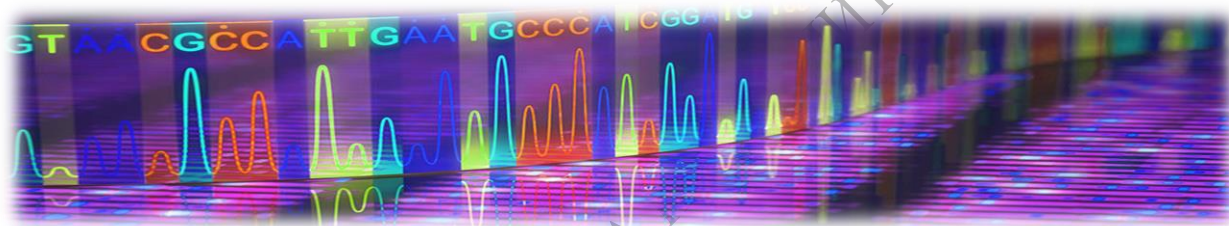


НАУЧЕН ОБЗОР

Пълн геномен секвентен анализ на патогенни причинители

Поради постоянно възникващите заболявания, патогенността на причинителите и тяхната увеличаваща се антимикуробна резистентност, както и в духа на стратегията „Едно здраве“ (“One Health”) усилията на всички учени се пренасочиха в развиване на молекулярните и биоинформатичните методи за диагностика и анализ на патогенните причинители и по-специално пълният геномен секвентен анализ (WGS). През последните десетилетия светът е разклатен от геномна революция, която заменя конвенционалните методи на изпитване с пълно геномно картиране и охарактеризиране на патогенните причинители в храни, в околна среда, изолати от хора и животни.



Улесняването на достъпа на учените до пълни данни за генома на патогенните причинители, както и споделянето на данни от всяка една страна в единна хармонизирана платформа от данни, предлага огромна възможност за охарактеризиране на патогенните микроорганизми: типизиране, откриване на огнища и хранителни взривове, оценка на риска, антимикуробна резистентност, патогенеза и епидемиология на база WGS. Освен установяване и типизиране на патогенния причинител, пълният геномен секвентен анализ предоставя възможност за предвиждане на база биоинформатичен анализ и статистическа обработка на данните, моделите на разпространение на даден патоген, както прецизиране на мониторинговите планове, предвиждане на нововъзникващи огнища и взривове на заболявания и не на последно място антимикуробната резистентност на патогенните бактерии и стратегията за лечение на заболяванията.

Геномиката като непрестанно развиваща се наука не просто променя диагностичната схема/рамка на националните референтни лаборатории, участващи в изследване и мониторинг на инфекциозни заболявания, но също така поставя под въпрос и пълнотата и точността на оценката на риска до момента.

Извън научните аспекти, редица инициативи и публикации, свързани с WGS ясно отбелязват тенденцията в световен мащаб на трансформиране от конвенционални методи за диагностика на патогенни причинители към WGS, който предоставя по-добра диагностична готовност, е по-евтин и по-бърз, като консумативи и реагенти, няма нужда от многочислен персонал, би могъл да „обработва“ около 3000 изолата на седмица, а информацията, която предоставя е огромна, всеобхватна и засягаща не само изолиране и типизиране на причинителя.

Фундаменталната микробиология бива изместена от информационните технологии, геномиката, биоинформатиката и статистиката.

По-евтини, по-малки и дори с джобен формат устройства за секвениране на ДНК и РНК в реално време подсилват бързото внедряване на WGS в рутинната практика и мониторинга на инфекциозните заболявания при хора и животни (такава технология, разработена и патентована от *Oxford Nanopore Technologies*, е MinION).

За целите на внедряване на WGS като стандартизиран метод в диагностиката, е необходимо да има първо колаборация на национално ниво и след това в световен мащаб, да бъде споделян опит между научни институции и посредством научни форуми, да бъдат вложени сериозни финансови ресурси за доразработване на методиката и валидирането на метода, и не на последно място да се изгради единна хармонизирана система за докладване и споделяне на секвенирани вече изолати на световно ниво.

“... [A] knowledge of sequences could contribute much to our understanding of living matter.”

Frederick Sanger

Този значителен научен прогрес в молекулярната диагностика няма да означава много, ако не бъде използван по начин, който да е от полза за крайната цел: „Едно здраве“, прецизна и безпристрастна оценка на риска, запазване общественото здраве и здравето на животните, намаляване тежестта на инфекциозните заболявания, причинени от различни патогени.



Give us our sequence..

One method to rule them all...



Какво представлява ДНК секвенирането?



Секвенирането на ДНК по своята същност е определяне подредбата на четирите химически градивни елемента, наречени „нуклеобазы“ по цялата верига на молекулата на ДНК. Това декодиране на генетични последователности показва на учените генетичната информация, кодирана в даден ДНК сегмент.

В двойната спирала на ДНК всяка от четирите химически бази винаги се свързва по един и същ начин, образуващ „базови двойки“. Аденин (А) винаги се свързва с тимин (Т), а цитозин (С) винаги се сдвоява с гуанин (G). Това сдвояване стои в основата на механизма, чрез който ДНК молекулите се копират при деленето на клетките. Сдвояването също така е в основата на методите, чрез които се правят повечето експерименти за секвениране на ДНК.

Цялостното геномно секвениране (WGS) е процесът, при който едновременно се определя пълната ДНК последователност на човешкия, животинския, растителния, бактериалния, вирусния геном. С други думи, чрез цялостното геномно секвениране се разчита цялата наследствена информация на живите организми.

През 2003 година за първи път е дешифриран напълно човешкият геном в международната изследователска програма, стартирала през 1990 г., наречена Проект „Човешки геном“ (HGP). Човешкият геном съдържа приблизително 3 милиарда базови двойки и представлява пълния набор от кодиращи „инструкции“ за създаването и възпроизводството на даден организъм.



Има **различни видове секвениране** за различните цели на анализите. Някои от тях са:

- *Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS)*
- *Polony sequencing (емулсионен PCR)*
- *Pyrosequencing*
- *Solexa sequencing (bridge PCR, reversible dye terminator)*
- *Sequencing by ligation (SOLiD)*
- *Ion-semiconductor sequencing*
- *Nanoball sequencing*
- *Single-molecular sequencing (Helioscope)*
- *Single-molecule Real-Time sequencing*
- *Nanopore*
- *VisiGen (FRET, полимераза с флуоресцентен донор в АЦ)*
- Секвениране чрез хибридизация (*Microarray*)

История на ДНК секвенирането:

Технологиите за секвениране на ДНК имат богата история, с няколко смени на парадигми в рамките на няколко десетилетия. Този период от около 70 години обхваща ранните усилия за подреждане на биополимерите, изобретяването на електрофорезата за секвениране и разделяне на ДНК, и тяхното „внедряване“ в проекта за човешкия геном, последвани от появата на второто поколение секвенционен анализ (масово паралелно секвениране) и след това – третото поколение ДНК секвениране в реално време, едномолекулно.

Първо поколение секвениране на ДНК:

От 1953 г. датира първото фундаментално откритие, свързано с „разплитане на мистерията ДНК“ на Уотсън и Крик, които разгадават триизмерната структура на ДНК, като използват кристалографски данни, работени от *Rosalind Franklin* и *Maurice Wilkins*.

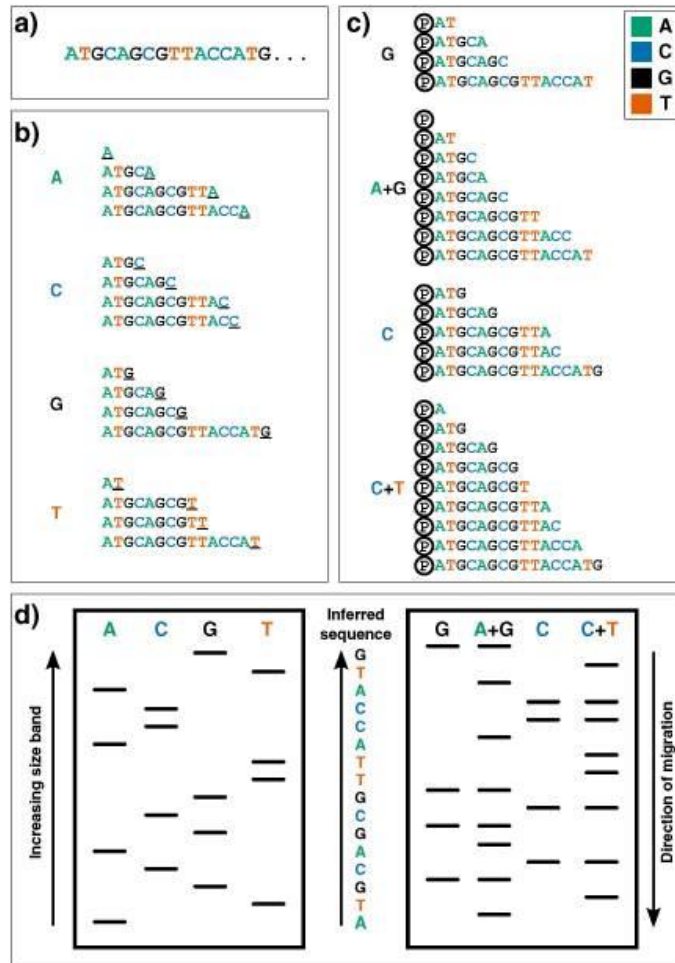
Първоначалните усилия са съсредоточени върху секвениране на едноверижни РНК фрагменти или на едноверижни РНК геноми на бактериофаги. Едноверижните РНК са значително по-къси от еукариотните ДНК молекули и могат да бъдат отрязани на специфични, известни тогава участъци, разпознаваеми от РНАза ензимите (рибонуклеази). Въпреки тези немалки открития за времето, напредъкът е бавен, тъй като лабораторните методики са заимствани от аналитичната химия и са способни само да измерват нуклеотидния състав, а не да дешифрират нуклеотидната последователност. Селективността на РНАзите към РНК с цел получаване на по-къси фрагменти и откритието, че РНК съдържа нуклеотидна база, която е различна от тези 4 при ДНК, през 1965 г. води *Robert Holley* и колектив до успеха да синтезират първата пълна последователност на аланин тРНК от *Saccharomyces cerevisiae*. Първата секвенирана РНК последователност от аланин тРНК, е изисквала пет учени, работещи три години с един грам чист материал (изолиран от 140 kg дрожди) за да бъдат секвенирани едва 76 нуклеотида.

В този период на силен напредък в областта на секвенирането на ДНК *Fred Sanger* и колектив разработват техника, базирана на откриване на радиоактивно белязани фрагменти от ДНК след двуизмерно фракциониране. Чрез използването на този 2-D метод на фракциониране *Walter Fiers* успява да „разгадае“ първата пълна секвенция, отговаряща за кодирането на протеина, изграждащ обвивката на бактериофага MS2, през 1972 г.

В този период *Ray Wu* и *Dale Kaiser* използват техника с радиоактивно белязване на 5' краищата на ДНК фрагментите от генома на *Enterobacteria phage λ* и успяват да разчетат къси секвенции от генома.

Следващата фундаментална крачка в развитието на секвентният анализ е включване в методиката на секвениране на полиакриламидна гел електрофореза, която осигурява много по-добро разделяне на фрагментите ДНК и е много по-бърза и ефективна, сравнена с електрофореза и хроматография в комбинация за разделяне на фрагментите. Полиакриламидната гел електрофореза от средата на 1970 г. е включена в два разработени протокола за секвениране: *Alan Coulson* и *Sanger's „plus and minus“* (системата на плюс и минус) и методиката за химично разцепване на *Allan Maxam* и *Walter Gilbert*. Методиката на *Alan Coulson* и *Sanger's „plus and minus“* използва ДНК полимераза за синтез на ДНК от радиобелязан праймер и така за първи път е секвениран целият геном на бактериофага X174 (PhiX).

При методиката *Maxam* и *Gilbert* радиоактивно белязаната ДНК се третира с химикали, които разрушават веригата на отделни фрагменти и посредством полиакриламидна гел електрофореза се определя дължината на тези фрагменти и позицията на радиобелязаните нуклеотиди (ddNTP). Нуклеотидите биват белязани обикновено с радиоактивен P³².



Фиг. 1: Принцип на методологията, създадена от *Maxam* и *Gilbert*, включваща радиобелязани ddNTP и електрофореза.

Секвенирането на *Sanger* дава висококачествена секвенция на сравнително дълги фрагменти ДНК. Обикновено тази методика се е използвала за секвениране на бактериални плаزمиди. Първоначално секвенирането на *Sanger* е скъпо и неефективно за широкомащабни проекти, като секвениране на целия геном или метагеном ("колективен геном" на една микробиологична група). За подобни задачи трябва да се използват нови широкомащабни техники на секвениране, които са по-бързи и по-евтини.

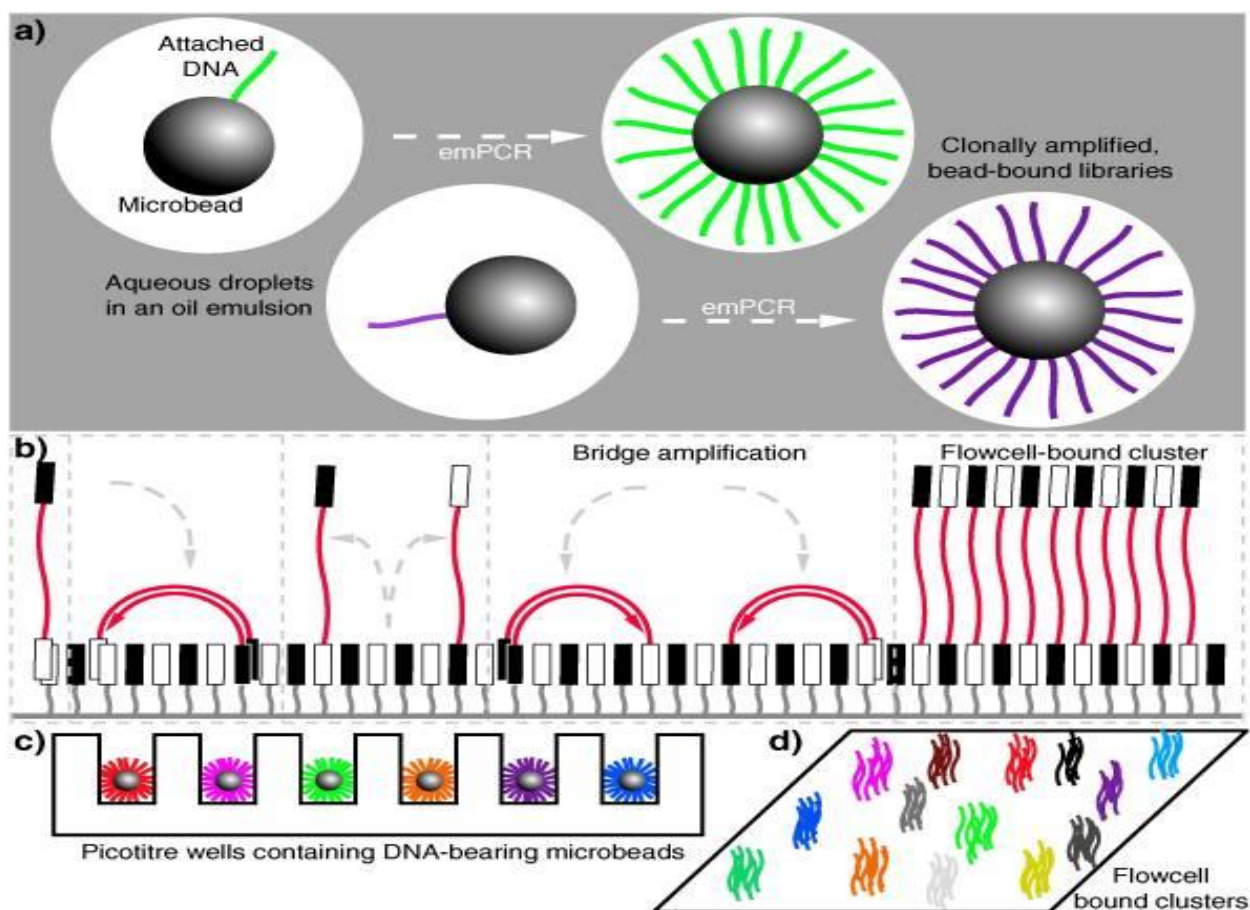
Направени са редица подобрения в секвентният анализ на *Sanger*, които основно включват заменяне на фосфо- или тритриум-радиобелязани нуклеотиди с флуорометрично базирано отчитане (позволяващо реакцията да се случи в една епруветка вместо в четири); въвеждане на капилярна електрофореза вместо полиакриламидна фореза; въвеждане на полимеразно верижна реакция за намножаване на фрагментите ДНК и последващо автоматизиране на процеса посредством секвенаторни машини, които да осъществяват декодирането на ДНК автоматично и за по-кратко време. Тези машини за секвениране на ДНК от първо поколение произвеждат по-малко от една килобаза (kb) по дължина: за да се анализират по-дълги фрагменти са създадени техники, като "*shotgun sequencing*", където припокриващи се фрагменти от ДНК са клонирани и секвенирани поотделно, и след това сглобени в една дълга последователност *in silico*. В проекта „Човешки геном“ са се използвали по-нови секвенаторни машини – като например *ABI PRISM*, разработени от *Leroy Hood* и произведени от *Applied Biosystems*, които позволяват едновременното секвениране на стотици проби.

