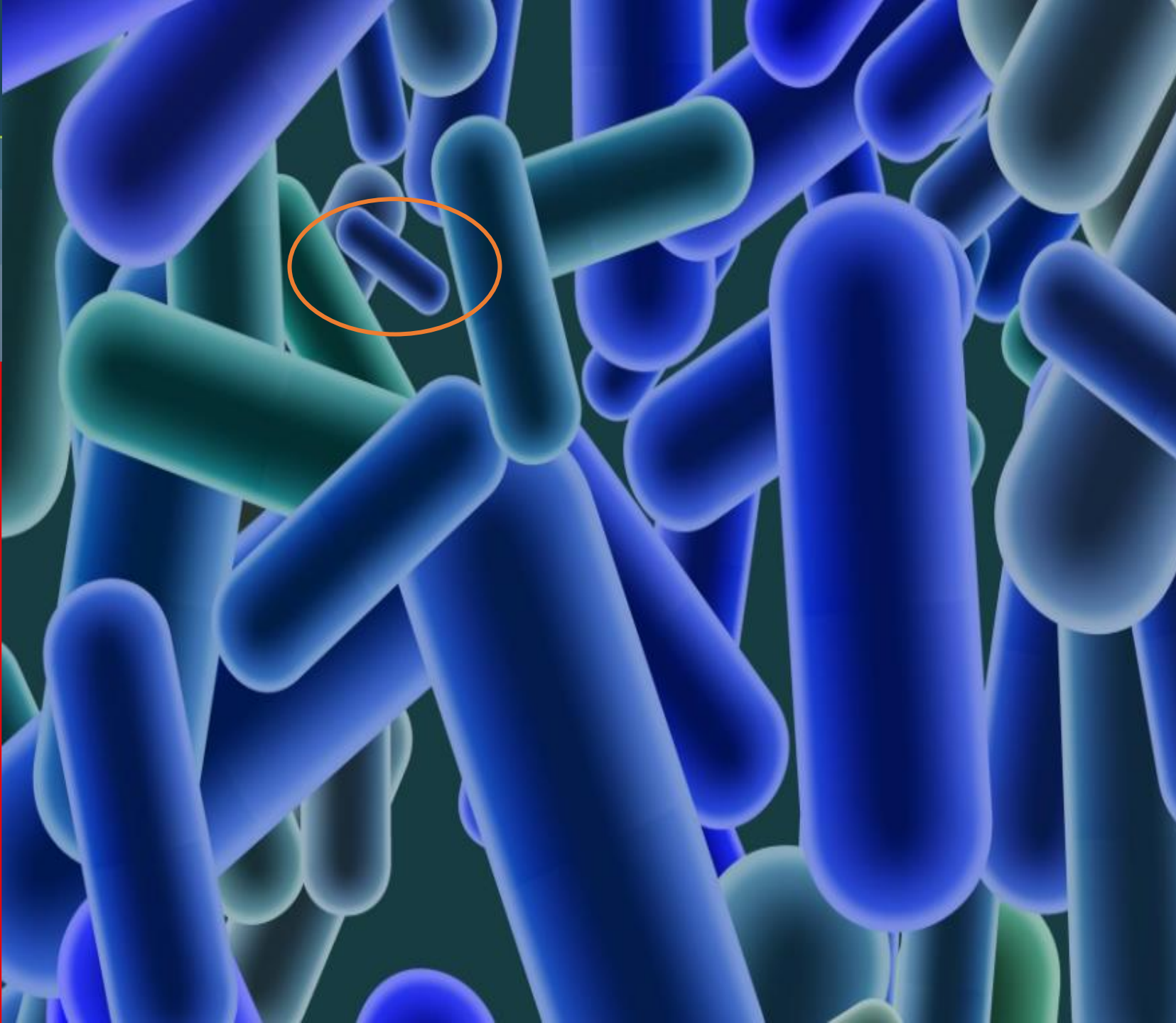


*Patogén
mikroorganizmusok
forrásának felderítése
NGS alapú módszerekkel*

Sréterné Lancz Zsuzsanna





ONE HEALTH elv



2003/99/EK irányelv a zoonózisok és zoonózis-kórokozók monitoringjáról

A humán megbetegedések forrásának felderítése elengedhetetlen a védekezés és a további megbetegedések megelőzése céljából

