACCCCTGCTCCTGGGCTCCACCCAGCATGGG
CAGAAAGGCCAGGAGCTGCCACCCAGCGGGCTCAGTGCACCTTTTAAAGAAAG
TTCTGTGGTCACTCTAAAGTACCCAGCTCCCTGTGGCCAGTCAGAAATCTCAGCT
```

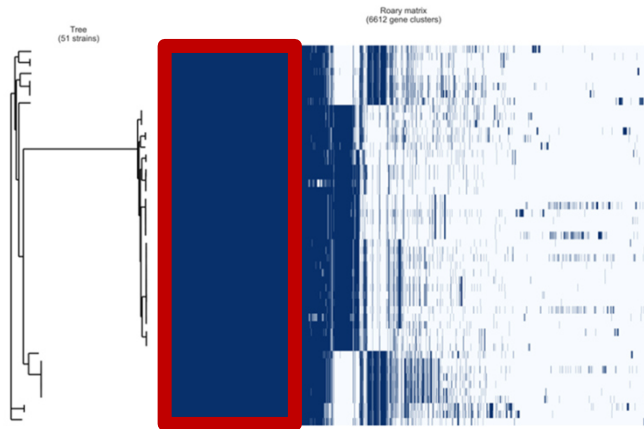
```
TGCAGCCTCCAGCTCTCCTGGTCTAATGTGAAAGTGGCCAGGTGAGGGCTTTGCTTC
CTGGAGACATTTGCCCCAGCTGTGAGCAGGGACAGGTCTGGCCACCGGGCCCTGGTTA
AGACTCTAAIGACCCCTGGTCTGAGGAAAGGCTGCTGACCCAAAGGATCTTCCCA
CAGACCCAGCACCCAGGAAATGGTCCGAAATTTCAGCCTCAGCCCCAGCCATCTGCCG
ACCCCCACCCACGGCCCTAATGGCCAGGCGGAGGGTTGAGAGGTAGGGAGATGG
GCTCTGAGACTTAAAGCCACCGGGCCACAGCCCTCAGCCCTCAGGACAGCTGC
ATCAGAAAGGCCATCAAGCAGGCTGTTCAGAGGCCCTTGGCTCAGGTGGCTCAGGA
TTCCAGGTTGGCTGGACCCAGGCCAGCTCTCAGCAGGGAGGAGCTGGCTGGGCTCG
```







	A	A	A	T	G	C	A	C	T	A	G	C	A	G	T	A	T	A	A	C	C	C	T	C	G	C
	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>
	A	A	A	T	G	C	A	C	A	A	G	C	A	G	T	A	T	A	A	C	C	C	T	C	G	C
	A	A	A	T	G	C	A	C	T	A	G	C	A	G	T	A	T	A	A	C	C	C	T	C	G	C
	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>C</b>
	A	A	A	T	G	C	A	C	T	A	G	C	A	G	T	A	T	A	A	C	C	C	T	C	G	C





T  
T  
**A**  
T  
T  
T



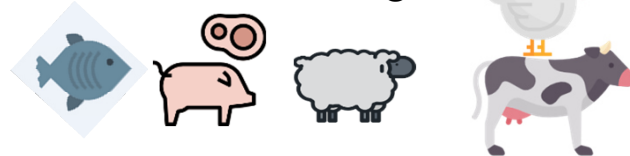
Variant/SNP

# Wie kann genetische Information (zukünftig) genutzt werden ?

- Outbreak Ermittlungen 
- Identifikation von genetischen Markern

- Riskoeinschätzung 

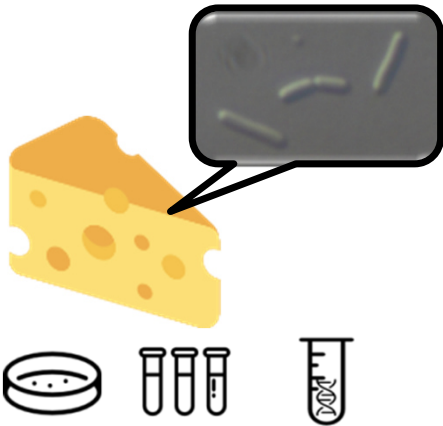
- Source Attribution/Quellenzuordnung



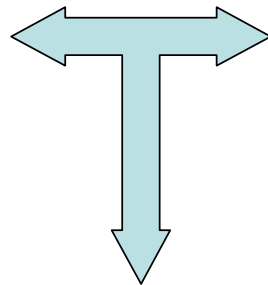
- .....