Второ поколение ДНК секвениране:

Секвенирането от второ поколение драстично се различава като методология и принцип от предшестващите методи. Вече не се „чете“ нуклеотидна последователност посредством използване на радио- или флуоресцентно-белязани dNTP (нуклеотидни двойки) или олигонуклеотиди преди визуализиране с електрофореза. Вместо това изследователите са използвали наскоро открит „луминисцентен“ метод за измерване на синтеза на пирофосфат: той се състои от двуензимен процес, при който АТФ (аденозинтрифосфат) сулфурилаза се използва за превръщане на пирофосфата в АТФ (аденозинтрифосфат), който след това се използва като субстрат за луцифераза, като излъчваната светлина е пропорционална на количеството пирофосфат. Всеки dNTP преминава през системата и попада върху шаблонна ДНК, прикрепена към твърда фаза. Тази методика, разработена от *Pål Nyrén* и колектив, притежава редица плюсове: може да се извърши с небелязани нуклеотиди (вместо силно модифицираните dNTP) и процесът може да се наблюдава в реално време. По-късно подобренията на тази методология включват: закачане на ДНК към парамагнитни перли и ензимно разграждане на несвързани (нуклеотиди) dNTPs. Основната трудност на тази техника е да се установи колко от един и същ нуклеотид има в един ред в дадена позиция: интензитетът на освободената светлина съответства на дължината на хомополимера, но фоновият шум предизвиква нелинейно отчитане над четири или пет идентични нуклеотида. По-късно пиросеквенирането е лицензирано от *454 Life Sciences*, която компания превръща тази методика в първата голяма успешна търговска технология от следващо поколение („next-generation sequencing“ - NGS).

Принципа на методиката се състои в:

- 1) ДНК молекулите първо се прикрепят към магнитните перли чрез адапторни последователности, които след това
- 2) преминават през емулсионен вода-в-масло PCR (Полимеразно верижна реакция - emPCR), за да покрият всяка магнитна перла с клонална ДНК, следва
- 3) етап на промиване на тези покрити с ДНК перли върху пиколитърна реакционна плака, на която една перла пасва на една ямка;
- 4) следваща стъпка в методиката е пиросеквениране, когато по плаката се закачат малки ензими, свързани с перли, и dNTPs, и
- 5) измерване количеството на пирофосфат, използвайки сензор (CCD). Тази техника е в състояние да произведе дължина от около 400–500 базови двойки (bp) и позволява пълното секвениране на един човешки геном. Първата високопроизводителна машина (HTS), която е широко достъпна за потребителите, е оригиналната *GS 20*, която по-късно е заместена от *454 GS FLX*, която предлага по-голям брой четения/копия, както и по-добри данни за качеството на секвенциите.



Фиг. 2: Принцип на натоварване на магнитни перли с клонална ДНК, залегнал в патентованата технология на 454 Life Sciences

Точността при секвениране на геномна ДНК последователност или при пълно геномно секвениране бива спомогната от автоматично сравняване на секвенирания геном с референтен такъв от база данни. Това сравняване на секвенции спомага за откриване на екзони и мигрирани ДНК последователности или слети гени.

По-късно в историята, стандартизираната вече процедура на геномно секвениране (*GAIIx*) бива последвана от *HiSeq* машина, способна да секвенира още по-дълги фрагменти ДНК, а след това идва ерата и на *MiSeq* технологията, която извършва анализа на по-ниска цена, по-бързо и успява да „прочете“ по-дълги участъци.

Редица други компании за секвениране на последователности, всяка от които е разработила свои собствени методики, също са се появявали и изчезнали от пазара и са давали своя принос към разработване на оптимизираната методика за пълно геномно секвениране.

Методиката на секвениране чрез олигонуклеотидно лигиране и детекция (*SOLiD*) от *Applied Biosystems* (която компания стана *Life Technologies* след сливане с *Invitrogen*) е пример за такъв цялостен продукт, включващ и специфичен софтуер за обработка на сурови данни, който се е наложил на пазара поради по-ниската цена на реакцията, макар че не може да достигне потенциала на *Solexa Illumina*.

Друга забележителна технология, базирана на последователно свързване, е техниката "DNA nanoballs" на *Complete Genomic's*, при която резултатът са дълги ДНК вериги,

получени посредством „*bridge*“ амплификация на повтарящи се участъци от веригата на шаблонната ДНК, завършващи с адаптори, които се закачат за наноперлите.

Последната забележителна секвенционна техника от второ поколение е разработена от *Jonathan Rothburg - Ion Torrent* (друг продукт на *Life Technologies*). Тя е първата така наречена "пост-светлинна" технология, тъй като не използва нито флуоресценция, нито луминесценция. Клоналните ДНК фрагменти (получени чрез *emPCR*) са натоварени върху пикоямкови плаки. Инкорпорирането на нуклеотиди се измерва не чрез освобождаване на пирофосфат, а посредством разликата в рН при освобождаването на протони (H⁺ йони) по време на полимеразноверижната реакция. Измерването се осъществява чрез *CMOS* технология, използвана при производството на микропроцесорни чипове. Тази технология дава възможност за много бързо секвениране в реално време, въпреки че тази технология не е подходяща да интерпретира хомополимерни последователности поради загубата на сигнал, тъй като множество dNTP съвпадат.

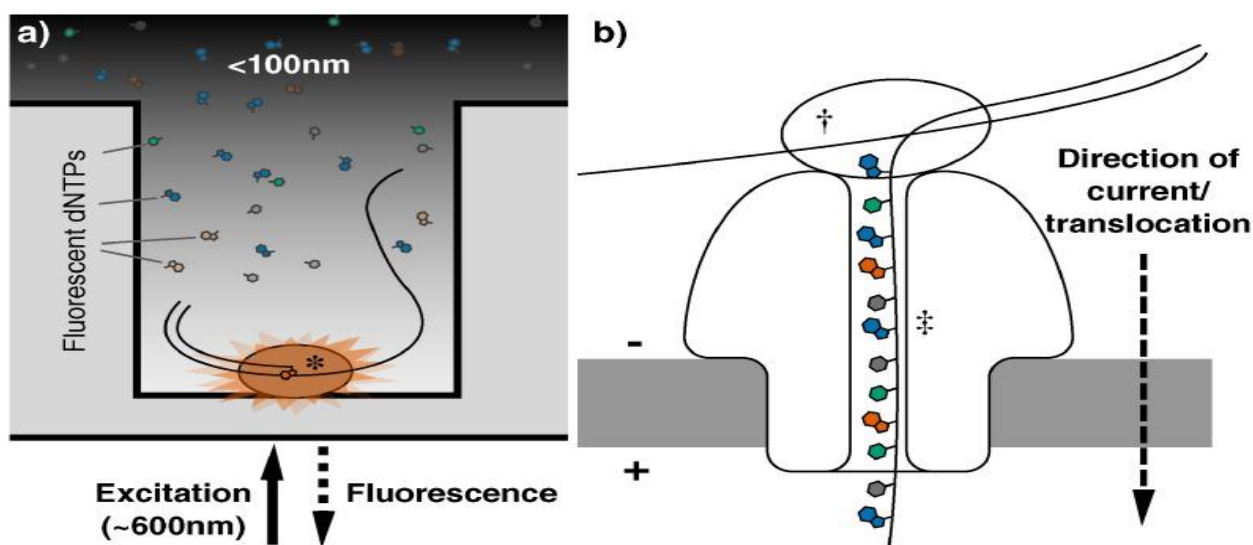
„Революцията на геномиката“ задминава компютърната революция, описана от закона на Мур: сложността на микрочиповете (измерена чрез броя на транзисторите на единица цена) се удвоява приблизително на всеки две години, докато секвенирането на ДНК и дължината на секвенираните последователности между 2004 г. и 2010 г. се удвоява на всеки пет месеца. През последните години платформата за секвениране на *Illumina* се е доказала като най-успешна и се смята за монополист в ДНК секвенирането от второ поколение.

Трето поколение ДНК секвениране:

Секвенирането на единична молекула ДНК в реално време (SMS) е една от определящите характеристики на третото поколение секвентен анализ. Също така липсата на необходимост от амплификация на ДНК, стъпка която присъства задължително при предходните етапи от историята на секвентният анализ е още една характеристика на трето поколение секвениране. Първата SMS технология е разработена в лабораторията на *Stephen Quake*, а по-късно комерсиализирана и патентована от *Helicos BioSciences*, и работи на същия принцип както *Illumina*, но без „*bridge*“ амплификация; шаблонното ДНК е прикрепено към плоска повърхност и след това така наречените „виртуални терминаторни“ нуклеотиди (флуоресцентни обратни терминаторни dNTPs) се натоварват върху една база и се изобразяват, преди разцепването и циклирането на следващата база. Въпреки че е сравнително бавен и скъп метод, той е първият по рода си, който позволява последователността на неамплифицираната ДНК да бъде визуализирана.

Pacific Biosciences и гамата им машини *PacBio* създават технологията *SMRT* (платформа за секвениране на единична молекула в реално време) от трето поколение. При технологията *SMRT* се извършва ДНК полимеризация върху наноструктури, наречени *zero-mode waveguides (ZMWs)*, които са по същество малки дупки в метален филм/монослой, покриващ микрочип. Тези *ZMW* използват свойствата на светлината, минаваща през отвори с диаметър, по-малък от този на лъча светлина, което причинява експоненциалния му разпад, като се осветява само дъното на ямките/дупките. Това позволява визуализирането на единични флуорофорни молекули в близост до дъното на *ZMW*, тъй като зоната на лазерно възбуждане е толкова малка на фона на съседните молекули в разтвора. Отлагането на единични молекули на ДНК полимераза в *ZMW* ги поставя в осветената област: чрез промиване на таргетната ДНК последователност и флуоресцентни dNTPs, удължаването на ДНК веригите с единични нуклеотиди може да се наблюдава в реално време, като само флуоресцентно белязаният нуклеотид ще генерира флуоресценция, след което багрилото се отделя, завършвайки сигнала за тази позиция. Тази технология може да проследи единични

молекули ДНК в много кратък период от време. Машината *PacBio* позволява откриването на модифицирани бази и също може да генерира секвенции с дължина над 10 kb.



Фиг. 3: Схематично представяне на принципа на технологията *SMRT*

Може би най-очакваната област на развитие на секвентният анализ от трето поколение е секвениране с нанопори за откриване на геномни последователности и количествено определяне на всякакви биологични и химични молекули. Потенциалът при секвениране на геномна ДНК на нанопорите е установен още преди появата на секвениране от второ поколение, когато изследователите са доказали, че едноверижната РНК или ДНК могат да бъдат прокарани през липиден двуслой през големи α -хемолитинови йонни канали чрез електрофореза. *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* е първата компания, предлагаща секвенатори с нанопори, едни от които са: *GridION* и *MinION*. Част от тези устройства са толкова малки като размери, колкото е едно мобилно USB устройство с размер на смартфон и за пръв път подобно е пуснато на пазара за крайни потребители през 2014 г. Вече секвенатори като *MinIONs* са били използвани самостоятелно за генериране на референтни последователности от бактериален геном и целеви ампликони, както и за генериране на шаблонна ДНК, която машините на *Illumina* да използват като библиотека. Краткото време за секвениране и компактността на машината осигуряват и възможност за работа в полеви условия на терен. *Joshua Quick* и *Nicholas Loman* използват *MinION* секвенатора на терен в Гвинея, доказвайки вируса на Ебола и секвенирайки вирусния геном едва два дни след пробовземане.



Фиг. 4: Снимки на апаратите на *Oxford Nanopore Technologies (ONT)*

	454 FLX +	HiSeq 2000	PacBio RS	Ion Torrent 316
Company	Roche (USA)	Illumina (USA)	Pacific Biosciences (USA)	Life Technologies (USA)
Sequencing method	Synthesis (pyrosequencing)	Synthesis (cyclic reversible terminator)	Realtime sequencing	Synthesis (H ⁺ detection) on the chip
Amplification	emPCR	BridgePCR	None	emPCR
Run time	23 h	11 days (dual flow cell)	0.5 - 2 h	2 h
Reads Mb/run	1,000	540,000-600,000	5 - 10	>100
Reagent cost/run	\$6,200	~\$20,000	\$110 - 900	\$750
Reagent cost/Mb	\$7	>\$0.04	\$11 - 180	<\$7.5
Read length	500-1,000 (mode 700)	2*100 (paired-end reads)	860 - 1,100	>200
Primary errors	Indel	Substitution	CG deletion	Indel
Pros	Long read length	Highest throughput and lowest cost per Mb	Longest read length, no amplification error	Low cost per sample
Cons	High capital cost and high cost per Mb	High capital cost and high computation needs	Error rates, comparatively small outputs, high cost per Mb	High cost per Mb

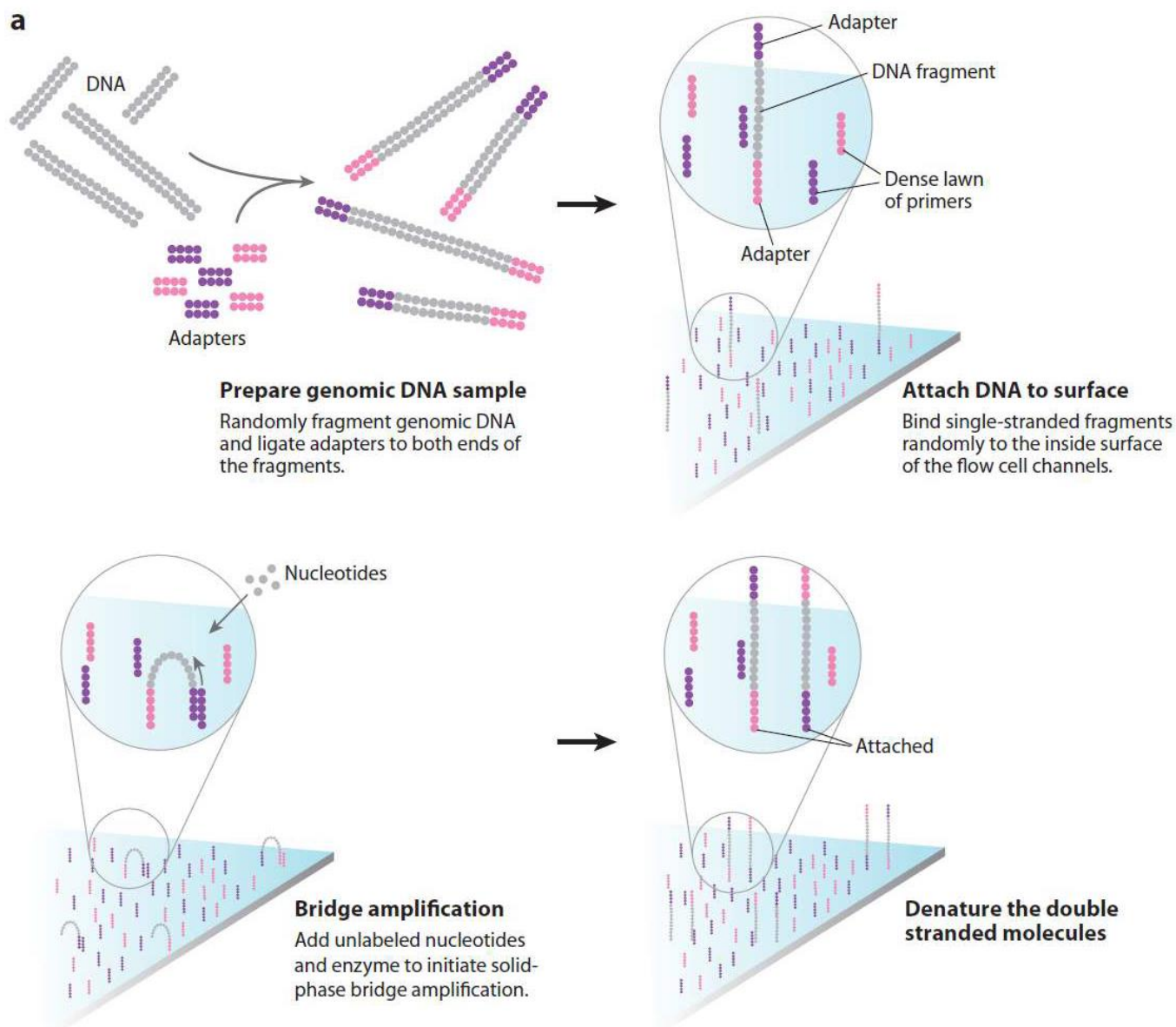
Фиг. 5: Сравнителен анализ на база цена/качество/време между секвентните методи

Принцип на секвенционния процес:



Фиг. 6: Схематично представяне на последователните процеси в секвентния анализ

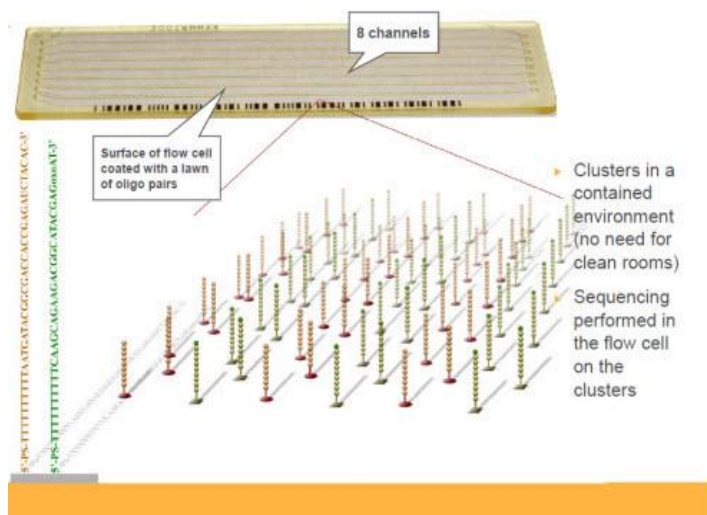
Като първа стъпка от процеса на ДНК секвениране е събиране на пробите и подготовката им за изолиране на ДНК. След като ДНК е изолирано по стандартните методи и оценено по качество чрез нанофотометър (*NanoDrop*), получаването на фрагменти става по механичен (при *Illumina* чрез фокусиран ултразвук) или ензимологичен път (при *Nextera* технологията) на изолираното ДНК. Получените фрагменти се блантират чрез прибавяне на екзонуклеази и се добавя по една база А (аденин), която по късно ще се свърже с прибавеният адаптер. Адаптерите съдържат познати ДНК последователности и известен баркод, който се състои от 5 ДНК бази, с които се бележат фрагментите и които по-късно служат за свързване на последователностите, получени при секвенирането. Към тези адаптори, които съдържат определена известна последователност по-късно се закачат секвенционните праймери, с което на практика започва секвенирането.