- A zoonózisok vagy zoonotikus kórokozók monitoringja bizonyos mikrobák esetében kötelező (*Salmonella, Listeria, Campylobacter, VTEC* stb)
- Az izolált mikroorganizmusok tárolásának kötelezettsége
- Az antimikrobiális szerekkel szembeni rezisztencia monitoringja is kötelező
- Az ételmiszer-eredetű megbetegedések járványügyi kivizsgálása kötelező
- A zoonózisokkal és zoonózis-kórokozókkal kapcsolatos információk cseréje (EFSA éves zoonózis jelentések, adatbázisok)

**Szekvenálási
módszerek
fejlődése**

1970-es
évek

Kromatográfiás módszerek, rendkívül lassú
és munkaigényes

1980-
napjaink

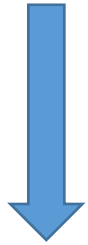
Sanger módszere
Kapilláris elektroforézis (700-800 bp)

2006-
napjaink

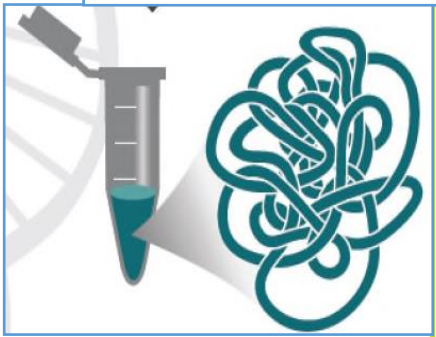
Új generációs szekvenálási technikák (NGS)
short read (36-400 bázis), long read módszerek (60
kB)
Akár a teljes genom szekvenálható



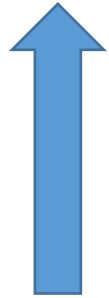
baktériumtenyésztés



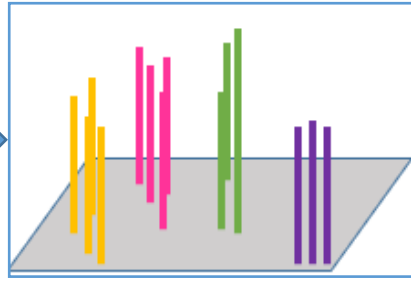
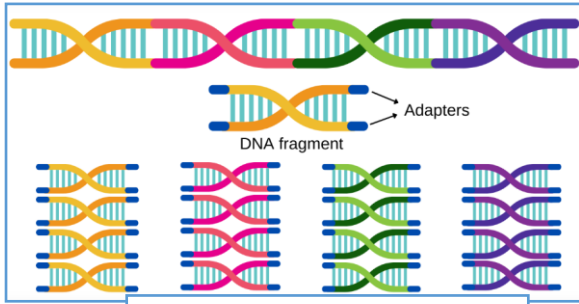
DNS kivonás és minőségellenőrzés



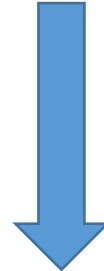
fragmentálás



könyvtárkészítés



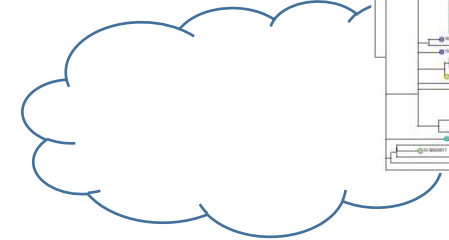
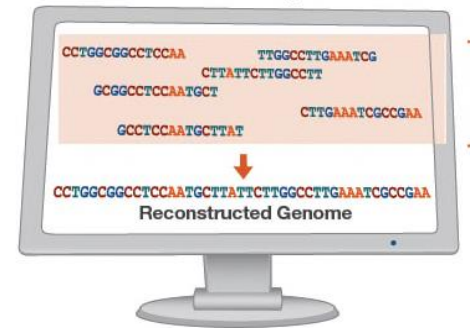
Immobilizáció, amplifikáció



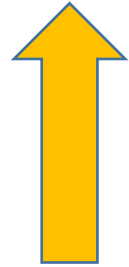
Génkönyvtár szekvenálása



Readok → genom összeállítás



Bioinformatikai elemzés



NGS alkalmazási lehetőségei az élelmiszer mikrobiológiában

WGS (Whole genom sequencing)

A teljes genetikai állományra kiterjedő szekvenálás során az elérhető DNS-szakaszok mindegyikét szekvenáljuk

- A legnagyobb mennyiségű információ nyerhető ki az eddigi módszerek közül
- Törzsek összehasonlítása