Resistenzen (zB Desinfektionsmittel)  
Persistenz  
Hitze/Kälte Empfindlichkeit



Datenbank
Stamm Käse 1
Stamm Käse 2
...



TACTGCCTAGTCGGCGTTTCGCCTTAACCGCTGTATTGTTCT

**Outbreak schneller stoppen  
→weniger Schaden**

	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position 5	Position 6	Position 7	Position 8	Position 9	Position 10	Position 11	Position 12
Stamm Mensch	T	A	C	A	T	C	C	T	G	G	T	A
Stamm Käse 1	T	A	C	A	T	C	C	T	G	G	T	A
Stamm Käse 2	A	A	G	T	T	C	C	A	G	C	T	T

DNA-Sequenzierung: Methode/Nutzen für Forschung und Praxis

Lena Fritsch



# Core genome MLST

× <https://www.cgmlst.org/ncs/schema/690488/>

/ Listeria monocytogenes cgMLST

## Listeria monocytogenes cgMLST

Name	L. monocytogenes cgMLST
Version	2.1
Seed Genome	EGD-e (NC_003210.1, 17-DEC-2014)
Genus	Listeria
Species	monocytogenes
Locus Count	1,701
Complex Type Distance	10
Strain Count	28,989
Complex Type Count	18,035
Last Change	Mar 3, 2023 3:14 PM

- globale und öffentliche Nomenklatur → Vergleichbar
- Leichter anwendbar (Software)
- cgMLST-Schemata bestehen aus einem festen Satz von konservierten Genen

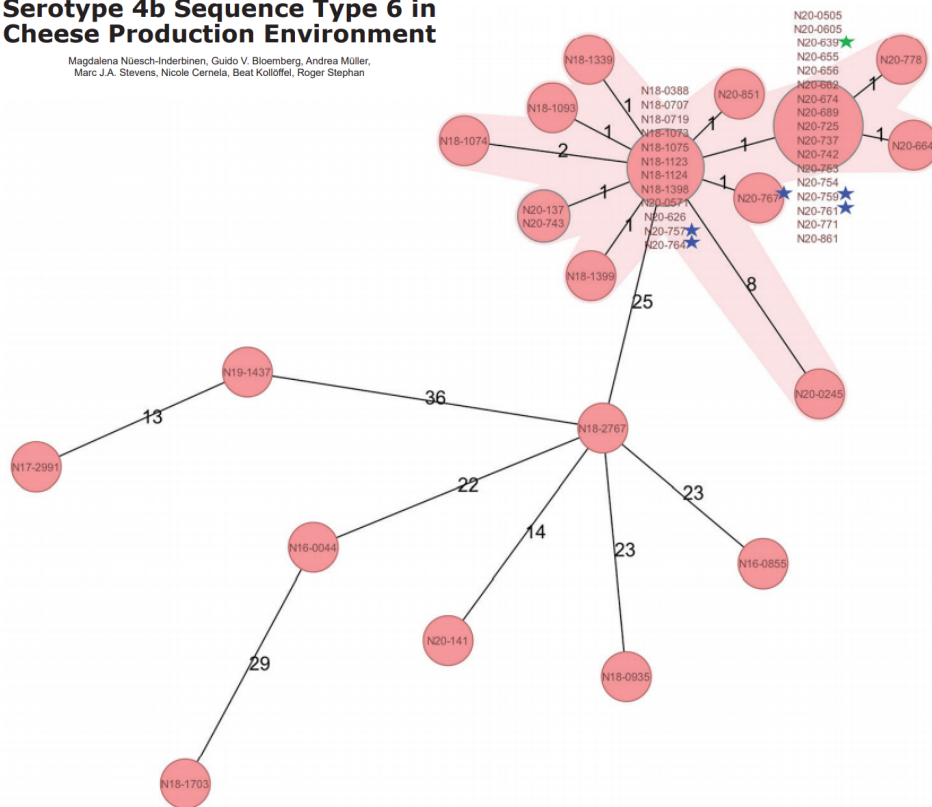


# Fallbeispiel

## DISPATCHES

### Listeriosis Caused by Persistence of *Listeria monocytogenes* Serotype 4b Sequence Type 6 in Cheese Production Environment

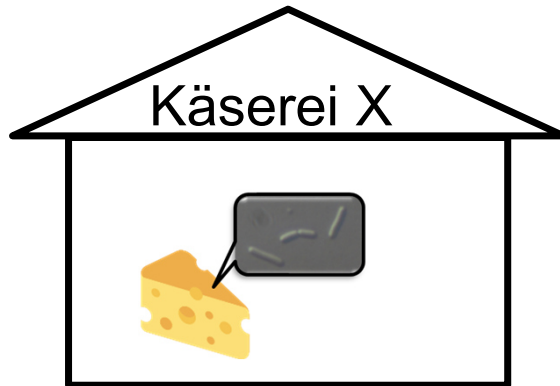