Фиг. 7: Предварителна подготовка на ДНК пробата, подготовка за бридж амплификация и размножаване на фрагментите

Чрез използването на тези детерминирани баркод последователности е възможно да бъдат миксирани различни по вид ДНК фрагменти от различни интересувачи ни гени в една единствена реакция. Чрез мултиплексната реакция на секвениране на *Illumina* може да бъде използван пълният капацитет на секвенатора (в зависимост от моделите има различни възможности от 1,5 (1-1.5 Gbp) милиарда базови двойки до 600 (600 Gbp) милиарда базови двойки на един рън/цикъл) могат да бъдат секвенирани едновременно различни по произход ДНК-и от човек, микроорганизми, растения или пък до 96 различни генни участъци от различни изолати.

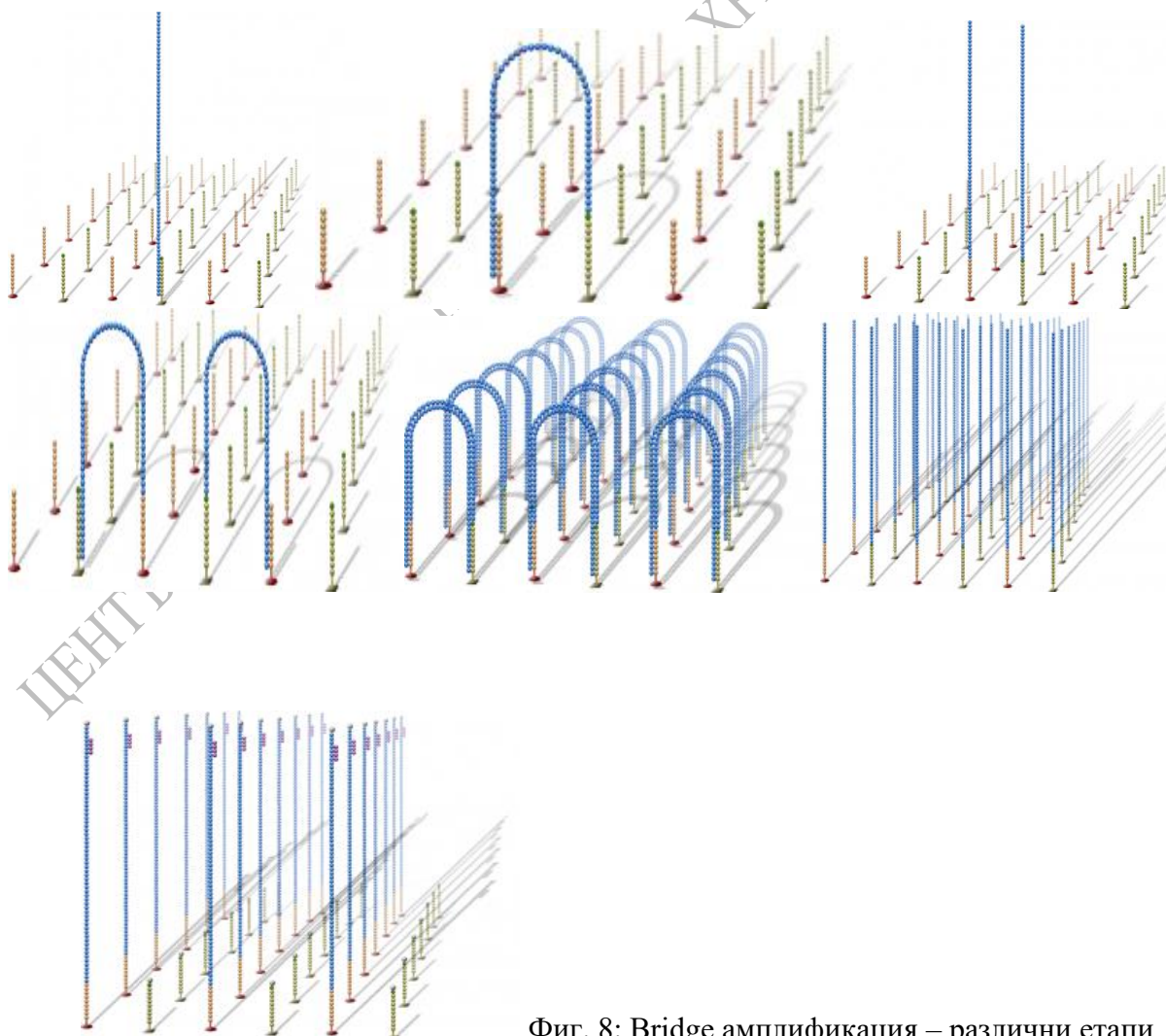
След като бъде подготвена библиотеката с шаблонните фрагменти ДНК, те биват въведени във флоу клетка. На фиг. 8 е представено схематично какво всъщност представлява една флоу клетка на *Illumina*.



Флоу клетката има 8 канала (писти), по които се въвеждат подготвените ДНК фрагменти. Около тези канали има агарозен гел, върху който са предварително натоварени олигонуклеотиди с комплементарни базови двойки на адапторите, които вече са закачени в предишната стъпка. Милиони олигонуклеотиди във флоу клетката спомагат паралелната мостова амплификация/“bridge” амплификация.

Така натоварените олигонуклеотиди образуват клъстери, като едните са комплементарни на 3'-края на адапторите, а другите са комплементарни на 5'-края на подготвените в предната стъпка фрагменти.

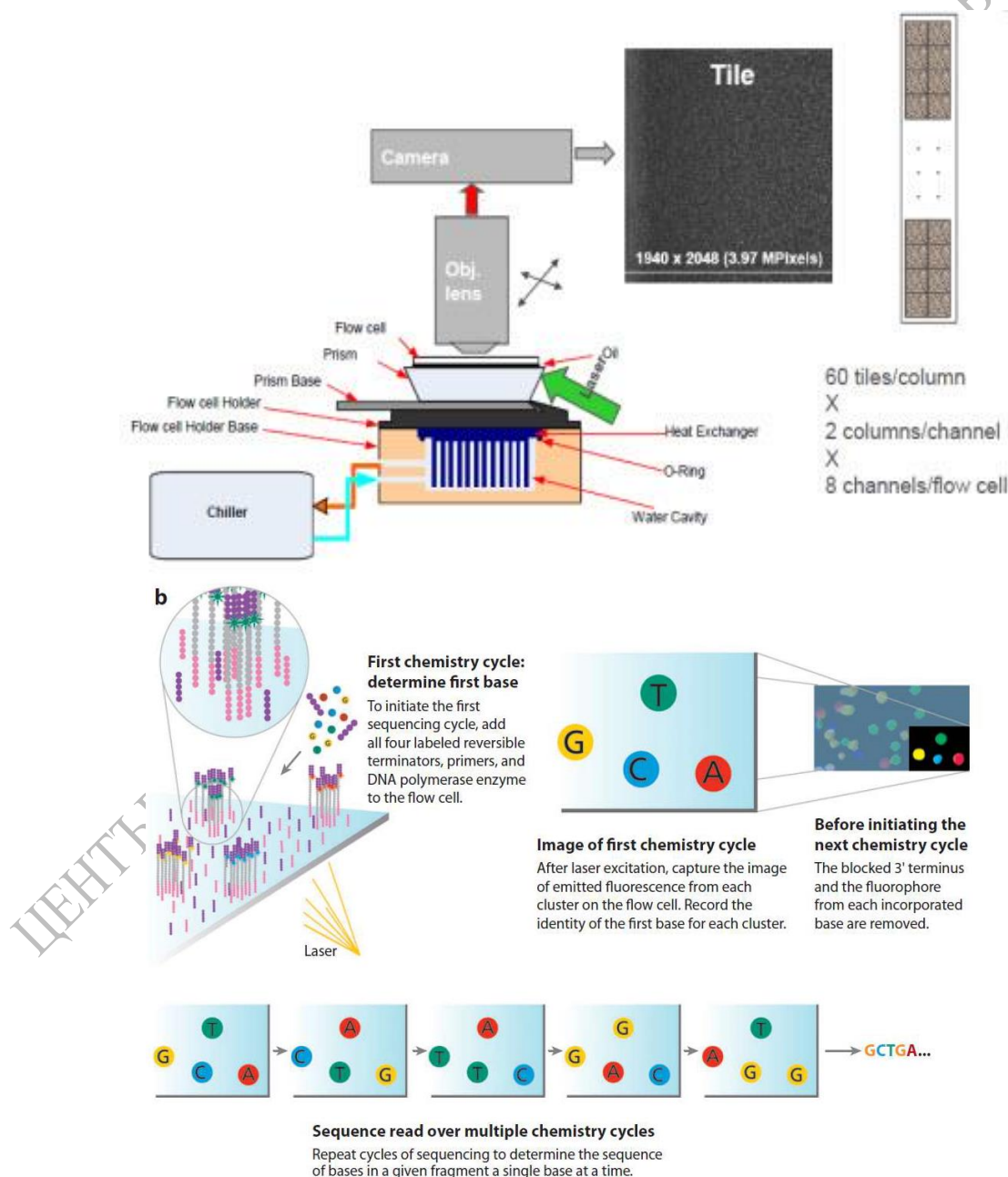
Схемите по-долу визуализират създаването на милиони копия ДНК фрагменти, оформени в клъстери чрез “bridge” амплификация в присъствието на стандартните компоненти за реакция на амплификация, а именно: полимераза, dNTPs, MgCl₂, праймери и H₂O.



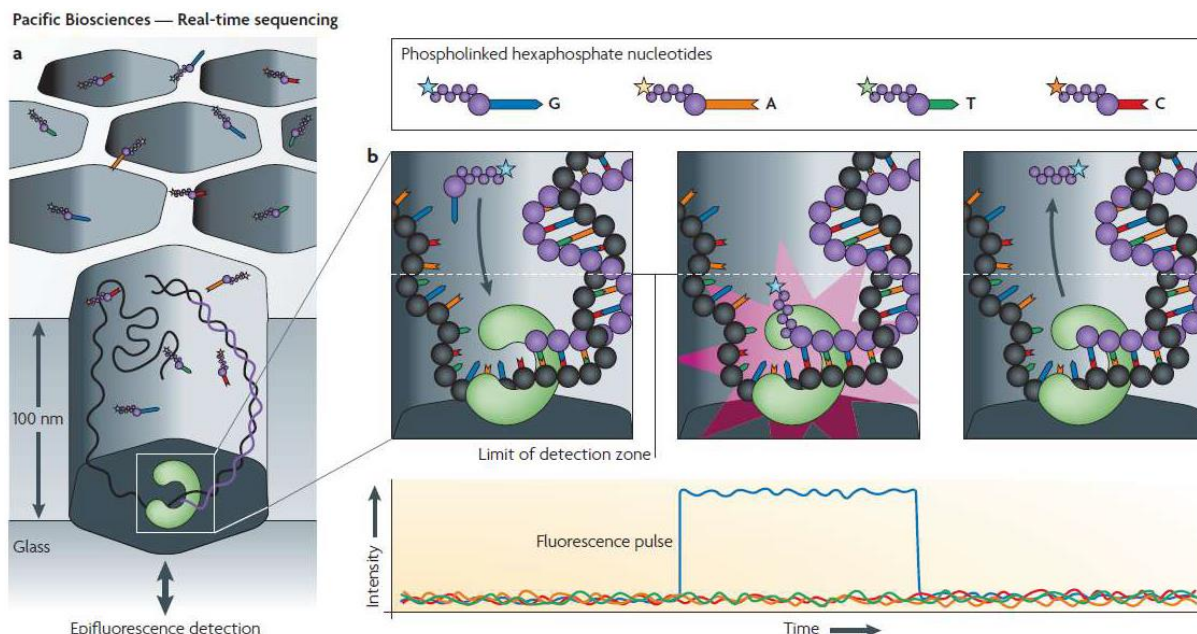
Фиг. 8: Bridge амплификация – различни етапи

Всяка индивидуална верига върху флоу клетката се амплифицира чрез “bridge” амплификация, като резултатът е около 1000 копия на всяка от веригите. При окончателното приключване на процеса има около 150 000 000 индивидуално четими клъстери. Амплифицираните копия от една верига, в определена позиция се наричат клъстер.

Секвенирането се извършва чрез стандартна биохимична реакция на обратими цветови терминатори (reversible dye terminators). Всяка една присъединяваща се база отделя флуорофор, който се засича от високо чувствителна камера. Всяка една от четирите бази е маркирана с 4 различни цветови флуорофора – червен, зелен, жълт и син. Камерата прави 5 снимки – една за фокусиране на клъстера и четири за всяка една от базите. Така софтуера изчислява както точната позиция на клъстерите по цялата верига, така и определя коя база е новоприсъединила се поради разлика в цветовият интензитет.



Фиг. 9: Детектиране на базите, маркирани с флуорофори посредством високо чувствителна камера



Фиг. 10: Принцип на ДНК секвениране на бактериален геном по технологията на *Illumina*

Повече информация за етапите на процеса по секвениране на ДНК може да бъде намерена на следните клипове, предоставени от *Illumina*:

<https://youtu.be/HtuUFUnYB9Y> ;

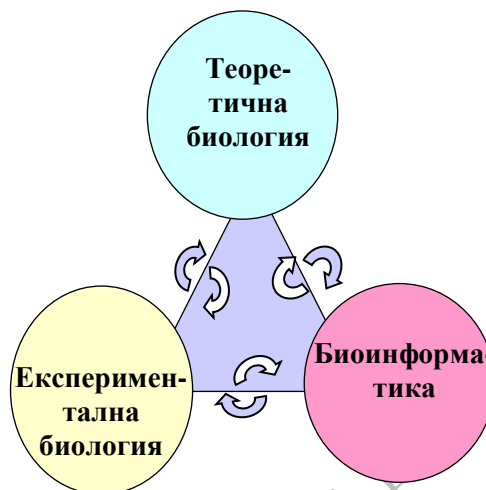
<https://www.youtube.com/watch?v=fCd6B5HRaZ8>.

След като приключи секвенирането на веригите ДНК и е налице известната вече последователност, следващата основна стъпка е биоинформатичната обработка на суровите данни и биостатистическият анализ на резултатите.

Какво е биоинформатика и за какво ни служи?

Терминът биоинформатика е определен за пръв път в университета Утрехт от *Ben Hesper* и *Paulien Hogeweg* като *IT* изследване на биологичните системи (*Hesper u Hogeweg 1970*), което в широкия смисъл (*sensu lato*) на думата означава разглеждане на биологичния свят като огромна информационна интегрирана система. Днес думата биоинформатика се използва по-често в по-строг смисъл (*sensu stricto*) като приложение на изчислителни техники (информатика) за анализиране на биологични данни.

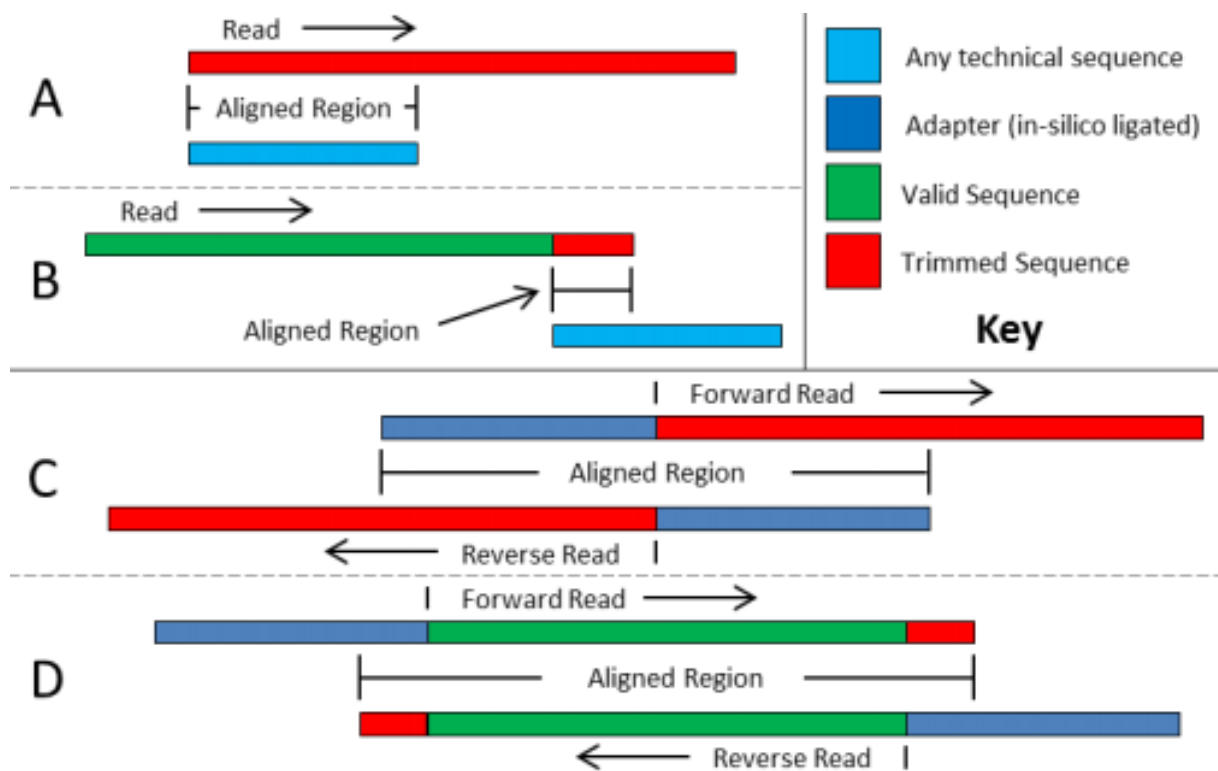
Биоинформатичните анализи често се извършват поетапно, като изходът от един анализ се използва като вход за следващия. Тези многоетапни, многофункционални анализи често се наричат "*pipelines*" и често се настройват да се изпълняват автоматично от 1 стъпка към следващата без да се въвеждат данни допълнително от потребителя. За по-сериозните еволюционни анализи или тези, свързани с проследяване на биодиверсията на видовете, се изискват доста сериозна изчислителна мощ, често Linux базирана операционна система и немалко сървъри за съхранение на огромните масиви от данни.