Mikrobaközösségek vizsgálata

- Célzott szekvenáláskor egy előzetes szelektálási lépés után csak az általunk érdekesnek vélt génszakasz vizsgálatát végezzük el (pld bakteriális 16S) pl baktériumközösség vizsgálata
- Élelmiszereredetű megbetegedés gyanúja esetén a teljes mikrobaközösség vizsgálható, ritkább kórokozók is látókörbe kerülhetnek, új kórokozók írhatók le

WGS alapú tipizálás

Előnyök

- Univerzális megközelítés valamennyi kórokozóra
- Rövid idő alatt óriási információmennyiség nyerhető ki az eddigi módszerekhez képest
- Phylogenetikai elemzésre alkalmas
- Patogenitási faktorok, rezisztencia, környezetben való túlélés (fertőtlenítőszer rezisztencia, biofilmképzés)
- A fertőzési forrás gyors azonosítása, ha a metaadatok rendelkezésre állnak
- Járvány gyors azonosítása és kivizsgálása
- Pontos esetdefiníció
- Minden eddiginél fejlettebb surveillance and monitoring (akár nemzetközi szinten)

WGS alapú tipizálás

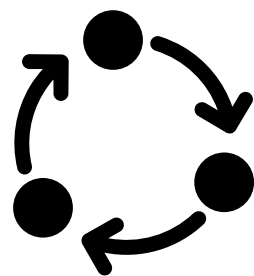
Hátrányok

- Egyelőre költséges
- Az infrastruktúra hozzáférhetősége és üzemeltetése
- Változatos bioinformatikai értékelési módszerek
- Szabványosítás hiánya egyelőre (folyamatban van), de validált módszerek vannak
- Bioinformatikai tudás
- Nem-humán adatok rendelkezésre állása
- Adatbázisok hozzáférhetősége

EFSA-ECDC közös WGS adatbázis

élelmiszerből, állatállományból,
környezetből izolált törzsek WGS
adatai

Nemzeti
Referencia
Laboratóriumok



**Európai Betegségmegelőzési és
Járványvédelmi Központ**



humán törzsek WGS adatai

Európai Élelmiszer-biztonsági

Hivatal

nébih

Tipizáló módszerek fő jellemzői

felbontóképesség

Szerotipizálás

Egyszerű
olcsó
kevés helyen végzik

Fágtipizálás

Egyszerű,
Olcsó,
kevés helyen végzik

PCR alapú

tipizáló
módszerek
(rep, RFLP)

Közepes ár,
nehezen összehasonlítható
laboratomok között

PFGE

Költséges, kevés helyen végzik

WGS – cgMLST

Nagyon költséges,
nagy számú törzs rutinszerű vizsgálatára még nem alkalmas, de egyre olcsóbb
(30000-80000 Ft/törzs)

WGS – wgMLST

SNP

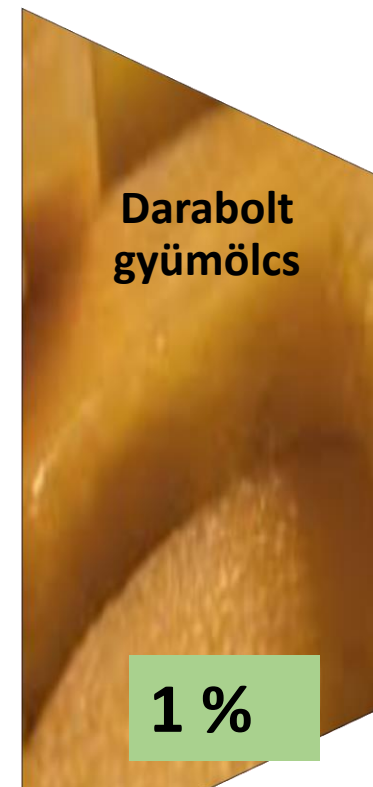
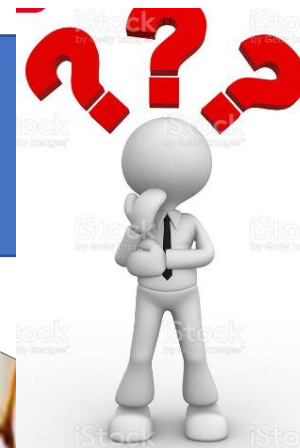
Ugyanaz, de az egységes nomenklátúra hiányzik

*Gyorsfagyasztott
zöldség által okozott
járvány forrásának
felderítése az új tipizáló
módszerekkel*



Listeria monocytogenes

Kockázatot jelentő élelmiszercsoportok



A hosszú lappangási idő (3-70 nap) miatt a megbetegedést okozó élelmiszer azonosítása nehézségekbe ütközik

