

Praxis-Informationen

NGS – Next Generation sequencing (Sequenzierung der nächsten Generation): Molekulare Diagnostik und Lebensmittelsicherheit in der Zukunft der Geflügelproduktion

Quelle: Poultry Science 2013, 92(2) 562-572

Das Ziel dieses Artikels (Autoren: S. DIAZ-SANCHEZ, I. HANNING, S. PENDLETON und D. D'SOUZA) ist es, einen Überblick über die Prinzipien der gängigen Sequenzier-Technologien zu geben, ihre potentiellen Anwendungen aufzuzeigen, sowie auf zukünftige mögliche Verbesserungen in der Geflügel Produktion hinzuweisen. Damit verbunden sind auch Sicherheitsaspekte für den Endverbraucher.

Die rasanten Fortschritte in dem hochkompetitiven Bereich der Sequenziertechnologien, die sich daraus ableitenden Anwendungen und die verbesserten Plattformen weisen auf die Bedeutung der Genomforschung im letzten Jahrzehnt hin (PAREEK *et al.*, 2011).

Seit SANGER und Koautoren 1975 das Ketten-Abbruch Konzept für die DNA-Sequenzierung vorgeschlagen hatten und MAXAM und GILBERT 1977 ein Konzept mit chemischem Abbau (first generation Sequenzierungen), hat sich sehr viel verändert. Sanger Sequenzierung ist bis heute zwar eine wichtige Routineanwendung bei automatischen Sequenzierungen geblieben, allerdings gibt es auch große Nachteile. Sie bietet nur einen geringen Durchsatz von Sequenzen bei hohen Kosten. Die Sequenzierung des ersten menschlichen Genoms, die 2001 beendet war, dauerte 10 Jahre und kostete 3 Millionen Dollar. Seit geraumer Zeit sind andere Methoden auf dem Vormarsch und es herrscht ein regelrechter Kampf auf diesem Markt. Zu den Sequenzierungen der nächsten Generation zählen z. B. die 2000 eingeführte 454 Pyrosequenzierung, die erste Hochdurchsatzmethode, die Illumina-Solexa-Technologie, ABI Solid Sequenzierung oder die Ion Torrent Technologie, um nur einige der wichtigsten Techniken zu nennen. Die Innovation bei der letzteren Technologie (vorgestellt 2010) besteht darin, dass eine Verknüpfung zwischen chemischer und digitaler Information mit Hilfe von Halbleitern hergestellt wird. Sie wird auch pH-basierte Sequenzierung genannt, die sich den pH-Wechsel zunutze macht, der durch die Freiwerdung eines Protons während des Nukleotideinbaus in den wachsenden DNA-Strang stattfindet. Dieser pH-Wechsel wird durch einen Sensor detektiert. Außerdem versuchen neue Technologien zunehmend auf Einzelmolekülbasis zu arbeiten und Amplifikation, wie durch PCR, zu vermeiden (Helioscop Einzelmolekülsequenzierer, Einzelmolekül real-time Sequenzer, Nanopore-DNA-Sequenzer).

Nach der Fertigstellung des menschlichen Genoms begann man sich auf Tiere wie Rind, Schwein, Pferd, Vögel bzw. Huhn zu konzentrieren. Diese Informationen aus den Gesamt-Genom-Sequenzen bieten eine reiche Quelle des Verständnisses z. B. für die evolutionäre Entwicklung bei Haustieren. Ein gutes Beispiel dafür sind Studien bei Rindern, die zur Verbesserung der Milch- und Fleischproduktion eingesetzt wurden, was erst durch die Identifizierung von regulatorischen Systemen ermöglicht wurde.

Der erste Entwurf eines Hähnchengenoms wurde 2004 publiziert und lieferte 7 Millionen SNPs (single nuclear polymorphisms – Einzelnukleotid – Polymorphismen), die als wichtige Informationen für kommerzielle Züchter dienen können. Sequenzierungen der gesamten Darmmikroflora können zunächst als Indikator für Darmgesundheit bzw. aber auch für die Gesundheit einer ganzen Geflügelherde herangezogen werden. Sie können als Screening-

Tool für Antibiotika-, und Resistenzmuster, Wachstum von Pathogenen oder auch für die Vitaminproduktion innerhalb einer mikrobiellen Gemeinschaft für den Wirt dienen. Die Autoren zitieren ein Beispiel der Anwendung von Metagenomics, das die Entdeckung eines kompletten neuen Bacteriophagen mit antimikrobiellen Eigenschaften (AVANT, 2012) beschreibt. Die Erkenntnisse und Anwendung all dieser Methoden kann die Gesundheit der Geflügelherde verbessern, indem die Kolonisierung des Magen-Darm-Traktes durch Pathogene vermieden wird und damit auch gleichzeitig die Produktsicherheit erhöht wird. Klassische Methoden der Bakterienkultivierung können in der Regel nicht herangezogen werden, da inzwischen anerkannt ist, dass nur ca. 1 %, wenn überhaupt, aller Bakterien kultivierbar sind (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998). Arbeiten von APAJALAHTI *et al.* (2004) zeigten, dass bei der Analyse mikrobieller Metagenome mit Hilfe von 16S rDNA Gen Sequenzen mehr als die Hälfte der 640 Bakterienarten nicht identifiziert werden konnten. Die Autoren zitierten ähnliche Resultate von BJERRUM *et al.* (2006), der herausfand, dass 85 % der 557 klonierten 16S rDNA Fragmente aus dem Ileum und Caecum von Hähnchen aus konventioneller und biologischer Aufzucht nicht einmal eng verwandt waren mit solchen Bakterienarten, die erst kürzlich mit kulturellen Methoden beschrieben worden waren.

Mikrobielle Interaktionen beeinflussen die intestinale Umgebung und nehmen auch Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems und seine Reaktionen auf pathogene und nicht-pathogene Bakterien. Als Beispiel wurden Arbeiten von FENG *et al.* (2010), über die Entwicklung von nekrotischer Enteritis bei Hähnchen zitiert. Es wurde beschrieben, dass die Inhibierung von *Lactobacillus aviarius* sich negativ auf den Krankheitsverlauf auswirkte bzw. umgekehrt fördernd auf die Ausbreitung und das Wachstum von *Clostridium perfringens*.

Einer der wichtigsten Ansätze bei der Nutzung von molekularen Analysewerkzeugen besteht darin, die mikrobielle Belastung/Ausstattung bei Hähnchen zu kontrollieren. Das betrifft vor allem Salmonella und Campylobacter, zwei mikrobielle Pathogene, die am häufigsten für meldepflichtige Lebensmittelinfektionen verantwortlich zu machen sind. Beide sind im Intestinaltrakt der Tiere zu finden. Man geht daher davon aus, dass die Reduktion der Belastung mit diesen beiden Mikroorganismen die Übertragung von Lebensmittelinfektionen drastisch reduzieren kann, da die Hantierung und der Verzehr mit kontaminierten Hähnchenfleisch als einer der Hauptursachen für Salmonellose und Campylobacteriose angesehen wird.

Sequenzbasierte Methoden und die Charakterisierung von (Meta-)Genomen werden noch immer als sehr neu in der Geflügel- und in der Lebensmittelproduktion angesehen. Es wird aber erwartet, dass diese Techniken einen erheblichen Beitrag zu neuem Wissen und zum Verständnis über das Verhalten von Pathogenen in mikrobiellen Gemeinschaften – wie sie üblicherweise vorkommen – und damit auch zur Reduktion beim Einsatz von Antibiotika liefern können.

LICK