Биоинформатичният анализ се състои основно от **8 стъпки/етапи** (фигура) и често се означава като “*pipeline*”, тъй като стъпките преминават една в друга като поточна линия:

- 1) контрол на качеството на прочетената секвенция/цял геном;
- 2) определяне на референтни щамове/видове;
- 3) сравняване, четене и картографиране на референтната ДНК последователност и тази, която е секвенирана;
- 4) откриване на еднуклеотиден полиморфизъм (SNP), малка инсерция или делеция (индел) в секвенираната верига;
- 5) *de novo* „сглобяване“ на генома;
- 6) геномна анотация;
- 7) създаване на филогенетично дърво;
- 8) филогенетичен анализ.

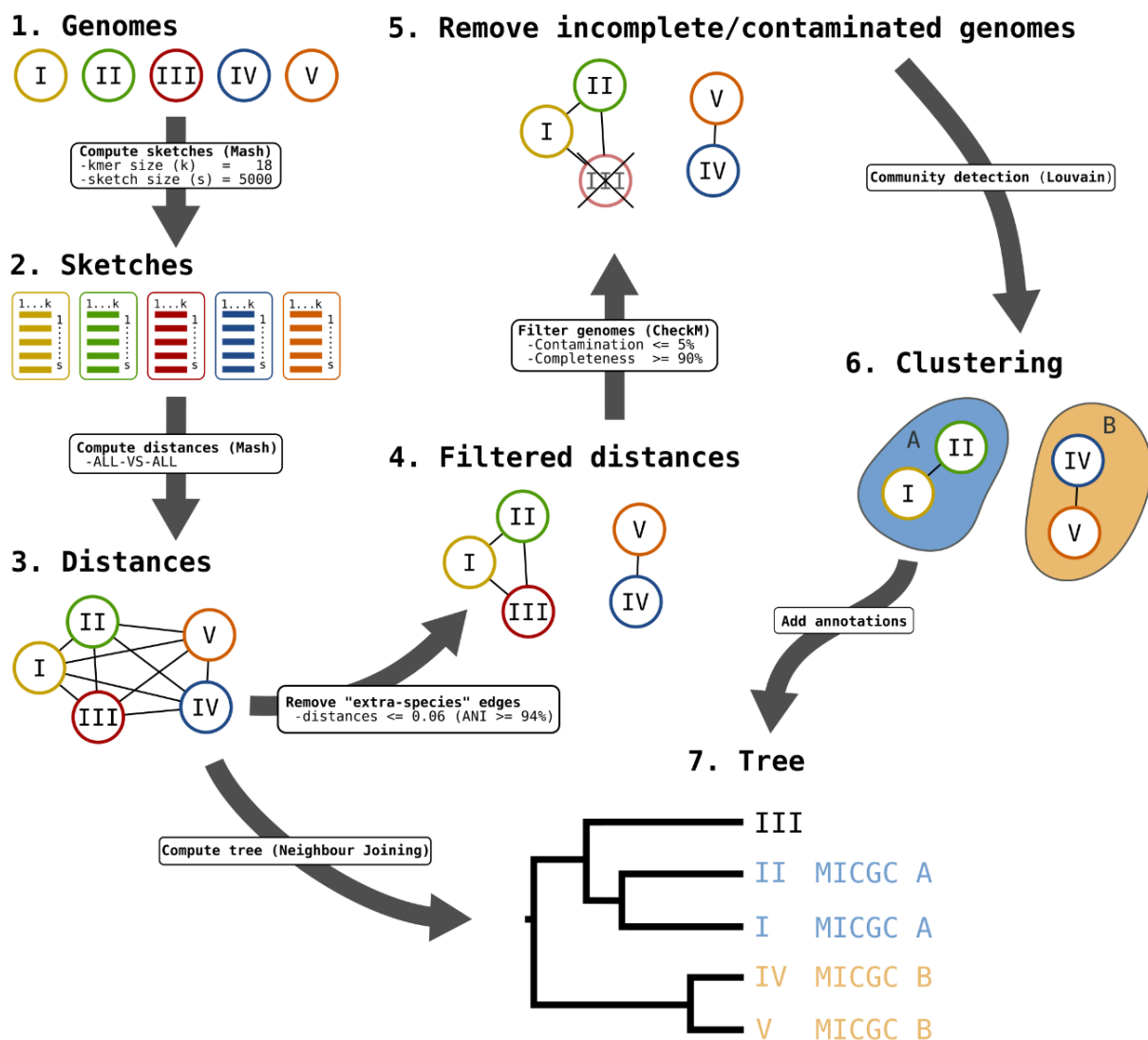
Макар че тези процеси са стандартизирани, съществуват различни софтуерни решения за съответните стъпки. Първата стъпка в почти всички биоинформатични анализи на пълното геномно секвениране (WGS) е контрол на качеството на суровите данни на секвенираната последователност. Важно е да се премахнат адапторните последователности и последователности, които са лошо копирани. Този етап е важен за последващо откриване на SNP. Инструмент като *Trimmomatic* например извършва контрол на качеството на секвентната последователност, премахва последователностите на адаптерите, отрязва нискокачествената ДНК последователност от началото или края на готовата секвенция, премахва последователности, които са по-къси или недобре копирани и валидира прочетената и коригирана пълна геномна последователност.



Фиг. 11: Схематично представяне на стъпките от процес 1) контрол на качеството на прочетената секвенция/цял геном

ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА ПО УРАГ

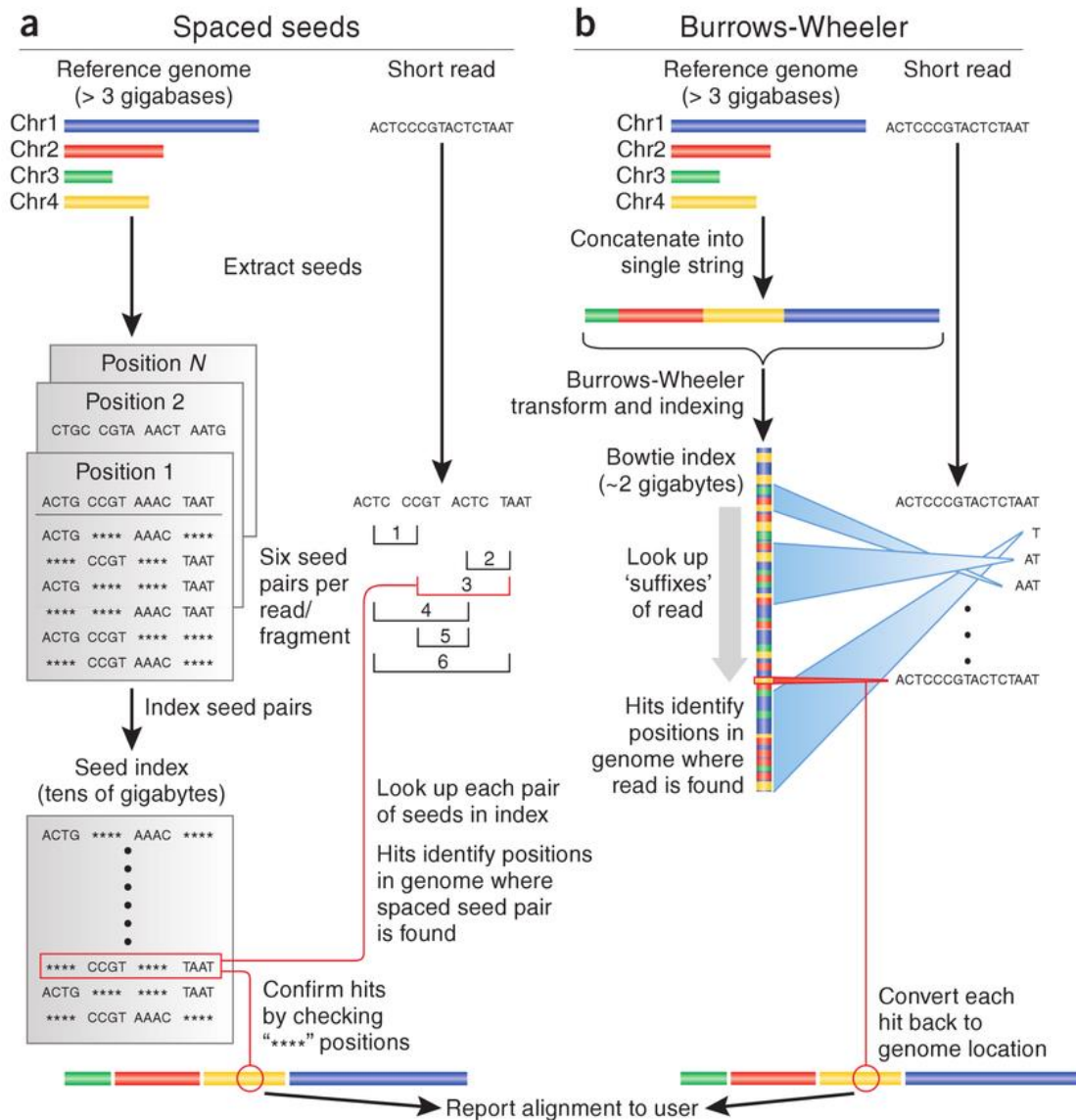
Втората стъпка в процеса на биоинформатичен анализ е сравняване на еталонна/референтна последователност и тази, която е секвенирана. Инструмент, например като *Mash*, позволява бързо сравняване на голям набор от последователности, генерирани спрямо референтния геном.



Фиг. 12: Схематично представяне на стъпките от етап 2) определяне на референтни щамове/видове; и 3) сравняване, четене и картографиране на референтната ДНК последователност и тази, която е секвенирана;

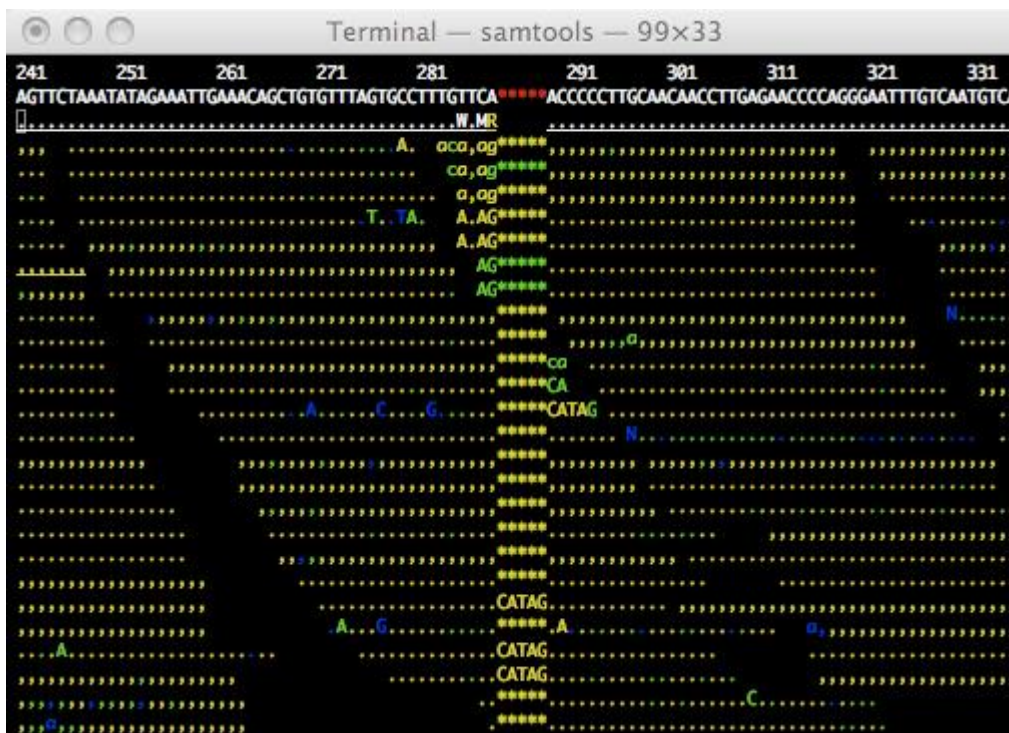
NCBI (National Center for Biotechnology Information) е една от най-богатите бази данни на референтни секвенции (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>), които биха могли да послужат за премерване на нуклеотидното разстояние, съпадаемостта между няколко генома и свързаността им.

След избиране на референтен геном или секвенция от базата данни следва сравняване и картографиране на различията между референтната и сравняваната секвенция или пълен геном. Двете секвенции се подравняват посредством друг софтуерен продукт, пример за такъв е *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)*.

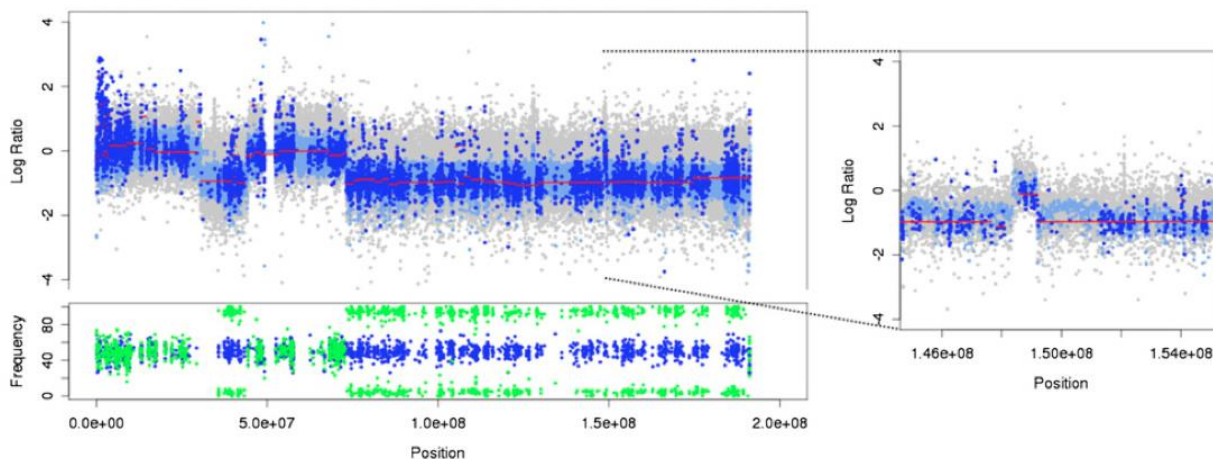


Фиг. 13: Схематично представяне на стъпките от „pipeline“ на софтуерен продукт *Burrows-Wheeler Aligner (BWA)* за подравняване на сравняваните последователности/цели геноми

Четвъртата стъпка в биоинформатичния анализ използва картографиране на последователността, четена към референтната последователност, за идентифициране на SNP, делеции и грешки. За тази стъпка биха могли да се използват инструментите *SAMtools* и *VarScan2*.



Фиг. 14: *SAMtools* визуализация на картографираната последователност



Фиг. 15: *VarScan2* визуализация на картографираната последователност

Специфични програмни продукти и софтуерни инструменти позволяват интерактивно преглеждане на големи геномни масиви от данни. Генетичен асемблер сглобява *de novo* пълния геном, вече подравнен към референтен такъв в шестата стъпка на процеса. Такъв софтуерен продукт е *SPAdes*. Този продукт включва няколко инструмента/модула:

- dipSPAdes - модул за сглобяване на силно полиморфни диплоидни геноми;
- metaSPAdes - модул за метагеномни набори от данни;
- plasmidSPAdes - модул за извличане и сглобяване на плазмидни геноми от WGS;
- rnaSPAdes - *de novo* асемблер за транскриптоми от RNA-Seq данни;
- truSPAdes - модул за сглобяване на баркодове от TruSeq.

Повече информация и документацията за софтуерния продукт може да бъде намерена на следният линк:

<http://spades.bioinf.spbau.ru/release3.11.1/manual.html>

Следваща по ред стъпка от биоинформатичния анализ е аотиране на получената геномна група, за да бъдат идентифицирани гени, кодиращи протеини, тРНК и рРНК. Съпоставянето на секвенциите е базата, върху която стъпват повечето от алгоритмите за геномна аотация, установяването на единични полиморфизми, определянето на процента на грешката от секвенатора, откриването на мотиви и т.н.

Алгоритмите *Smith-Waterman (S-W)* и *Needleman–Wunsch* са залегнали в почти всички варианти за съпоставяне. Съответно, най-широко приложение имат програмите FASTA и BLAST, като първата предлага локално, а втората – глобално сравняване. Използва се динамично програмиране, но само за тези секвенции в базата данни, които имат участъци, достатъчно сходни на изследваната секвенция. Методите, използвани за откриване на секвенции, които да отговарят на това условие, са изцяло евристични.

Алгоритъмът на *Smith-Waterman* е алгоритъм за търсене в база данни, разработен от *T.F. Smith* и *M.S. Waterman* въз основа на по-ранен модел, разработен от *Needleman* и *Wunsch*. Алгоритъмът *S-W* реализира техниката на динамично програмиране, която извършва подравнявания с всякаква дължина, на всяко място, във всяка последователност и определя дали може да има оптимално подравняване. На базата на тези изчисления с положителен знак се отбелязват точни съвпадения/замествания в секвенциите, а с отрицателен – делеции/инсерции. В матриците на алгоритъма резултатите се събират и се отчита най-високата степен на подреждане на нуклеотидите и подравняване на секвенциите.

Динамичното програмиране превъзхожда алгоритмите *BLAST* и *FASTA*, защото търси по-голямо поле от възможности, правейки го по-чувствителна техника. Въпреки това, процесите по изпълнение на алгоритъма забавят значително крайния резултат.

Вместо да се „инспектира“ цял геном наведнъж, алгоритъмът *S-W* сравнява отделни фрагменти с различни дължини, търсейки най-подходящия сегмент. Самият алгоритъм е рекурсивен по характер:

$$H_{ij} = \max\{H_{i-1, j-1} + s(a_i, b_j); H_{i-k, j} - W_k; H_{i, j-1} - W_1; 0\}$$

Например нека вземем последователността GAGTCGC и СТАТГСА, подравняваме ги и след това ги сравняваме.