Magdalena Nüesch-Inderbinen, Guido V. Bloemberg, Andrea Müller, Marc J.A. Stevens, Nicole Cernela, Beat Kollöffel, Roger Stephan



**Figure 2.** Minimum-spanning tree based on cgMLST allelic profiles of 34 human *Listeria monocytogenes* isolates, 1 food isolate, and 5 environmental isolates, Switzerland. Each circle represents an allelic profile based on sequence analysis of 1,701 cgMLST target genes. Values on connecting lines indicate number of allelic differences between 2 strains. Each circle contains the strain identification(s). The food isolate is indicated by a green star, and environmental strains are indicated by blue stars. Outbreak strains are shaded in pink and are shown in comparison with other *L. monocytogenes* sequence type 6 isolates from Switzerland collected during 2016–2020. cgMLST, core genome multilocus sequence typing.



# Woher kommt die Kontamination?



- Neu gebaut → State of the Art
- Von Beginn an immer wieder positive Proben
- Alles gereinigt → wieder positiv
- Sequenzierung der Isolate
- Neubeprobung (auch Wasser)  
→ Vergleich der DNA → Match

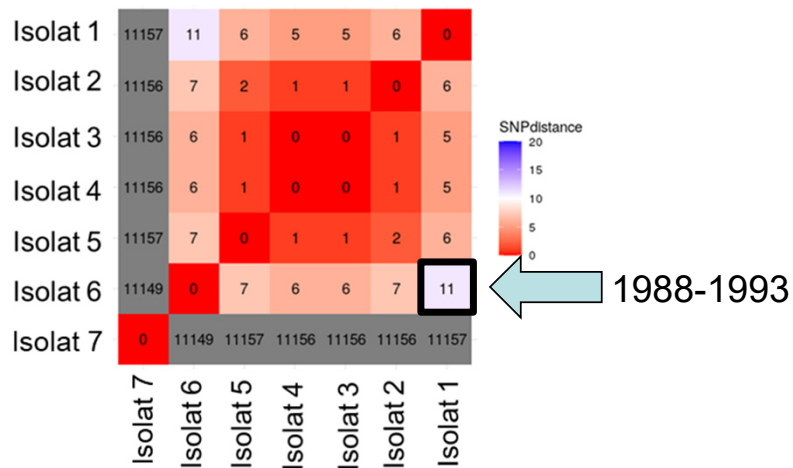
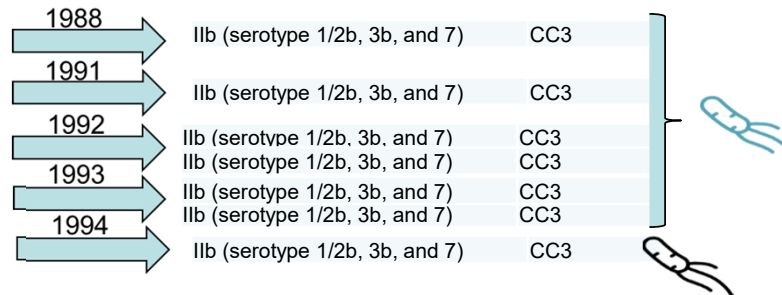
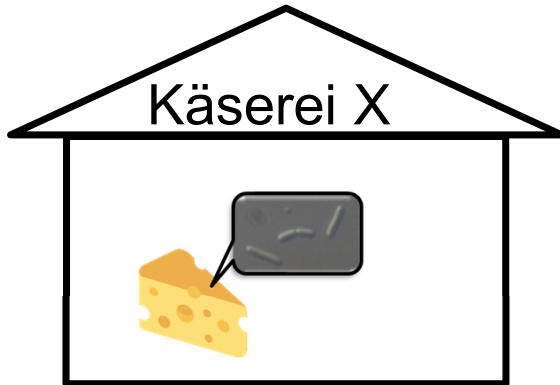


# Persistenz

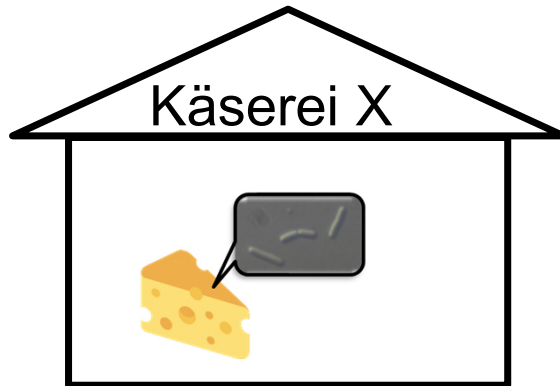




# Persistenz von Stämmen



Woher kommt die Kontamination?  