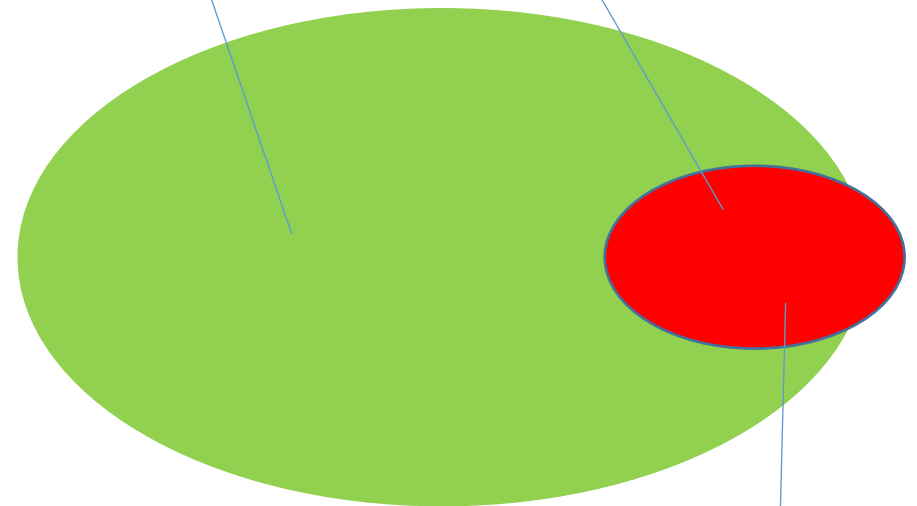
Élelmiszer-biztonsági kockázat

Törzs patogenitása

Az adott élelmiszer által nyújtott mikroökológiai környezetben képes-e szaporodni

Infektív dózis általában viszonylag magas (százezer cfu/g nagyságrend)

Élelmiszerből izolált típusok



Humán
megbetegedésből
izolált típusok

MLST (multi locus sequence typing)



...GCTTG...
...TAGGC...
...ATGCG...
...CGCTG...
...TGATC...
...TAAGG...
...ACTGA...