G - A G T C G C -

r i m d m d m i

С Т А - Т - Г С А

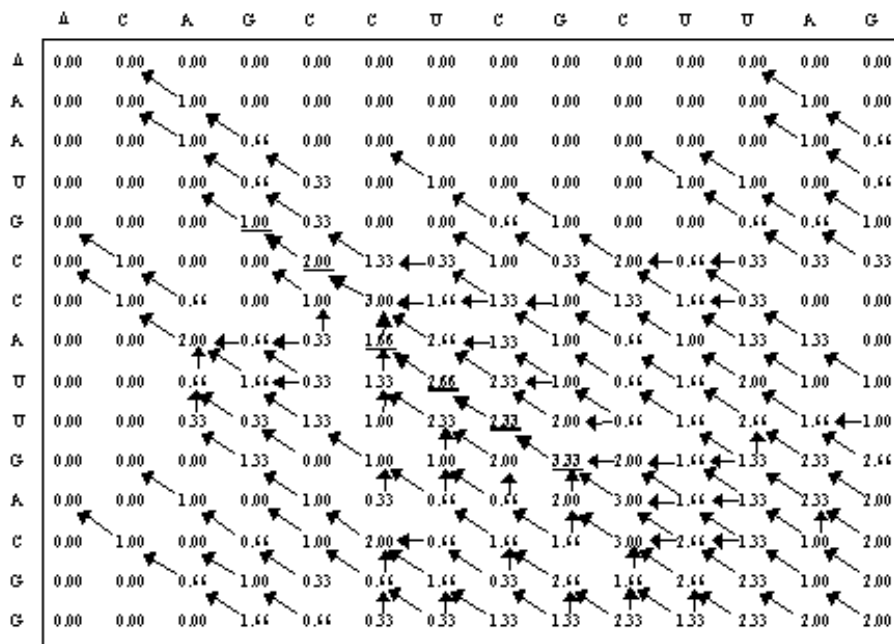
Където:

r = replacement = 1

m = match = 0

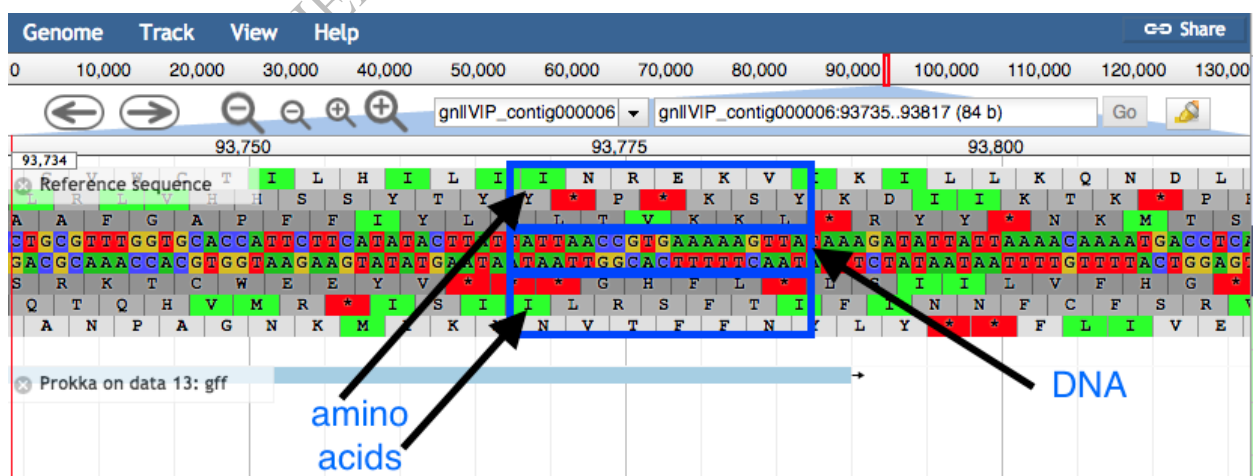
i, d = insertion/deletion = 1

Smith Waterman Scoring Matrix (matches=1; mismatches=-.33; single gap =-(1 + k/3); where k is the length of gap)



Фиг. 16: Изпълнение на алгоритъмът на *Smith-Waterman*

Платформа като *Prokka* се използва за аотиране на протеино-кодиращи гени, tRNA и rRNA. *Prokka* може напълно да анализира бактериален геном за приблизително 10 минути, като се използва пакет от съществуващи софтуерни инструменти и бази данни за последователности, като *UniProt* и *NCBI RefSeq*.

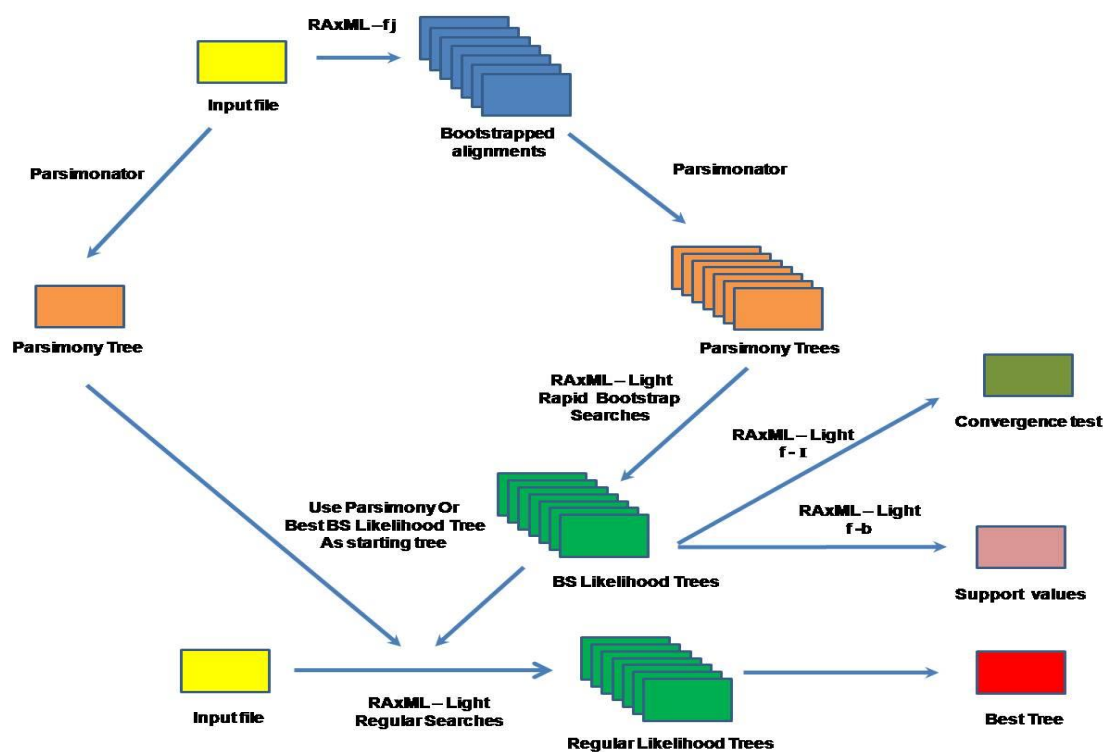


Фиг. 17: Изглед от платформата *Prokka*

След това се конструират на база избрани гени филогенетични дървета, които дават представа за свързаността на патогенните причинители. *RAxML* е пример за програма за

конструиране на филогенетични дървета, като използва големи масиви от данни чрез статистически техники за максимална вероятност на съвпадение на генетичните последователности на отделните сравнявани щамове.

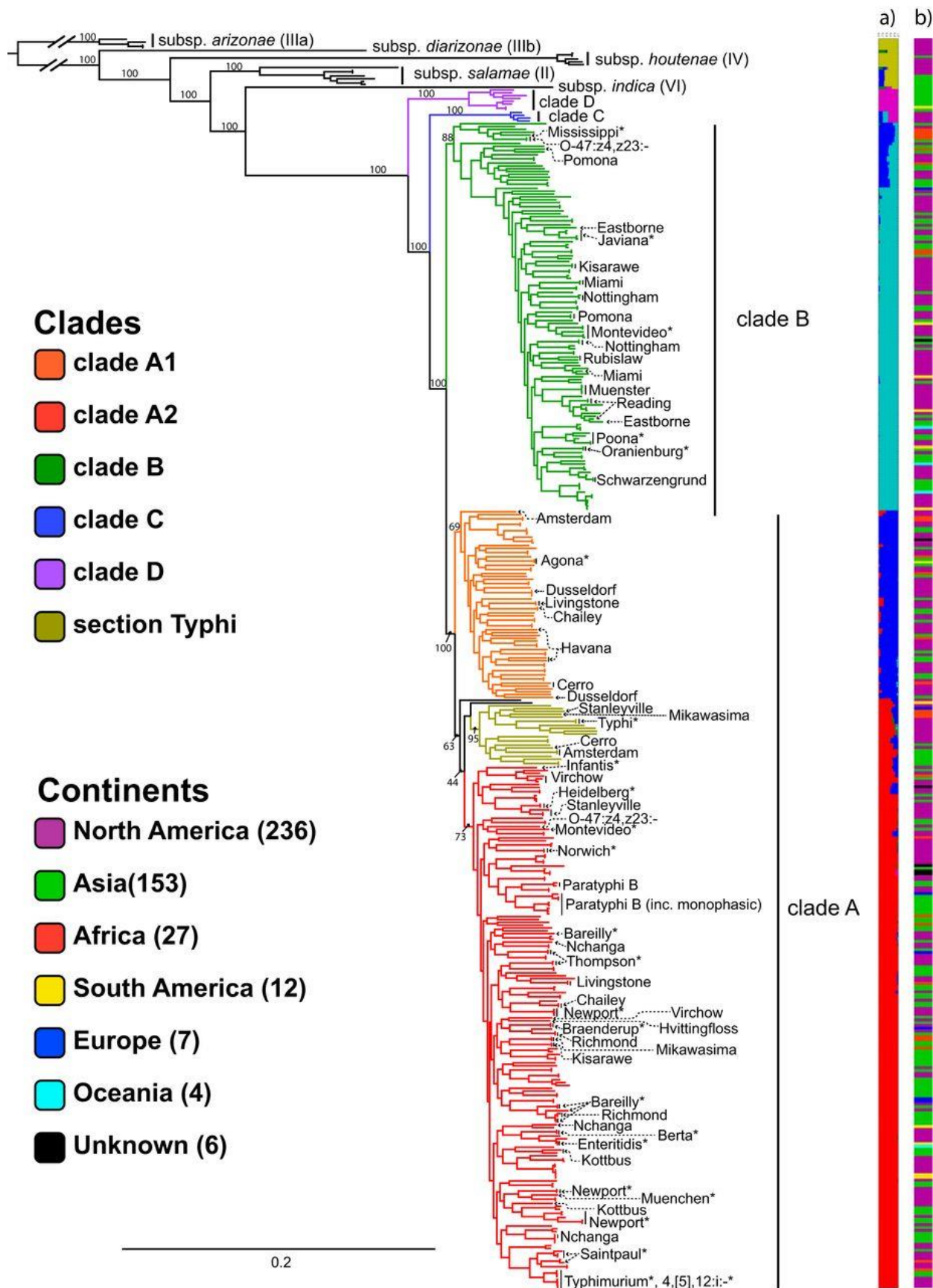
RAxML-Light Scripting



Фиг. 18: “Pipeline” на софтуерния продукт *RAxML*

Последната стъпка е филогенетичен анализ, даващ информация за еволюционните промени в гените на даден патоген, броя на заместените нуклеобазы в генома, степента на инвазивност на даден бактериален щам, вирулентност на вирусните щамове, пътят на постъпване на даден причинител в животинския или човешкия организъм както и степента на резистентност на бактериалните щамове спрямо антибактериални средства.

Фигура 19 показва филогенетичен анализ на *Salmonella Enterica*, базиран на пълен геномен секвентен анализ, и произхода на всеки изолат, обозначен с цвят: Африка – червено; Азия – зелено; Европа – синьо; Северна Америка – лилаво; Южна Америка – жълто; Океания – циан; неизвестен произход – черен, както и взаимовръзката между изолатите.



На фиг. 19 ясно са оформени две основни линии: клон А и клон Б. Клон А основно обединява щамове, инвазивни за хората като *Typhi*, *Typhimurium*, *Newport* и *Enteritidis*. Клон Б е филогенетично различен и е признат като представящ профила за инвазивност на този бактериален щам и метаболитно активните му гени.

Пример за секвениран пълен геном на *Campylobacter jejuni* и информация за izolata може да бъде намерена на следният линк:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/AL111168.1>

Някои бази данни, които се използват в биоинформатиката за анализ на секвенции:

EMBL ND: <http://www.embl-heidelberg.de/>
GeneCards N: <http://www.genecards.org/>
PDB P D: <http://www.rcsb.org/pdb/Welcome.do>
SCOP P: <http://scop.berkeley.edu/>
CATH P: <http://www.cathdb.info/>
PIR P W: <http://pir.georgetown.edu/>
SWISS-PROT PW: <http://www.expasy.org/sprot/>
TrEMBL PW: <http://www.expasy.org/sprot/>
Homstrad PW: <http://tardis.nibio.go.jp/homstrad/>
InterPro P: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/>
NR P W: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db>
Pfam P: <http://pfam.sanger.ac.uk/>
UniProt P: <http://www.expasy.uniprot.org/>
PROSITE P W: <http://www.expasy.org/prosite/>
PRINTS P: <http://umber.sbs.man.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/>
BLOCKS P: <http://blocks.fhrc.org/>
STRING P: <http://string-db.org>
DAVID O: <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>
ChEMBL O: <https://www.ebi.ac.uk/chembl/>
PubChem O: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

Бази данни, които се използват в биоинформатичния анализ на бактериални геноми:

- NCBI Genome Project database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj>
- NCBI, Bacteria Genome Database: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>
- Bacterial Genomes at The Sanger Institute: <http://www.sanger.ac.uk/Projects/Microbes/>
- TIGR Comprehensive Microbial Resource (CMR): <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>
- GOLD: Genomes On Line Database: <http://www.genomesonline.org/>
- Microbial Genome Database for Comparative Analysis (MBGD): <http://mbgd.genome.ad.jp/>
- Virulence Factors of Bacterial Pathogens (VFDB): <http://zdsys.chgb.org.cn/VFs/main.htm>
- Genome Information Broker: <http://gib.genes.nig.ac.jp/>
- Islander, Database of Genomic Islands: <http://www.indiana.edu/islander>
- GenoList genome browser at Institute Pasteur: <http://genolist.pasteur.fr/>
- IslandPath: <http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandpath/update/IPindex.pl>
- HGT-DB: <http://www.tinet.org/debb/HGT/>
- E. coli genome project: <http://www.genome.wisc.edu>

Биоинформатичните анализи могат да бъдат извършени на обикновен лаптоп или на Linux базирана машина, потребителят може да има малко опит в биоинформатиката или да бъде професионалист.

С увеличаването на обема на данните за секвенциите и разработените разнообразни софтуерни продукти за обработка на геномните последователности, става реалност осъществяването на връзката между фенотипа и генотипа. „Предопределянето” *a priori*, че един микроорганизъм може да бъде резистентен към антимикробни средства или може да бъде силно вирулентен вирусен щам на база генотипиране, значително би подобрило здравеопазването, мониторинга на заболяванията, следенето на епидемиологичната и епизотологичната обстановка, и би помогнал за определяне на приоритетната борба с нововъзникващите огнища.

Чрез използване на молекулярнобиологични анализи могат да бъдат изследвани гените, отговорни за антимикробната резистентност и тяхната еволюция, да бъдат проследени почти всички мутации в реално време, които са свързани с новопридобити гени за резистентност или нови мутации, водещи до резистентност.

Секвенционният анализ от ново поколение *NGS* (*new generation sequencing*) е революционен подход в общественото здраве и във ветеринарната медицина. *NGS* не само замества *PFGE*, но има потенциал да замени и традиционното тестване върху култури. Метагеномното секвениране и анализ осигуряват способността бързо да бъдат идентифицирани група патогени, без да се прилага какъвто и да е вид селекция.

За и против пълният геномен секвентен анализ:

• Pros and cons на платформите/технологиите за секвентен анализ

Платформа	Плюсове	Минуси
Секвениране посредством синтез		
<i>Illumina</i>	Технология, широко използвана в индустрията при пълен геномен секвентен анализ; по-ниска цена на Gb; най-висока производителност; широка гама от машини на <i>Illumina</i> , подходящи за множество приложения и изисквания; най-ниски проценти на грешки.	Рехибридизация на шаблонни ДНК и нисък добив на копия по време на бридж амплификацията; използване на модифицирани ДНК полимерази по време на бридж амплификацията; непълно удължаване на базите (фазиране, префазиране); най-къси дължини за четене; дълги последователности в един ход; високи разходи за инструментариум; няма достъп до данни в реално време.
Секвениране на единична молекула в реално време		
<i>Pacific Biosciences</i>	Бързи цикли на секвениране; дълги четения, подходящи за сглобяване на геноми и завършване на геномно асемблиране; възможност за получаване на информация за епигенетичната последователност; регистриране на инкорпориране на базите в реално време.	Възможни грешки при регистриране на инкорпорирането на нуклеобазите по време на секвенирането; най-голям „ <i>footprint</i> “ на инструмента; ниска мощност на изпълнение; високи проценти на грешки.

Платформа	Плюсове	Минуси
<i>Oxford Nanopore Technologies</i>	Бърз процес на секвениране, най-дълги прочетени последователности; най-малкият инструмент за секвентен анализ; ниски разходи за поддръжка и консумативи; регистриране на инкорпорираните нуклеобазии в реално време; подаване на готовите данни в реално време; подходящ апарат и за теренна работа.	Чувствителност на биологичните нанопори към промени в околната среда; най-висок процент грешки от всички платформи; работата на машината <i>PromethION</i> не е експериментално валидирана.