 Sind mehrere verschiedene Lm präsent?  
 Persistenzen?



**1988 - 1994**

➔ 7 Isolate

Woher kommt die Kontamination?

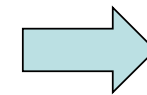
Sind mehrere verschiedene Lm präsent?

Persistenzen?

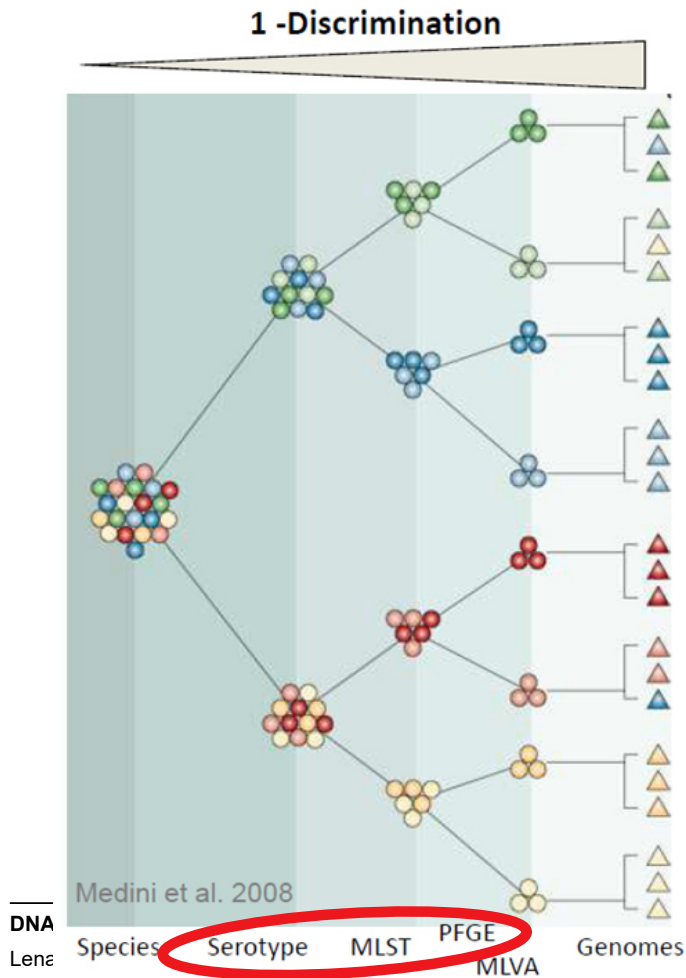


# Analyse der Isolate

## 1988 - 1994



7 Isolate



IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

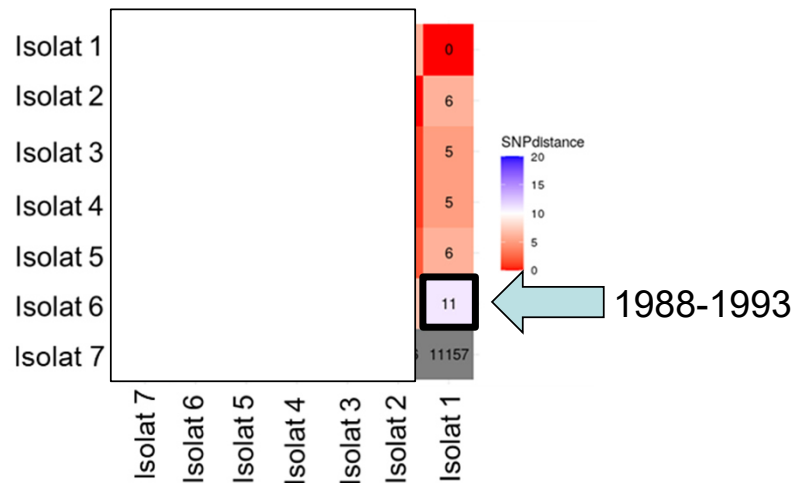
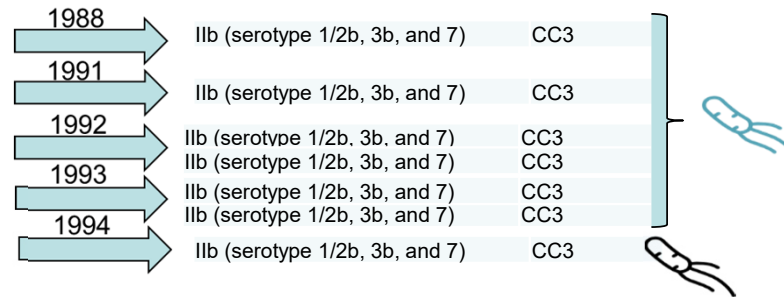
IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

IIb (serotype 1/2b, 3b, and 7) CC3

## Schlussfolgerung?



# Analyse der Stämme mit WGS



Metadaten und epidemiologischer Kontext wichtig

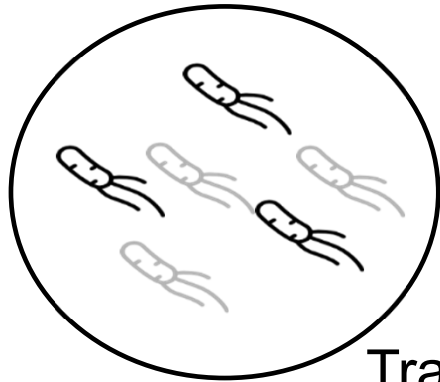


## Wann ist WGS sinnvoll und wann nicht

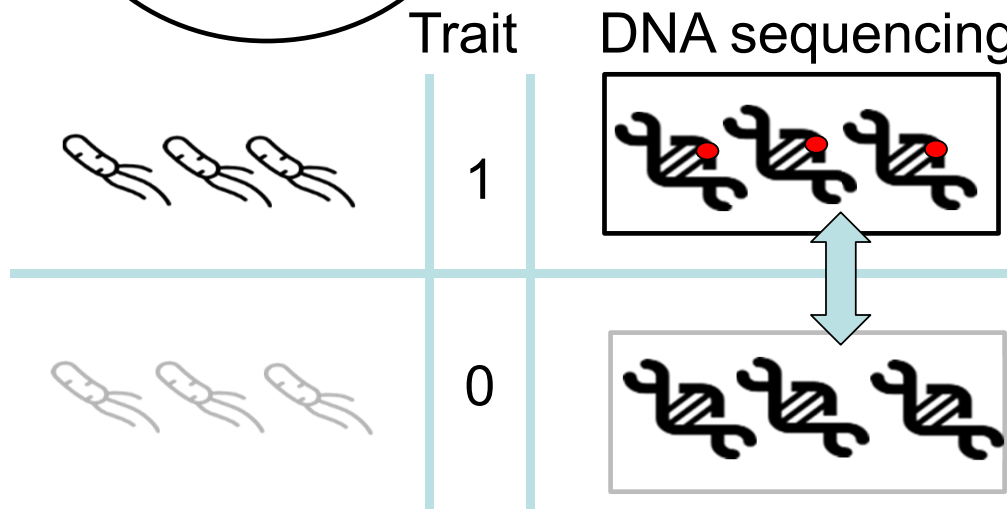
- Welchen Mehrwert an Informationen kann uns WGS geben?
- Haben wir Vergleichsstämme?
- Abstand der Proben?
- Herkunft?