2
3
1
1
4
4
3

ST239

CC239

7 háztartási gén
szekvenálása

Allélek szekvenciája

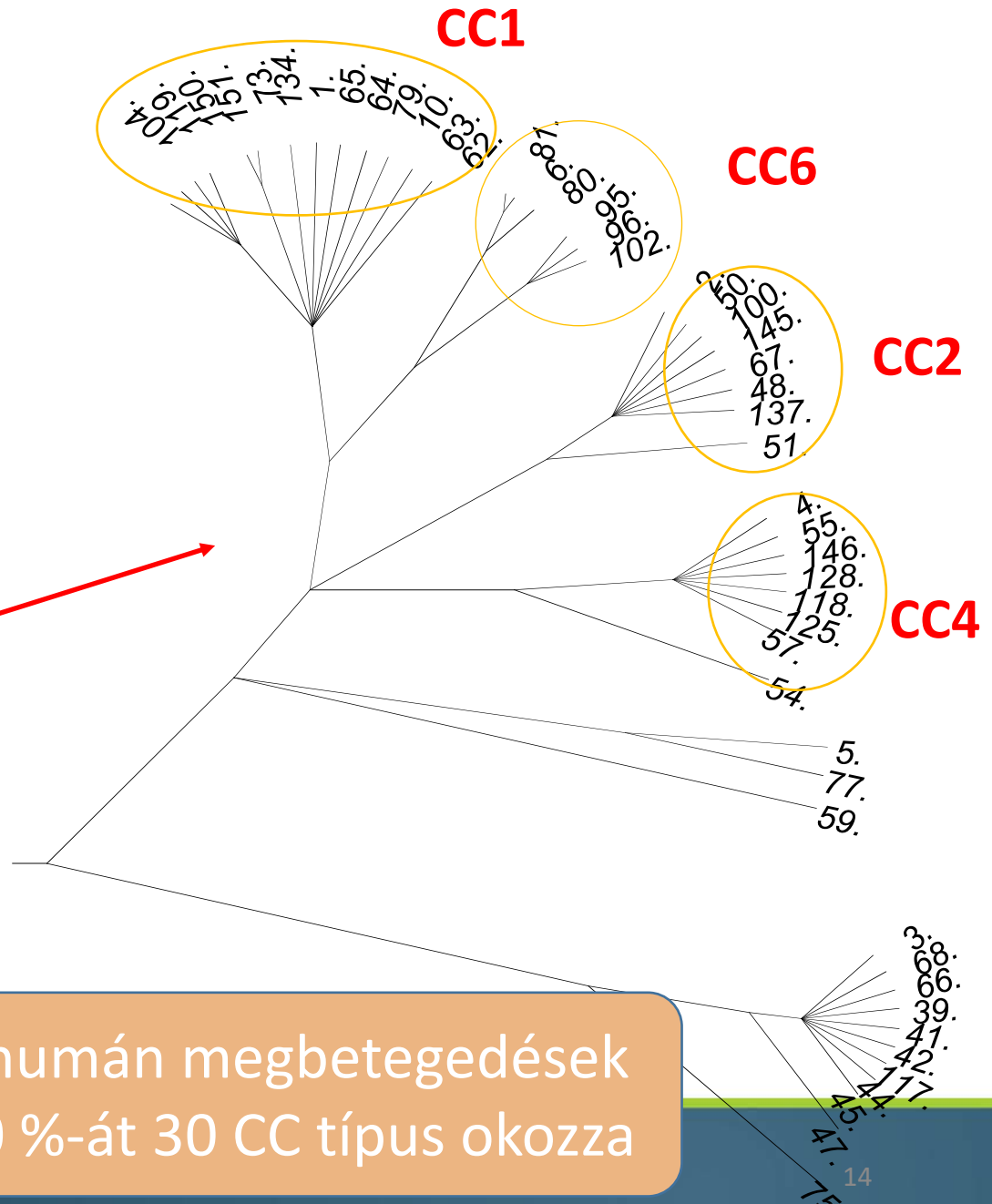
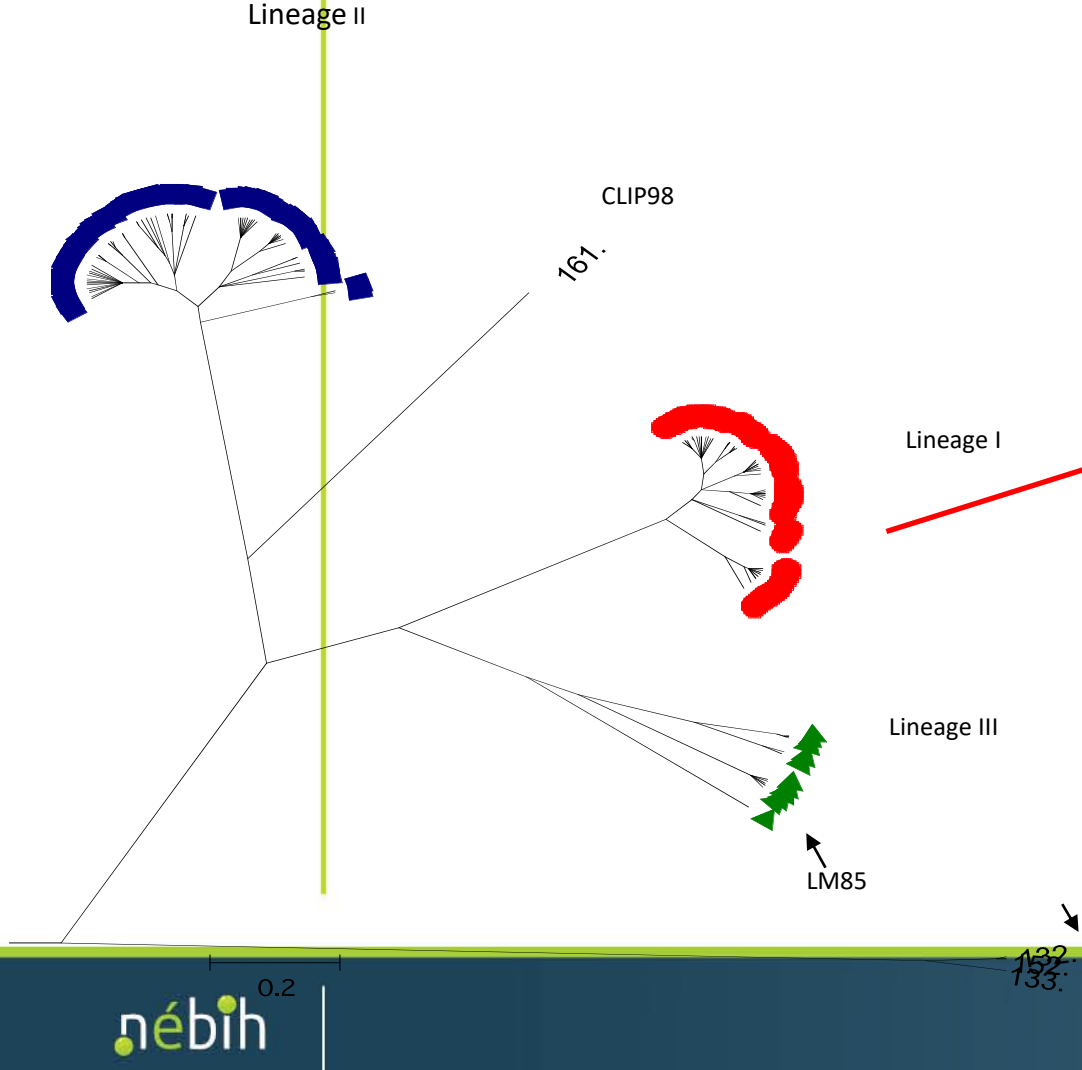
Profil