Таблица. 1: Плюсове и минуси на най-разпространените технологии за секвентен анализ

Както е показано в таблица 1 **технологията на секвентен анализ на *Illumina*** все още е най-широко използваната за пълен геномен секвентен анализ (WGS) към днешна дата и изглежда, че е най-подходяща (претегляйки плюсовете и минусите) за **изследване на огнища на заболявания, при хранителни взривове** и др., при които се дава приоритет на високата точност и надеждност на резултата. Благодарение на добре установената си позиция на пазара, *Illumina* е разработила богат набор от инструменти, които се стремят да отговарят на различни изисквания и диагностични възможности в секвентният анализ. Недостатъци на тази технология са сравнително кратките прочити на последователности, които затрудняват разчитането на локуси с голям процент повтори, както и възможност за непълни/неправилно прочетени бази (фазиране и префазиране), които недостатъци увеличават процента на окончателните грешки. Високата аналитична производителност на повечето софтуерни инструменти на *Illumina* увеличават общото време на работа, което е особено съществен недостатък, поради факта, че при хранителни взривове и възникнали огнища на инфекции, анализа на патогените причинители и бързото диагностициране на причинителя са жизнено важни фактори, засягащи успешния контрол на заболяванията и съвременните действия за преодоляване на тези инфекции. И накрая, сравнително високите разходи за секвенаторите на *Illumina* предполагат потенциално застрашаване на бюджетните проекти и невъзможност за поддръжка на тази апаратура и снабдяването и с консумативи.

Pacific Biosciences предлага разработена методика за пълен геномен секвентен анализ с висока скорост на секвениране и е най-подходяща за **бързото потвърждаване на конкретен патоген**. Дългите прочети от апаратите на *PacBio* осигуряват достатъчно покритие за бактериални геноми и са идеални за секвениране и анализ на пълен геном, характеристика, която може да бъде особено полезна, когато първия идентифициран шам на огнището е секвениран и се използва като референтен. Ниската точност на методиката кара системата *PacBio* да бъде по-подходяща за потвърждаване на идентичността на даден патоген чрез секвениране на генома, а не самостоятелен инструмент за анализ на патогени.

За болници с ограничени финансови и пространствени възможности или просто в ситуации, в които е желателно бързото секвениране да е достъпно на момента, или при работа на терен, *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* предлага обещаваща алтернатива. В момента *ONT* предлага **единственото наистина мобилно устройство за секвениране**, което позволява висока гъвкавост и достъпност. С най-ниските разходи за консумативи, инструментът *MinION* е икономично решение за **болнични среди или при работа с теренни проби на място**. С най-дългите секвенции, които могат да бъдат прочетени, *ONT*, доказват, че тази техника е най-подходяща за потвърждаване на идентичността на патогена,

осигурява достатъчно покритие на бактериалните геноми и може да се наблюдава в реално време. Усъвършенстването на техниката на секвениране, основаваща се на нанотехнологии, е в непрекъснато развитие и от въвеждането на тази методика са постигнат голям напредък.

• **Плюсове и минуси на софтуерните инструменти за биоинформатичен анализ след пълно геномно секвениране:**

Биоинформатичните инструменти представляват широк спектър от софтуерни приложения за различните етапи на работния процес на **анализ на патогенните причинители посредством WGS**, а предимствата и ограниченията на всеки инструмент са описани в Таблица 2. За всяка стъпка от WGS софтуерните инструменти се разделят на *web-based* и *command-line based* инструменти, както и готови софтуерни продуктови пакети.

1. Цената и обхватът на приложение на повечето **готови софтуерни пакети** в много случаи надхвърля необходимостта и достъпността на тези продукти за по-малки болнични и лабораторни бази. В тези конкретни случаи, инструменти тип *open-source* за анализ могат да бъдат добра алтернатива на комерсиалните софтуерни пакети.

2. Стратегията за „Едно здраве“ и глобалния мониторинг и управление на епидемиите могат да са успешни само ако данните от WGS могат да бъдат споделени, съхранени и най-важното, събрани в подходящи бази данни, достъпни навсякъде по света. Като се има предвид, че много епидемии са от части на света, където здравето и здравните ресурси са ограничени, какъвто е примера с огнище на вируса на Ебола, болниците и лабораториите могат да внедрят *command-line based* инструменти за анализ без да са базирани на специфичен интерфейс.

3. *Command-line based* инструментите за анализ често позволяват по-голяма свобода при прилагането на специфични видове анализи, отколкото тези *web-based* инструменти и софтуерни пакети. Тези *web-based* инструменти имат предимството, че могат да бъдат *cloud* базирани или информацията да се съхранява на виртуални сървъри и така тя да бъде достъпвана от всяка точка по света.

Таблица 2: Плюсове и минуси на аналитичните софтуерни инструменти при биоинформатичния анализ

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
Асемблиране			
Velvet	Web based	Проектиран за четене и анализ на многобройни повтори в генома; автоматично настройване на параметрите за контрол на качеството; подробна документация; Web-базирана достъпност	Малки N_{50} contig size участъци; Малък размер N_{50} ; специфики на технологията; изключва покриване на ниски <i>cutoff</i> ; използване на голяма памет; подходящ само за четене на кратки участъци

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
IDBA-UD	Command line based	Проектиран за многобройни повтори в генома с различни дължини на последователностите; най-нисък процент употребена оперативна памет; корекция на грешки след всяка итерация за контрол на качеството	Технологично специфичен; няма подходяща документация; подходящ само за кратки прочити
RAY	Command line based	Хибридна платформа, подходяща за асемблиране на множество секвенции; детерминиране на дължината на секвенирания участък, което повишава качеството на прочетената последователност; автоматизирано изчисление на специфични параметри; подробна документация	Малки N_{50} contig size участъци; лошо представяне на секвенциите и лошо качество на прочетената последователност; подходящ само за четене на кратки участъци
SPAdes/hybridSPAdes	Web based	Хибридна платформа, подходяща за асемблиране на множество секвенции; детерминиране на дължината на секвенирания участък – пригодена за четене на дълги и къси последователности; най-ниско ниво на употреба на оперативна памет; може да попълва дупки по секвенцията и да поправя излишни повтори по дължината; изчислява и мери contigs; подробна документация	Най-дълго време за компютърна обработка
Minimap/miniasm	Command line based	Най-краткото компютърно време за обработка на секвенции; възможност за комбинация с различни работни процеси когато е превключен на режим RAF; подробна документация;	Технологична спецификация; няма опция за поправяне на грешки по продължение на секвенцията; след корекция на графиката липсват припокривания и несъответствия; подходящ само за четене на дълги секвенции

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
Canu	Command line based	Дълги N_{50} contig; подробна документация; включен коректор на прочетената секвенция с цел отстраняване на фоновия шум за подобряване качеството на секвенциите	Дълго време за компютърна обработка; много голям процент използвана оперативна памет; пригодена само за дълги последователности
Геномно характеризирание и идентификация			
KmerFinder	Web based	Не се изисква опит в биоинформатичния анализ; лесен за употреба; лесна интерпретация на output файлове; вкарване като input файлове сурови данни за секвенциите или contig последователностите; способен да открива контаминация на пробите	Методът трябва да бъде правилно конфигуриран; не се извършва сглобяване на отделните секвенирани участъци в една цяла верига
NCBI BLAST	Web based	Най-голямата в света база данни, комбинация от много и различни по-малки бази данни; много налични инструменти към платформата	Интерпретацията на резултатите може да бъде трудна; необходими са познания по платформата BLAST
MLST Web server	Web based	Прост работен процес <i>online</i> ; не са необходими познания по биоинформатика и статистика	Пригодена е за обработка на проби само от един биологичен вид; приема и обработва кратки секвенции само от Illumina, Roche 454, Ion Torrent, SOLiD;
PathoScope 2.0	Command line based	Способна да открива контаминанти; извършва качествен контрол на суровите данни от секвенатора; пълен работен процес с минимална компютърна намеса; пълна и подробна документация на софтуера;	При тестване на многоверижни проби на един биологичен вид, може да доведе до пропуск на някои от веригите; за почти идентични ДНК вериги е необходимо покритие от > 20%, за да се направи разграничение между тях; дълго време за изчисления
Анотация			

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
RAST	Web based	Web достъпна; KEGG връзка; графично представяне	Дълго време за изчакване; трябва да бъдат изпратени данни до сървъра
PROKKA	Command line based	Кратко време на компютърна обработка; паралелна анотация посредством 5 инструмента, извършващи операциите паралелно; подробна спецификация на софтуера	Намалена производителност на анотацията с недоизследвани или сурови данни от геноми; подходящи само за изследване на проби от отделни видове
Вирулентност			
VirulenceFinder	Web based	Лесен за употреба; бързи резултати; контрол на параметрите; възможност за въвеждане на сурови необработени секвенции или contig input	Невъзможност за откриване на SNP-базирана вирулентност; възможно тестване само на определени групи биологични видове
VFDB	Web based	Разширен достъп до информация; повече маркери, свързани с вирулентността, отколкото в VirulenceFinder	Функцията за откриване на маркери за вирулентност не е лесна за използване; не е в състояние да открие свързаната с SNP вирулентност
Антимикробна резистентност			
ResFinder	Web based	Бързи резултати; контрол на параметрите; възможност за въвеждане на необработени секвенции или contig input	Невъзможна детекция на SNP-базирана резистентност; невъзможност за откриване на <i>ampC</i>
RGI/CARD	Web based	Може да открива резистентност, базирана на SNP; присъединяване №. възможност за въвеждане на необработена последователност или входяща информация; достъп до информация за антибиотичната резистентност; BLAST базиран графичен изглед	Ограничен размер на подаваната информация (<20 Mb); невъзможност за въвеждане на сурови необработени секвенции

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
PlasmidFinder	Web based	Необработени секвенции или въвеждане на contig	Ограничена база данни; детектира основно плаزمиди и не включва обследване и анализ на антимикробната резистентност
CGE BAP	Web based	Пълен набор от инструменти за геномно характеризиране; лесен за употреба	Необходимост от регистрация за достъп; дълго време за компютърна обработка на данните;
Сравнителна геномика			
PubMLST	Web based	Създава източник за MLST и cgMLST като набор от гени, използвани за типизиране; изградена на BIGSdb, което я прави локално инсталируема; всички бази данни могат да бъдат изтеглени; Потребителят може да добавя секвенции в базата данни	Намиране на коректните данни може да бъде сложно; данните от тази платформа са публично достъпни
CSI Phylogeny 1.4	Web based	Възможно въвеждане и обработка на сурови данни; hqSNPs при избиране на SNPs според специфични критерии; много от параметрите могат да бъдат настроени	Сравняване единствено с референтни геномни секвенции; не би могло да бъде използван от непрофесионалисти без познания по биоинформатика
NDtree 1.2	Web based	Четене на сурови данни и възможност за въвеждане на необработени секвенции, което прави възможно стъпката на асемблиране; лесен за употреба; използване на референтни секвенции, използвайки KmerFinder	Методологията на инструмента не е комбинируема с други платформи или инструменти; фиксирани параметри; изтичане на информация и лошо написана документация към инструмента; сравняване на секвенциите само с референтни такива
kSNP3	Command line based	Много бърз метод; автоматично пропуска региони с голямо струпване на мутации; лесно мащабируеми данни; възможно е да се направи	Възможно е комбиниране с други платформи и софтуерни продукти; точността на обработка е сравнително ниска; няма hqSNP метод;

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
		всичко; работи със сурови данни за последователността и / или contigs като входни данни	необходими са познания по биоинформатика
Roary	Command line based	Контрол за неправилно прогнозиране на протеинови последователности; подробно ръководство за употреба; изграждане на пангеном	Входните данни трябва да са contigs; бавна компютърна обработка и голям обем генерирани данни;
Pan-Seq	Command line and Web based	Минимална намеса на оператор;	Входните данни трябва да са contigs; няма данни за скоростта и точността на изчисленията
Lyve-SET	Command line based	Разширено SNP филтриране (hqSNP); налице е възможност за обработка на клъстер	Може да бъде твърде консервативен при анализ на SNP; възможно е сравняване само с референтни секвенции; необходими познания по биоинформатика
SPANDx	Command line based	Повече инструменти за проверка на грешките, филтриране и избор на варианти при контрол на качеството (hqSNP); завършване на работния процес от необработени данни до сравнителен анализ; бърза визуализация чрез автоматично генерирани матрици за присъствие / отсъствие и коригирани от грешки SNP и индел матрици; работи със сурови последователности като входни данни	Само сравняване с референтни секвенции; задължителни познания по биоинформатика
Филогенетичен анализ			
RAxML	Command line	Позволява стандартно стартиране без необходимост от настройка на параметри; бързо стартиране на процеса и	Най- дълго компютърно време за обработка; най-висока точност и прецизност; много скъп софтуерен пакет

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
		изчисляване на SH-стойности за качествен контрол; CAT и тест Shimodaira-Hasegawa за контрол на качеството; цялостен работен процес; подробно ръководство; Наличен GTR модел	
FastTree	Command line	Най-кратко време за изчисление и компютърна обработка; CAT и тест Shimodaira-Hasegawa за контрол на качеството; наличен GTR модел; подробно ръководство; възможност за оптимизиране на модела; повечето модели са достъпни за всички филогенични методи;	Най-ниска точност и прецизност на филогенетичните дървета
MrBayes	Command line	Възможна оптимизация на модела; повечето модели са достъпни и съвместими с други филогенетични методи; подробна документация към инструмента; GTR модел	Input и output формати в NEXUS; комплицирана употреба на продукта
Пълни софтуерни програми за анализ на инфекциозни огнища			
BioNumerics 7.6.2	Local suite	Лесен за употреба; възможна оптимизация според потреблението; модификация на схемата; wgMLST; cgMLST; rMLST;	Отделни модули са необходими; няма клъстериране
Ridom SeqSphere+	Local suite	Лесен за употреба; поддържа клъстер формат; <i>ad hoc</i> схеми са възможни; cgMLST; wgMLST	Когато има много проби/секвенции софтуерът може да е доста бавен при обработка; по-малко схеми са възможни от BioNumerics
NCBI Pathogen Detection (beta)	Web-based suite	Свободен за употреба; директна връзка към патогенни причинители в храни и възникващи/възникнали взривове; възможно	Необходима регистрация; фокусирана основно върху патогени в храни; данните са публично достъпни; доста времеемко е регистрирането на нови проби или генетични

Алгоритъм	Тип интерфейс	За	Против
		споделяне на данни; съхранява колекции от ДНК последователности или цели геноми	последователности или патогенни причинители; непригодна за употреба при болнични условия и получаване на резултати в реално време

Приложения на пълния геномен секвентен анализ:

- анализ на геномната архитектура на микроорганизмите;
- изследване на генетиката на макромолекулните взаимодействия;
- анализ на механизмите на резистентност, гените, отговорни за антимикробната резистентност, факторите на предаване на инфекцията;
- анализ на вирулентност и механизмите на предаване на вирусните причинители и гените, отговорни за вирулентността;
- бърза диагностика и своевременни мерки при хранителни взривове и епидемии
- изследване на биоразнообразието на патогенните причинители и техните геноми;
- анализ на ролята, която играят геномната пластичност и динамиката на геномните реасортации при появата на нововъзникващи микробни патогени;
- изследване и анализ на еволюцията на патогенните причинители на база техният геном;
- епидемиологичната и эпизоотологичната ситуация и механизмите на разпространение на патогените и пътищата на предаване на инфекциите;
- обследване и разработване на нови стратегии и мониторингови програми за наблюдение и справяне с патогенните причинители на инфекции при хора и животни;
- оценка на риска за общественото здраве, здравето на животните и растенията, както и оценка на риска от циркулация на патогенни агенти в околна среда и води;
- проучване на еволюционните механизми на моделиране процесите на колонизация на нови гостоприемници, принадлежащи към различни филогенетични единици – вид, род, семейство и др.;
- извършване на баркодинг на различни биологични видове и класифицирането им на база геномният секвентен анализ;
- геномиката и в частност пълният геномен секвентен анализ би могъл да спомогне създаването на нови лекарства и терапевтични средства във фармацевтичната индустрия;
- WGS би могъл да бъде особено полезен при прогнозиране на епидемичния потенциал на значими патогени като *Vibrio cholerae* O1 CTX+, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Listeria* sp. и други;

- Посредством WGS би могла да бъде създадена световна база данни на патогенните причинители с обществено достъпни пълни геномни карти на патогените и характеристика за тях (подобно на паспорт или педигре при животните);
- създаване на система за наблюдение на целия геном в реално време, което би довело до подобряване на колаборацията между всички лаборатории и институции, ангажирани с мониторинга и изследването на патогените; този подход би могъл да бъде от полза за мониториране на патогенните причинители в храни и фуражи;
- изследване и анализ на еволюцията на антимикуробната резистентност на бактериите и тенденциите за в бъдеще в клиничната практика и терапия;
- изследване на генни дупликации и редукции, делеции и мутации в генома на бактерии и вируси;
- създаване на нови ваксини и ваксинални планове;
- проследяване на адаптивността на патогените към околната среда, степента на вирулентност и инфекциозност;
- откриване на нови метаболитни пътища и защитни механизми на патогенните микроорганизми;
- Сравнението на геномните последователности разкрива много информация за структурата и еволюцията на генома, включително значението на латералния трансфер на гени;
- Пълният геномен секвентен анализ на патогенните причинители би могъл да спомогне за прогнозиране пътя на постъпване на патогенния причинител, сезонността и картографиране на пътищата на разпространение на патогените;
- WGS би могъл да даде яснота за сезонността на поява на заболявания или екологичните фактори, влияещи на епизоотичната или епидемиологичната обстановка;
- Секвентният анализ от ново поколение (NGS) осигурява възможност за наблюдение на целия геном в реално време и генериране на глобална база данни на секвенираните геноми на патогенните причинители;
- Проследяване на еволюцията на патогенните щамове;
- Проследяване на еволюционните промени в генома на патогенните причинители по отношение антимикуробна резистентност (AMR);
- Не на последно място WGS би могъл да подпомогне пренаталната диагностика и откриване на генетични малформации в плода;
- Секвентният анализ от ново поколение би спомогнал ранното диагностициране на рака и откриването на гените, отговорни за възприемчивостта на пациента;
- В криминалистиката WGS е от огромна полза;

Тестването на антибиотичната резистентност на патогенните бактерии посредством пълен геномен секвентен анализ отстранява все повече традиционните методи на култивиране на микроорганизми, където отчитането се осъществява след минимум 72 часа, съпоставено с WGS, при който резултатът е налице след няколко часа в зависимост от изборния СОП (стандартна оперативна процедура). Тази информация за патогенния микроорганизъм е клинично важна при предприемане на антибиотична терапия или

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
 тел. 02/4273056

замяната ѝ с алтернативни методи на лечение. Секвенираните геноми на патогенните бактерии могат да бъдат изследвани за наличието/отсъствието на гени, отговорни за антибиотична резистентност, а също така и хромозомни мутации, които допринасят за резистентността към антимикробните средства.