- Problematik?



# Association studies



zB: Warum ist ein Stamm persistenter ?



Biomarker « X »

- Genes
- SNPs
- ....

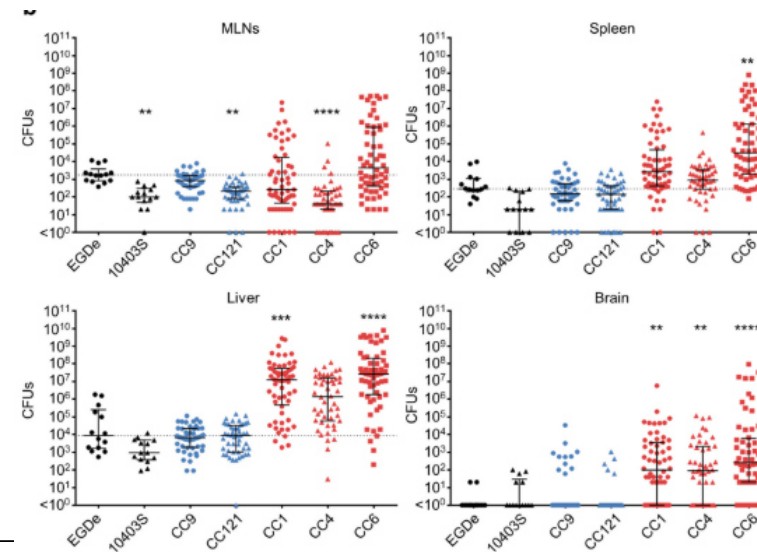
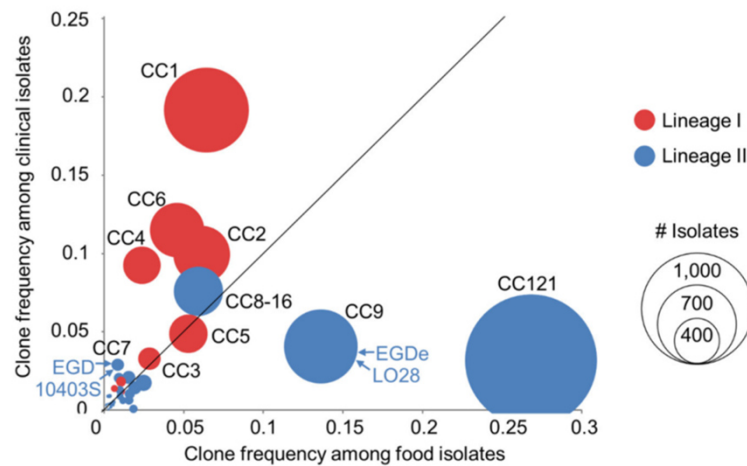


# CCs und Virulenz

Maury et al. 2016



- Daten von 6633 Stämmen
- 2584 klinische- und 4049 Lebensmittel-Isolate
- CC1, CC2, CC4 und CC6 stark assoziiert mit klinischem Ursprung
- CC121 und CC9 stark assoziiert mit Lebensmitteln



DNA-Sequenzierung: Methode/Nutzen für Forschung und Praxis

Lena Fritsch

Tierexperiment



# Source Attribution














# Source Attribution

- Based on cgMLST ~1100 genes

Origin	Strain	locus 1	locus 2	locus 3	locus 4	Membership coefficients to sources 1/2/3
 Source 1	Strain 1	28	31	32	7	1/0/0
	Strain 2	28	31	4	8	1/0/0
	Strain 3	28	12	32	7	1/0/0
	Strain 4	28	12	4	7	1/0/0
 Source 2	Strain 5	35	12	15	7	0/1/0
	Strain 6	35	42	15	7	0/1/0
	Strain 7	35	42	4	7	0/1/0
	Strain 8	35	42	15	8	0/1/0
 Source 3	Strain 9	7	15	22	7	0/0/1
	Strain 10	14	17	22	11	0/0/1
	Strain 11	7	17	22	7	0/0/1
	Strain 12	7	17	27	7	0/0/1
Strains to attribute	Strain 13	35	42	4	8	0,07/0,92/0,01 
	Strain 14	28	31	32	8	0,97/0,02/0,01 
	Strain 15	7	15	32	7	0,22/0,04/0,74 
	Strain 16	14	17	2	11	0,04/0,04/0,92 

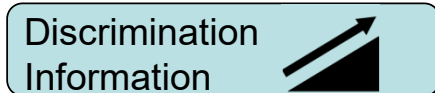
DNA-Sequenzierung: Methode/Nutzen für Forschung und Praxis

Lena Fritsch

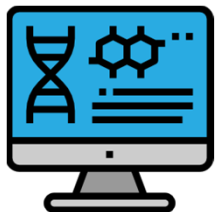
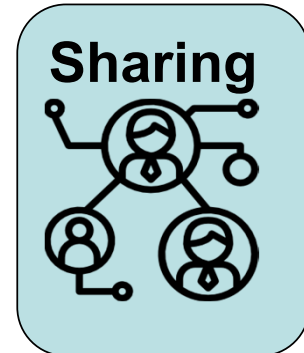


# Take-Home Messages

- Whole Genome Sequencing → « one in all » ?