ST típus
7
azonos
allél

CC típus
6 azonos
allél

- ST típusok száma: 2342
- CC (klonális komplex) típusok száma: 194

ST típusok és klonális komplexek (CC-k)



A humán megbetegedések >90 %-át 30 CC típus okozza



RASFF

Első információk

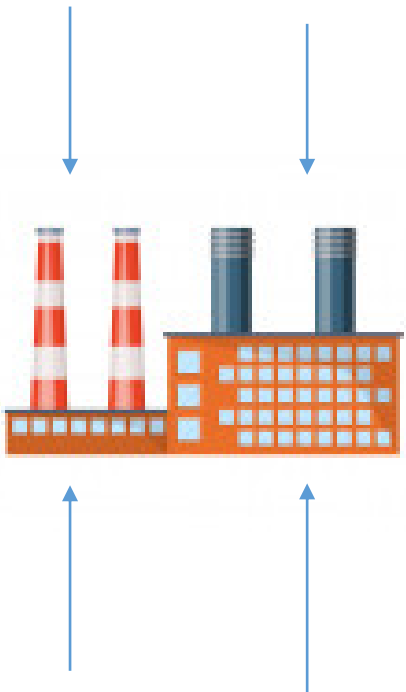
- Európai Unió gyorsriasztási rendszere: 2018 január
- IVb szerocsoportba tartozó ST6 (CC6) típusú *L. monocytogenes* törzsek okoznak legalább 5 országban humán megbetegedéseket (49 beteg, 11 halott)
- A törzs teljes genom szekvenciáját megosztották a humán és az élelmiszer vonal referencialaboratóriumaival
- A törzset először 2015-ben észlelték, perzisztáló forrásról lehet szó
- Az egyik beteg hűtőjében talált fagyasztott kukoricából (bontott csomag) kimutatták a törzset
- A terméket Magyarországon gyártották, Lengyelországban csomagolták