Все пак WGS-базираният подход при установяване на антибиотична резистентност на бактериите не може все още напълно да замени конвенционалните методи поради все още високата цена на изпитването, специфичните изисквания към китове и консумативи за реакциите, постоянно нововъзникващи гени, кодиращи резистентност при бактериите и времеемкостта поради тежестта на софтуерните пакети, визирайки тези на Illumina, но това не пречи поетапно и системно WGS да бъде внедрен като стандартен метод, както се предвижда до няколко години.

Name (link)	Type of organisation/project	Goal
ECDC (www.ecdc.europa.eu/)	EU health agency	Communicable disease surveillance and risk assessment
EFSA (www.efsa.europa.eu/)	EU health agency	Food safety monitoring and risk assessment
EMERGE (http://www.emerge.rki.eu/Emerge/EN/h)	European Commission body working in conjunction with EU Member States	Laboratory preparedness and response
PathoNGenTrace (www.patho-ngen-trace.eu/)	EU research project (2012-16)	Bioinformatics solutions for WGS-based diagnostics and surveillance of bacterial pathogens
COMPARE (www.compare-europe.eu/)	EU research project (2014-19)	Bioinformatics solutions and WGS-based data exchange platform for diagnostics, research, surveillance and risk assessment of bacterial and viral pathogens
CDC (www.cdc.gov/)	US health agency	Surveillance and risk assessment; global FWD network (PulseNet International)
GMI (www.globalmicrobialidentifier.org)	Global scientific collaboration initiative	Development of WGS data exchange and analysis tools for diagnostics, research, surveillance and public health response
ESGEM (https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/epidemiological_markers/)	ESCMID study group	Collaborative research, evaluation, standardisation and recommendations on microbiological typing systems

Фиг. 20: Организации, проекти и стратегии, подкрепящи и участващи във внедряването на пълния геномен секвентен анализ в рутинната диагностика на инфекциите и в опазването на общественото здраве

Като пример за постигнат **важен напредък в прилагането на WGS** е откриване на хромозомни точкови мутации, на които се дължи все по-нарастващият процент **резистентност на *Mycobacterium tuberculosis***, установени посредством пълен геномен секвентен анализ (През 2015 г. са докладвани около 480 000 нови случая на мултирезистентни туберкулозни бактерии и още 100 000 случая на резистентни на рифампицилин *M. tuberculosis*). WGS-диагностиката и тестването на чувствителността на *M. tuberculosis in silico* е със 7% по-евтино и с 21 дни по-бързо от традиционното изследване. Едно скорошно проучване показва, че чрез секвентен анализ на генома на *M. tuberculosis* на ДНК, която преди това е била изолирана от респираторни проби, идентифицирането на патогена може да се постигне за 44 часа.

Какво са постигнали по света? Къде сме ние?

Примери от света (източник: Joint scientific conference Anses/BfR/DTUFood/NIFDS - Foodborne pathogens & whole genome sequencing: impact on public health protection

<https://www.anses.fr/fr/content/protection-de-la-sant%C3%A9-publique-impact-dus%C3%A9quen%C3%A7age-complet-des-g%C3%A9nomes-des-pathog%C3%A8nes-d>):



Genomic insights into the epidemiology and surveillance of *Vibrio cholerae* O1 infections

François-Xavier WEILL, MD, PhD
Enteric Bacterial Pathogens Unit
Infection & Epidemiology Department



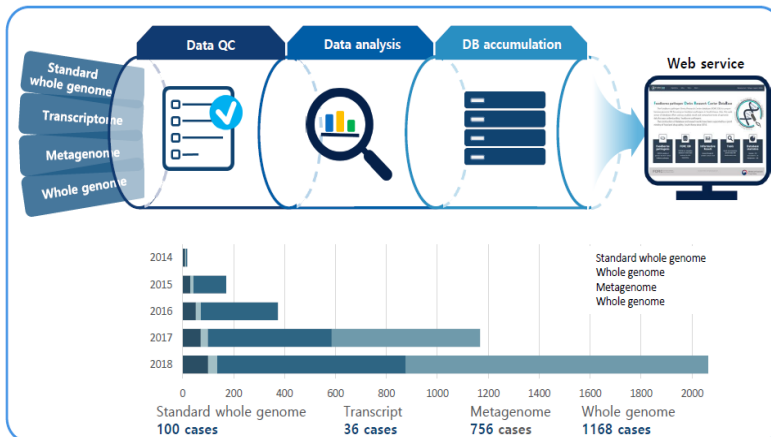
Genetic variety of food and veterinary isolates of *Listeria monocytogenes* in Latvia



Irēna Meistere*, Baiba Vilne, Juris Kibilds, Žanete Šteingolde, Jelena Avsejenko, Aivars Bērziņš
Research Institute of Food Safety, Animal Health and Environment «BIOR»
Leļupes Str. 3, Riga, Latvia LV-1002 *irena.meistere@bior.lv

Establishment of Genome DB

- ✓ Establishment of genome DB: identify and analyze genome-level information on foodborne pathogens that are found in domestic food.



healthy all life long

NGS-based workflow to improve the detection of antimicrobial resistance: from wet-lab to data analysis

Bas Berbers^{1,2}, Assia Salykova^{1,2}, Pieter-Jan Ceysens³, Cristina Garcia-Graells⁴, Kevin Vanneste¹, Nadine Botteidoom⁴, Nancy Roossens¹, Kathleen Marchal^{2,5}, Sigrid C.J. De Keersmaecker¹

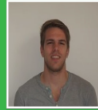
¹ Transversal activities in Applied Genomics (TAG), Sciensano, Brussels; ² Department of Information Technology iDLab, Ghent University, IMEC, Ghent; ³ Human Bacterial Diseases, Sciensano, Brussels; ⁴ Foodborne Pathogens, Sciensano, Brussels; ⁵ Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, Ghent

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056

DEVELOPMENT OF A BIOINFORMATICS PIPELINE FOR ROUTINE ANALYSIS OF WHOLE GENOME SEQUENCING DATA OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES

Bert Bogaerts^{1,2}, Stéphanie Nouws^{1,3}, Raf Winand¹, Qiang Fu¹, Julien Van Braeke¹, Sarah Denayer², Bavo Verhaegen², Sigrid C. J. De Keersmaecker¹, Nancy Roosens¹, Kathleen Marchal³ and Kevin Vanneste¹
¹ Transversal activities in applied genomics, Sciensano, Brussels (1050), Belgium
² Foodborne pathogens, Sciensano, Brussels (1050), Belgium
³ UGhent – Department of information Technology, IDLab, imec



Characterisation of *Listeria monocytogenes* serogroup IIb isolated from meat products and meat food production environment

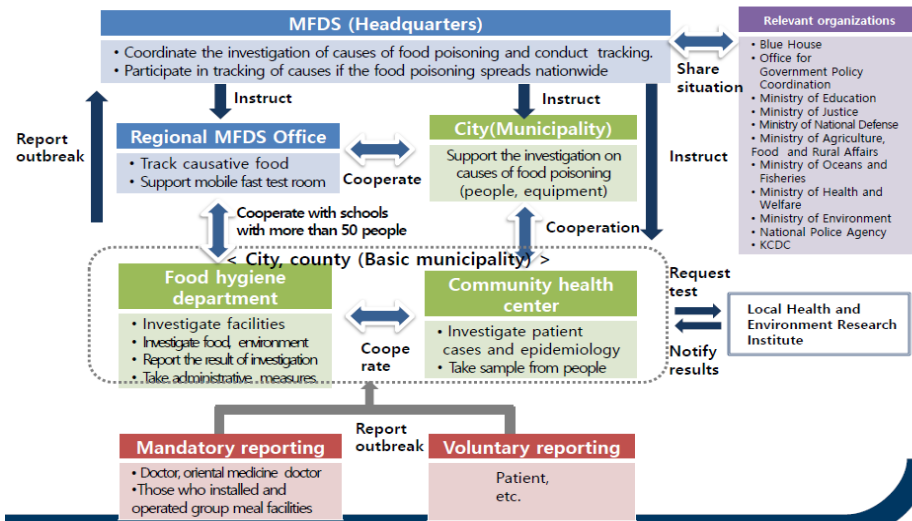
Monika Kurpas*, Kinga Wiczorek



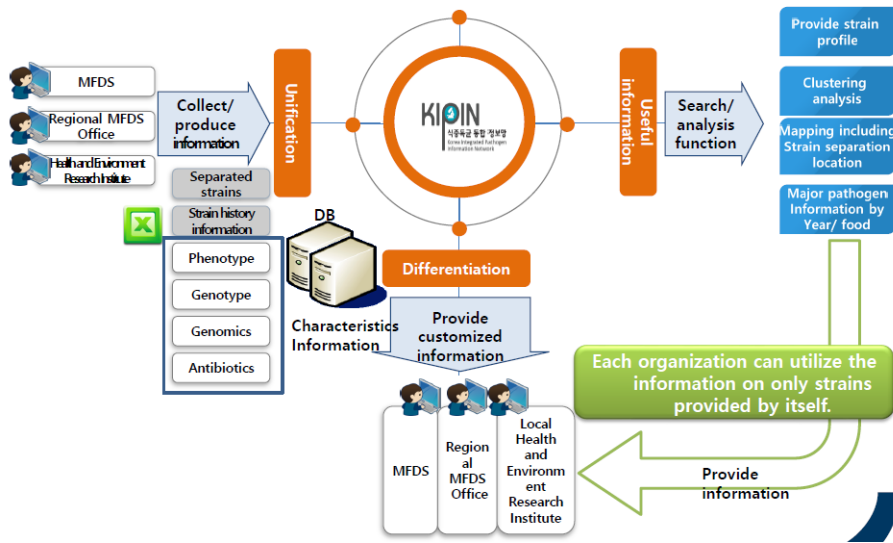
National Veterinary Research Institute, Department of Hygiene of Food of Animal Origin, Poland
 *Corresponding author: monika.kurpas@piwet.pulawy.pl









Structure of Foodborne Outbreak Investigation in KOREA



Korea Integrated Pathogen Information Network (KIPIN)



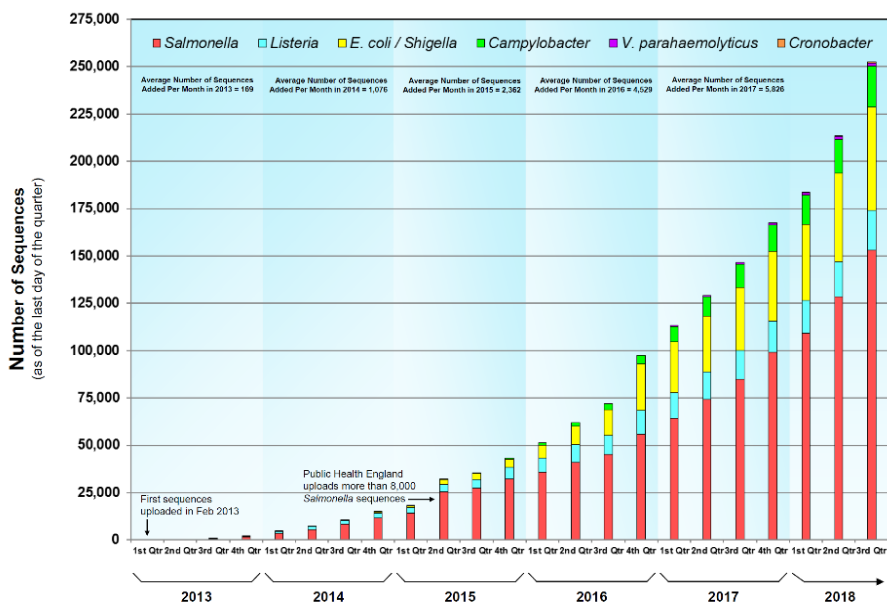
Campylobacter jejuni isolates

						
CGF40	644	691	161	122	143	371
MLST	644	119	55	39	143	79
WGS	392	195	55	98	42	79

Само за Франция броят на изолатите *Campylobacter jejuni* посредством пълен геномен секвентен анализ възлиза на 861 в периода 2009 – 2015г.

ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА И...

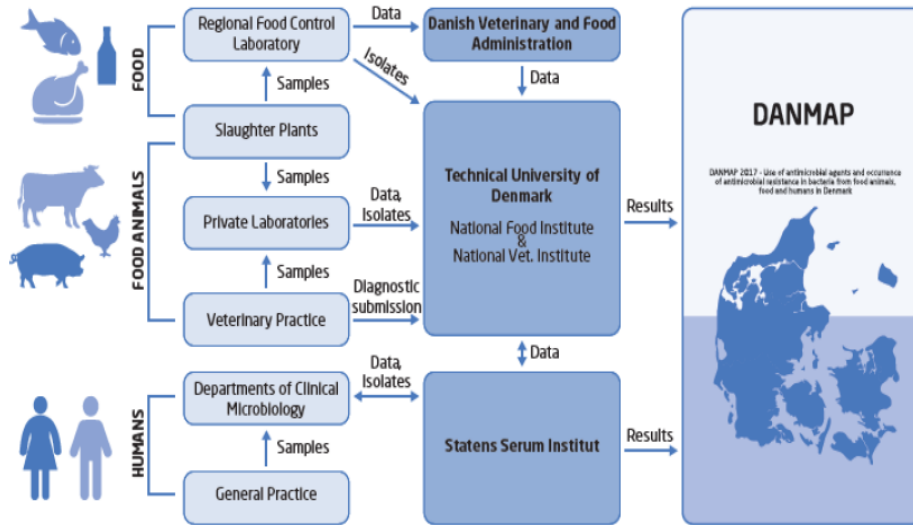
Total Number of Sequences in the GenomeTrakr Database



Общ брой пълно геномно секвенирани патогенни бактерии, данни за Южна Корея – 275 000 секвенции за периода 2013 – 2018г.

ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА

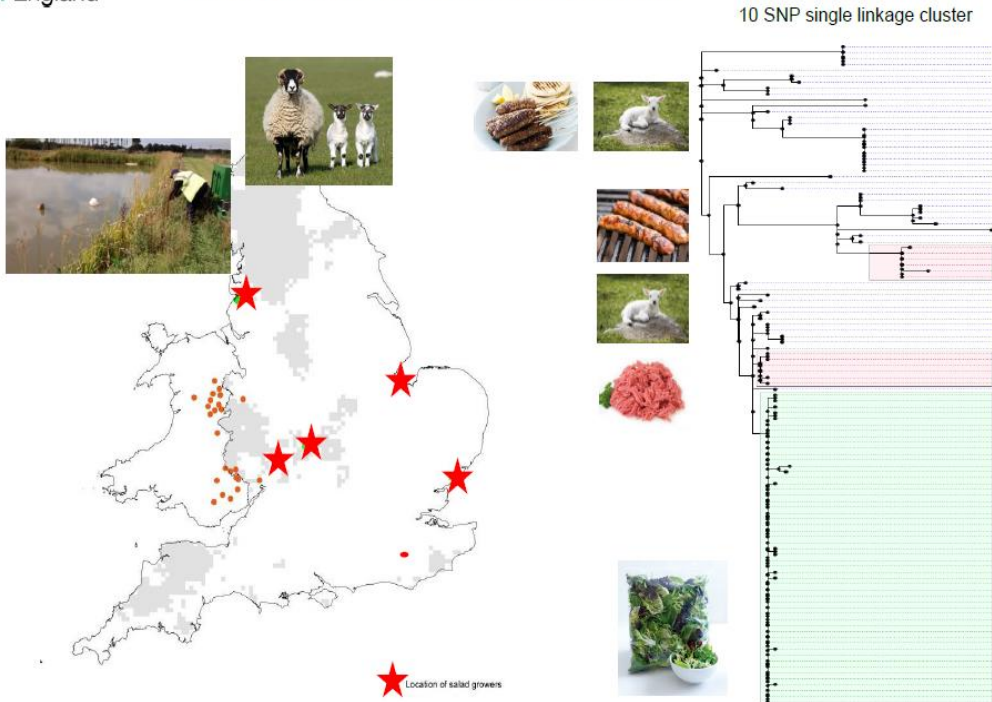
Organisation of DANMAP



Source: DANMAP 2017



WGS provided further evidence of a domestic source - strains closely related to the outbreak strain circulating in the UK – and insight into the route of transmission



WGS as one-stop-shop for bacterial typing



- Virtually complete characterization at max resolution
- One lab method for all bacteria and all typing
- Sharing of a lot of information in universal format
- Less processing time and personnel workload

INNUENDO

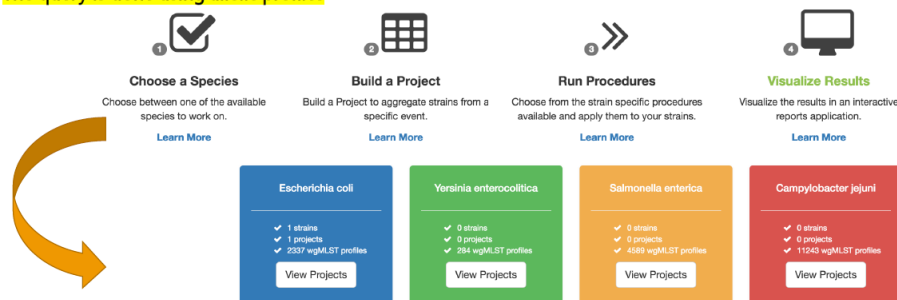
End-to-end management of genomic sequence data and metadata

It is designed for supporting outbreak detection and investigation by matching specific profiles.

Quality verified species-specific genomic databases.