- WGS ist arbeitsintensiv und teuer (noch keine Routineanalysen)
- WGS ist nicht immer sinnvoll → vergleichen



Bio-informatic  
competences is  
needed

Standardization

Portmann et al., 2018



Data-Storage



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

## Food Microbiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm)



### The use of next generation sequencing for improving food safety: Translation into practice



Balamurugan Jagadeesan<sup>a,\*</sup>, Peter Gerner-Smidt<sup>b</sup>, Marc W. Allard<sup>c</sup>, Sébastien Leuillet<sup>d</sup>,  
Anett Winkler<sup>e</sup>, Yinghua Xiao<sup>f</sup>, Samuel Chaffron<sup>g</sup>, Jos Van Der Vossen<sup>h</sup>, Silin Tang<sup>i</sup>,  
Mitsuru Katase<sup>j</sup>, Peter McClure<sup>k</sup>, Bon Kimura<sup>l</sup>, Lay Ching Chai<sup>m</sup>, John Chapman<sup>n</sup>, Kathie Grant<sup>o,\*\*</sup>

<sup>a</sup> Nestlé Research, Nestec Ltd, Route du Jorat 57, Vers-chez-les-Blanc, CH-1000, Lausanne 26, Switzerland

<sup>b</sup> Centers for Disease Control and Prevention, MS-CO-3, 1600 Clifton Road, 30329-4027, Atlanta, USA

<sup>c</sup> US Food and Drug Administration, 5001 Campus Drive, College Park, MD, 02740, USA

<sup>d</sup> Institut Mérieux, Mérieux NutriSciences, 3 route de la Chatterie, 44800, Saint Herblain, France

<sup>e</sup> Cargill Deutschland GmbH, Ceresstr. 2, 47809, Krefeld, Germany

<sup>f</sup> Arla Innovation Center, Agro Food Park 19, 8200, Aarhus, Denmark

<sup>g</sup> Laboratoire des Sciences du Numérique de Nantes (LS2N), CNRS UMR 6004 – Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322, Nantes, France

<sup>h</sup> The Netherlands Organisation for Applied Scientific Research, TNO, Utrechtseweg 48, 3704 HE, Zeist, NL, the Netherlands

<sup>i</sup> Mars Global Food Safety Center, Yanqi Economic Development Zone, 101407, Beijing, China

<sup>j</sup> Fuji Oil Co., Ltd., Sumiyoshi-cho 1, Izumisano Osaka, 598-8540, Japan

<sup>k</sup> Mondelez International, Linden 3, Bournville Lane, B30 2LU, Birmingham, United Kingdom

<sup>l</sup> Tokyo University of Marine Science & Technology, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo, 108-8477, Japan

<sup>m</sup> Institute of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Malaya, 50603, Kuala Lumpur, Malaysia

<sup>n</sup> Unilever Research & Development, Postbus, 114, 3130 AC, Vlaardingen, the Netherlands

<sup>o</sup> Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, National Infection Service, Public Health England, 61 Colindale Avenue, London, NW9 5EQ, United Kingdom



# Danke für Ihre Aufmerksamkeit

**Lena Fritsch**

lena.fritsch@agroscope.admin.ch

**Agroscope** gutes Essen, gesunde Umwelt

www.agroscope.admin.ch