Információgyűjtés

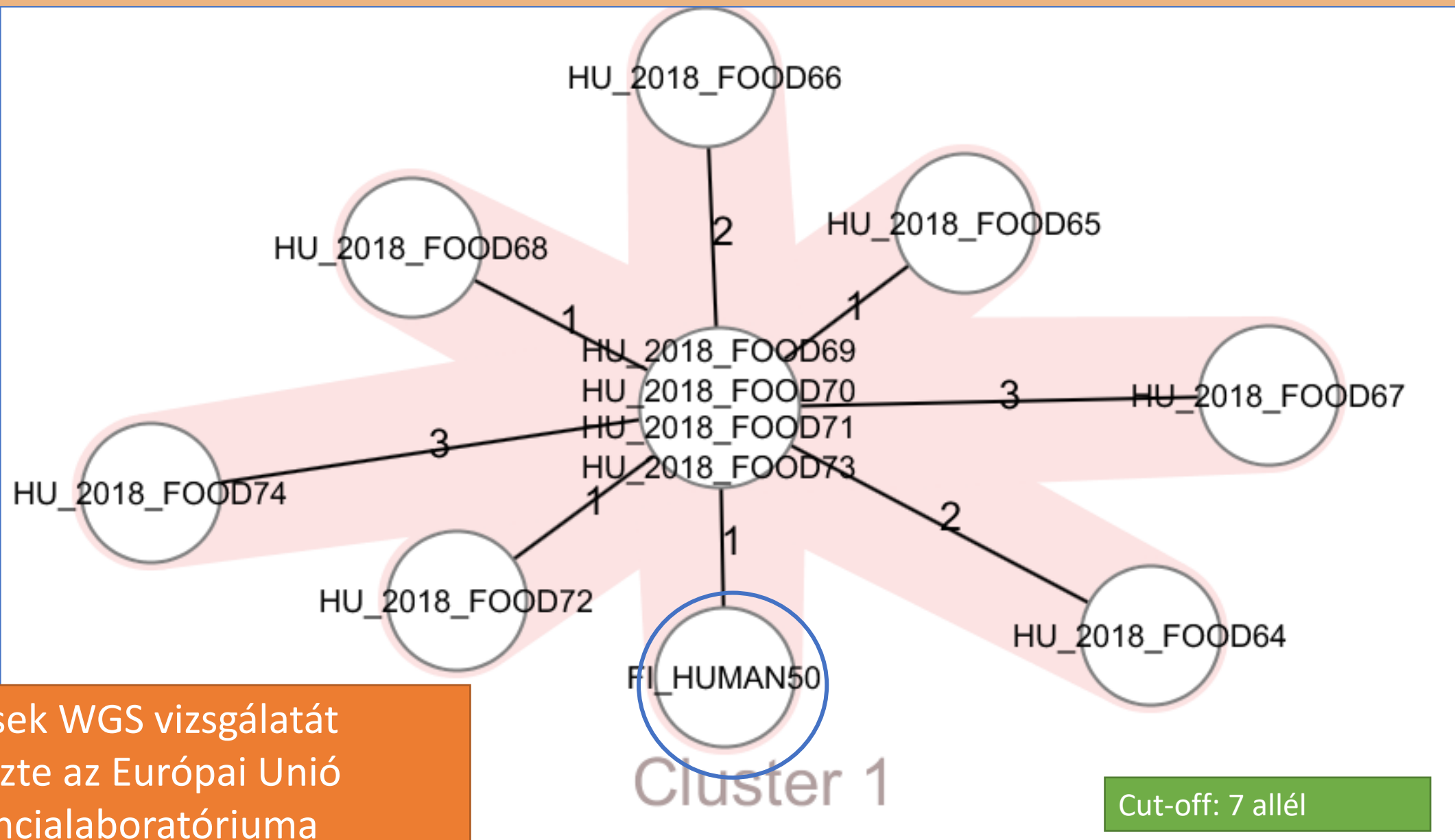


- Ausztria egy mexikói zöldségkeverékből izolált ilyen törzset egy évvel korábban, a termék magyar gyártótól származott
- Franciaország egy fagyasztóüzemében szintén izolálták a törzset, ugyanattól a magyar gyártótól vásárolt alapanyag feldolgozása után

A szálak egy hazai üzemhez vezetnek



- A fagyasztott élelmiszerek gyártói közötti kapcsolat rendkívül szövevényes, vásárlás egymástól, keverékek előállítása
- Más zöldségfélék is gyanúba kerültek
- Mégis egyre több adat utal arra, hogy valamennyi járványtörzssel azonos profilt mutató törzs a magyar üzemhez köthető
- Önellenőrzés nem tárt fel problémát
- Hatósági vizsgálatok: mind az élelmiszerrel érintkező felületek, mind egyéb felülethigiéniai minták többsége Listeria szennyezett, számos termékből és felületről kimutatható volt a járványtörzs



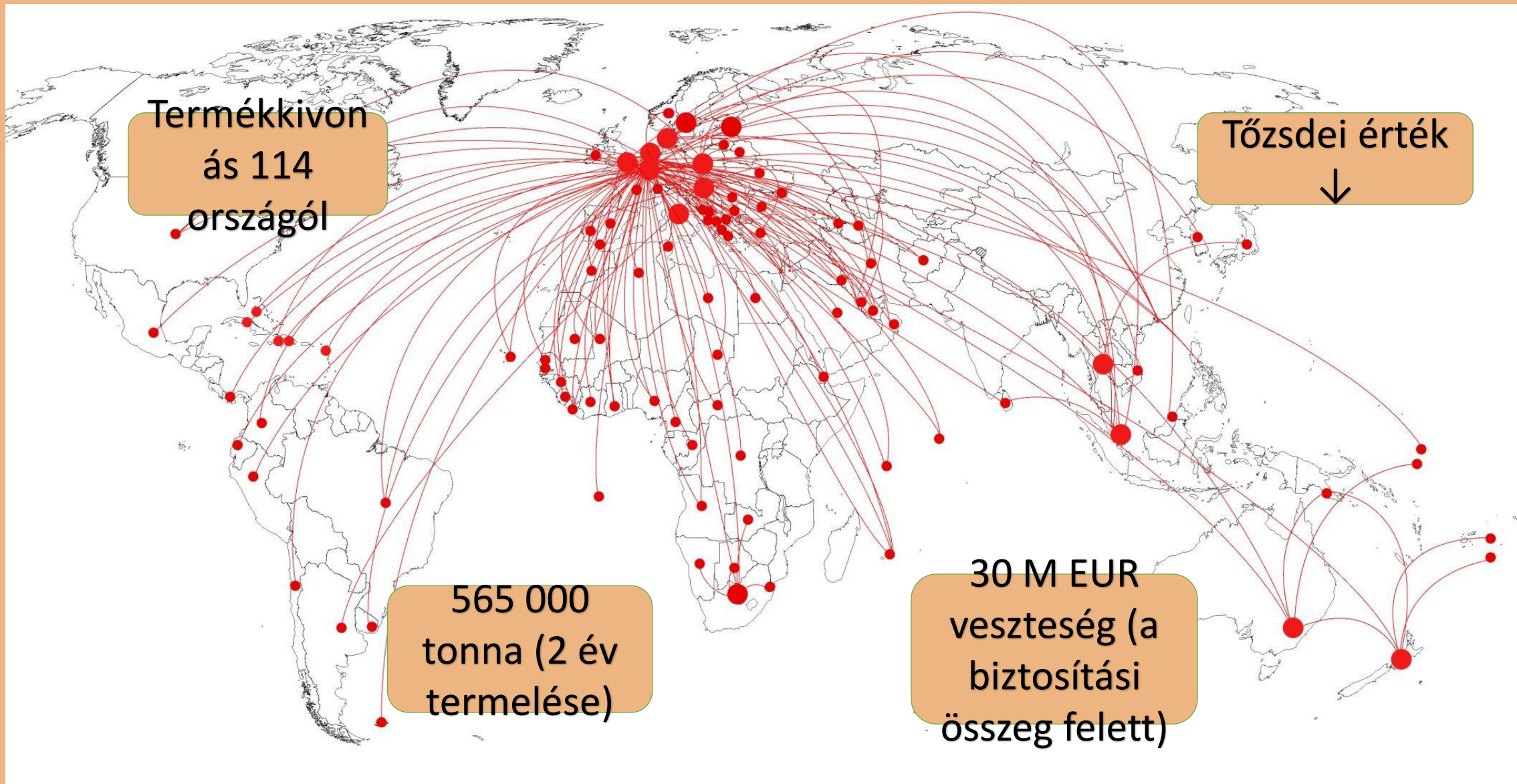
A törzsek WGS vizsgálatát elvégezte az Európai Unió referencialaboratóriuma (ANSES)

HATÓSÁGI INTÉZKEDÉSEK A JÁRVÁNYTÖRZS ÜZEMBEN TÖRTÉNŐ AZONOSÍTÁSA UTÁN

Az üzem még forgalomban lévő csaknem 2 év alatt gyártott terméke kivonásra került a forgalomból
(178/2004/EK 14. cikk)

Folyamatos kommunikáció a fogyasztókkal, üzemmel,
tagállamokkal, EFSA-val





Termékvisszahívások a fagyasztott zöldség járvány megfékezésére

A NÉBIH intézkedése után már nem jelentkeztek újabb megbetegedések, a járványt sikerült felszámolni

Azóta is számos országban, illetve nemzetközi szinten sikerült járványok forrását azonosítani a módszerrel (NO, PL, IT, FR)



Európai Bizottság egészségügyért és élelmiszerbiztonságért felelős biztosa – twitter üzenet

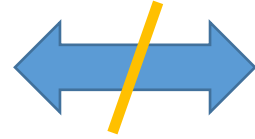
A precíziós tipizáló módszerek lehetőséget adnak arra, hogy az élelmiszeriparban, környezetben előforduló nagy számú törzs közül a humán egészségügyi szempontból jelentős törzseket azonosítsuk

A célzott intézkedésekkel a megbetegedések forrása minél gyorsabban felderíthető

Az ehhez a munkához szükséges platformokat létrehozták (közös EU adatbázis a humán és nem humán izolátumok adatainak gyűjtésére)

Mennyire tudunk élni ezekkel a lehetőségekkel (nagyszámú törzs gyűjtése és tipizálása egyelőre költséges módszerekkel)

Az emberi élet
legmagasabb szintű
védelme



Élelmiszeripar gazdaságos
működése



Köszönöm a
figyelmet!