The query is done using allelic profiles

INNUENDO
www.innuendoweb.org



<https://www.sanger.ac.uk/science/groups/pathogen-informatics>

<http://www.innuendoweb.org/>

Всичките тези разработки и научни трудове изтъкват важността на **секвентният анализ от ново поколение (NGS) като най-висша форма на диагностика**, спомагат за по-лесното разбиране на метода пълно геномно секвениране и правят по-лесно **внедряването му като сертифициран метод в диагностиката на инфекциите и хранителните взривове**. Все по-широкото използване в рутинната диагностика на WGS ще доведе и до значителното понижение на себестойността на реакцията и повишаване достъпността на методиката.

Новата генерация секвениране, наименования, звучащо като цитат от филма Стар Трек, е широкомащабен подход, който увеличава скоростта на реакцията, дава информация в реално време, точността е изключително висока и разходите за изследване все повече и повече намаляват.

Бързото развитие в технологиите за секвениране на ДНК доведе до драстично намаление както на разходите, така и на времето, необходимо за разчитане на човешкия

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136

<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056

геном. Освен това, цялостното геномно секвениране промени понастоящем клиничната практика, осигурявайки по-точен и усъвършенстван генетичен анализ. **Чрез него можем да получим информация за мутациите, отговорни за появата на ракови и други заболявания.**

Чрез технологиите за секвениране от следващо поколение(NGS) се произвежда голям обем данни за кратък период от време и следователно е предназначен да осигури на медицинските специалисти и техните пациенти качествена и своевременна информация и адекватно лечение.

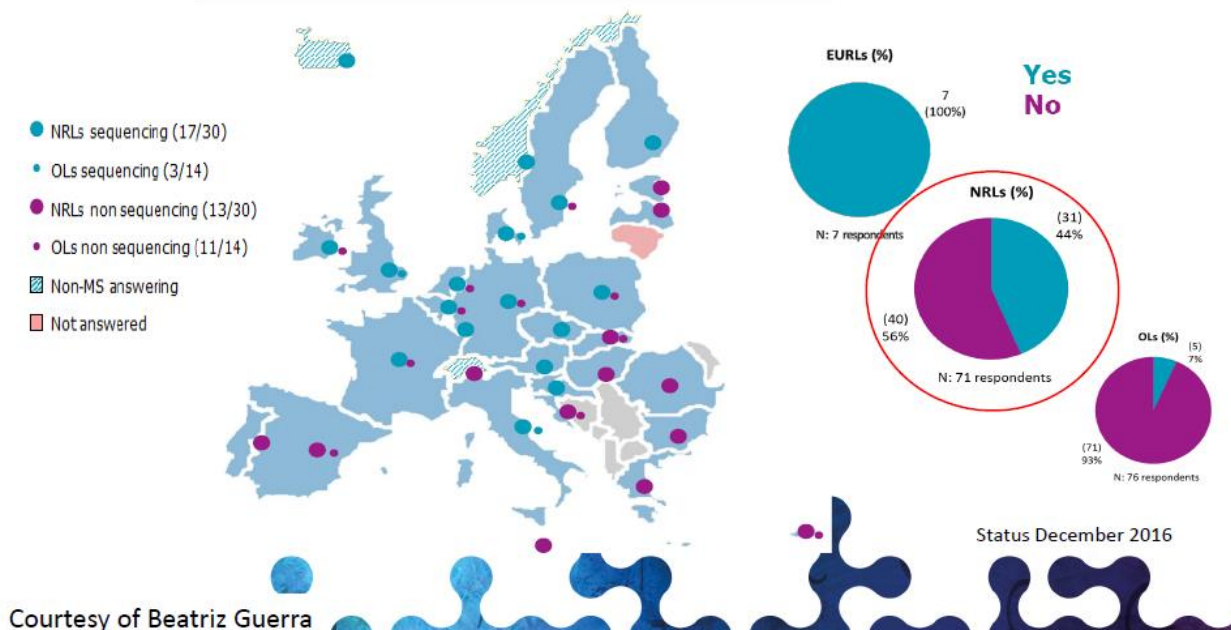
Цялостното геномно секвениране ни дава познания за **семейната история, както и за рисковете от развитие на наследствени заболявания.**

В днешно време цялостното геномно секвениране се налага с бързи темпове като сертифициран диагностичен подход в мониторинга и превенцията на заболяванията и при оценката на риска от възникването им.

Капацитет на лабораториите в Европа за извършване на пълен геномен секвентен анализ (фиг. 21):

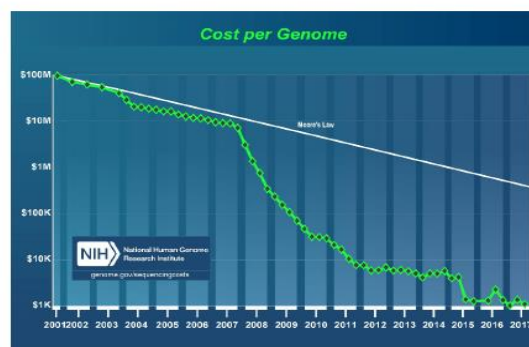
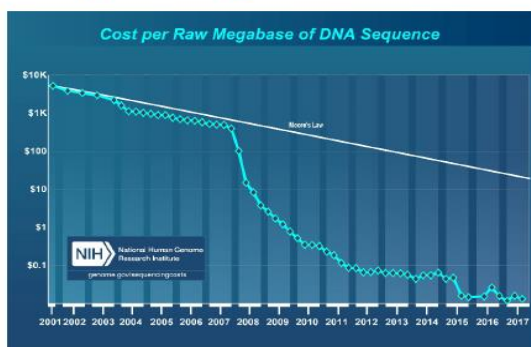
Sequencing capacity in EU (EFSA survey – 2016)

Q1. DO YOU CARRY OUT WGS ACTIVITIES? 28% YES (N=154 respondents)









Колко струва секвентният анализ (фиг. 22)?

Sequencing costs



Cost of determining 1 Mb

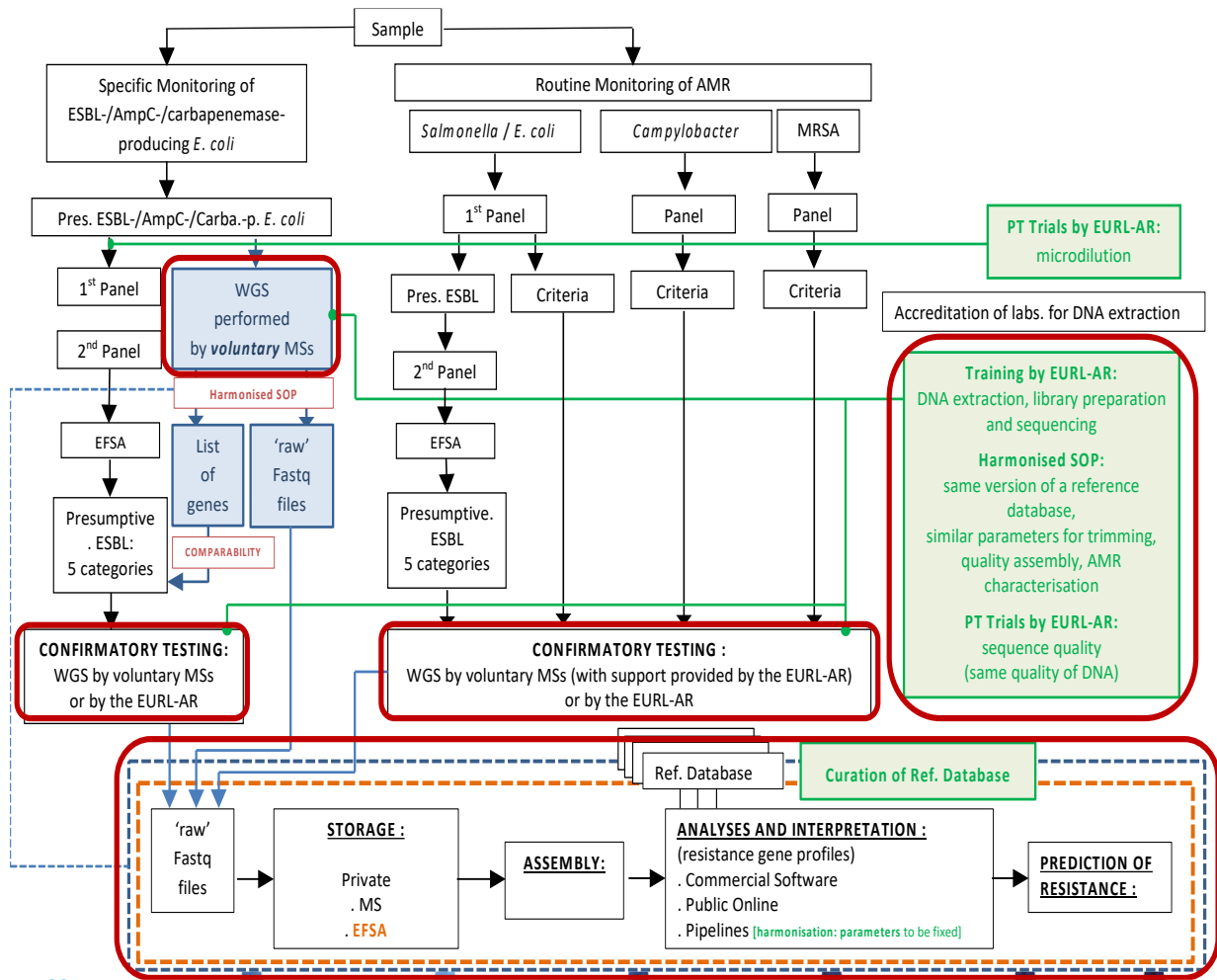
Cost of sequencing a human-sized genome – \$1K/3000Mb

<p>MinION</p> <p>From \$1,000</p>  <p>Everything you need to explore the technology and investigate the potential of real-time analysis.</p> <p>Select MinION ></p>	<p>GridION</p> <p>From \$49,955</p>  <p>Compact benchtop system designed to run and analyse up to five MinION Flow Cells</p> <p>GridION options ></p>	<p>PromethION</p> <p>From \$165,000</p>  <p>High-throughput, modular benchtop system. All the benefits of Nanopore sequencing, massively paralleled.</p> <p>PromethION options ></p>
<p>MinION Mk1C</p> <p>From \$4,999</p>  <p>A MinION with fully integrated compute and screen.</p> <p>More info ></p>	<p>VolTRAX v2</p> <p>\$8,150</p>  <p>Automatic sample extraction and library preparation.</p> <p>More info ></p>	<p>Flongle</p> <p>Starter Pack \$5,250</p>  <p>An adapter for MinION for smaller tests or experiments</p> <p>More info ></p>

В бъдеще:

На фиг. 23 е показано проект за мониторинг на антимикробната резистентност на бактериите, включващо като сертифициран и валидиран метод за диагностика пълният геномен секвентен анализ и докладването на данни към ЕОБХ. Необходимо е хармонизиране на стандартните оперативни процедури между НРЛ на национално ниво и между ДЧ и уеднаквяване на методиките спрямо Европейската референтна лаборатория по антимикробна резистентност.

Фигура 23



ЕК предлага:

Building capacity for genomic-based surveillance

EXTERNAL SCIENTIFIC REPORT



APPROVED: 8 June 2018
doi:10.2903/sp.efsa.2018.EN-1431

Final report of ENGAGE - Establishing Next Generation sequencing Ability for Genomic analysis in Europe

Rene S. Hendriksen¹, Susanne Karlsmose Pedersen¹, Pimlapas Leekitcharoenphon¹, Burkhard Malorny², Maria Borowiak³, Antonio Battisti³, Alessia Franco³, Patricia Alba³, Virginia Carfora³, Antonia Ricci³, Eleonora Mastroianni³, Carmen Losasso³, Alessandra Longo³, Sara Petrin³, Lisa Barco³, Tomasz Wolkowicz³, Rafał Gierczyński³, Katarzyna Zacharczuk³, Natalia Wolaniuk³, Dariusz Wasyl³, Magdalena Zajac³, Kinga Wiecek³, Katarzyna Piótorak³, Lijana Petrovska-Holmes³, Rob Davies³, Yue Tang³, Kathie Grant³, Anthony Underwood³, Timothy Dallman³, Anais Painsnet³, Hassan Hartman³, Ali Al-Shabib³, and Lauren Cowley³



In the project period, ENGAGE has shown that it is possible to implement WGS and the use of bioinformatics tools in laboratories without any prior knowledge of WGS, and that other countries can be supported to do this through partnerships. In addition, ENGAGE has showed that some current phenotypic methodologies, e.g. *Salmonella* serotyping, could in the future be replaced by WGS and the use of bioinformatics tools. The ENGAGE project was successful on many levels both in terms of boosting WGS and analysis capacity and capability across Europe but also in demonstrating advantages of having genome data sets from different sources and different countries for validation and benchmarking exercises as well as investigative analyses. To date there has been little

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg

тел. 02/4273056



Проектът ENGAGE (<http://www.engage-europe.eu/>) е сътрудничество между осем институции в Европа. Целта е да се стимулира научното сътрудничество, за да се **използва анализът на целия геном (WGS) в областта на безопасността на храните и защитата на общественото здраве**. ENGAGE се фокусира върху някои определени патогени: *Escherichia coli (commensal E. coli)* и различни *Salmonella* spp. серотипове. Секвенирани са общо 3360 генома, 778 *E. coli* и 2 582 *Salmonella* spp. Тези геномни секвенции са съхранени и споделени между партньорите в проекта и ще бъдат предадени в последствие на Европейската банка за геномни последователности. Секвенираните геноми са използвани за сравнителни анализи, за да се оцени възможността за замяна на конвенционалното типизиране с WGS за проучване на огнищата на инфекции и хранителните взривове. Посредством тестове за пригодност партньорите в проекта са оценили качеството на методиката и възможността тя да бъде внедрена в рутинната диагностика на инфекциите. Изготвени са ръководни документи и инструкции, включващи налични софтуерни инструменти за биоинформатичен анализ и стандартни оперативни процедури, които са публикувани онлайн и са обществено достъпни. По време на проекта са провеждани семинари, обучителни курсове и туининг програми с цел улесняване разбирането и прилагането на методиката WGS.

За повече информация относно проектът ENGAGE:

<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1431> и

<http://www.engage-europe.eu/>

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Според така изложените етапи в еволюцията на WGS се забелязват две основни тенденции:

- едната е миниатюризация на апаратурата с цел ползването и на терен и бърза диагностика на патогенните причинители, и
- втората тенденция – на възможност за паралелна обработка на голям обем от проби и секвенции и по-подробен биоинформатичен анализ на секвенираните геноми – включително за геномно картиране и подробен филогенетичен анализ за свързаността на изолатите и произхода им.

За целите и изпълнението на стратегията “Едно Здраве”, за подобряване на диагностичната подготвеност и увеличаване на точността на резултатите, за подобряване на мониторинговите програми и вземане на по-добри стратегически решения и не на последно място справяне с наболелия проблем – антимикробна резистентност, трябва да бъдат избрани целесъобразни методики за пълен геномен секвентен анализ, които обаче да бъдат съобразени с диагностичните възможности и финансовите ресурси на **България** и да бъдат интегрирани в една обща национална система, която да бъде съобразно европейските законодателни рамки.

За да има смисъл внедряването като методика на пълния геномен секвентен анализ в диагностичната практика, трябва да:

- бъде създадена на **национално ниво прецизна схема за мониторинг на заболяванията и единна система за бързо обявяване на възникналите инфекциозни взривове, епидемии и епизоотии, до която да има осигурени нива на достъп.**
- има **колаборация между заинтересованите страни** (клинични лаборатории, НРЛ, микробиологични лаборатории, клинични заведения, ветеринарни клиники и

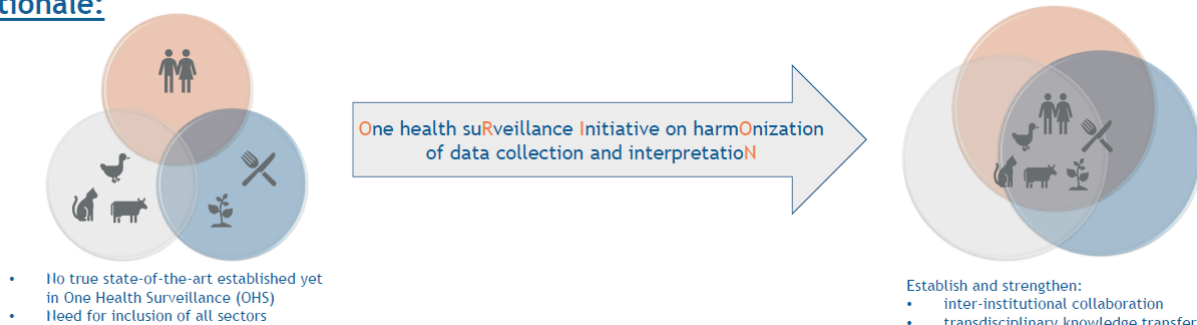
ветеринарни лаборатории), за да може това да бъде отправна точка за обмен на професионален опит, обмен на информация и споделяне на постигнати резултати.

The ORION Project - A One Health Surveillance Initiative

Thomas H.A.Haverkamp¹, Sandra Stelzer², Jörn Gethmann², Franz J. Conraths², Christoph Staubach², Fernanda Dorea⁴, Thomas Selhorst³, Christine Müller-Graf³, Idesbald Boone³, Johanne Ellis-Iversen⁵, Taran Skjerdal¹, Karin Lagesen¹, Cecilia Jernberg⁶, Matthias Filter³, on behalf of the ORION consortium

¹Norwegian Veterinary Institute (NVI), Norway, ²Friedrich-Loeffler-Institute (FLI), Germany, ³Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR), Germany, ⁴Swedish National Veterinary Institute (SVA), Sweden, ⁵Technical University of Denmark (DTU), Denmark, ⁶Public Health Agency of Sweden (FoHM), Sweden

Rationale:



Библиография:

- [Routine Use of Microbial Whole Genome Sequencing in Diagnostic and Public Health Microbiology](#) - Claudio U. Köser, Matthew J. Ellington, Edward J. P. Cartwright, Stephen H. Gillespie, Nicholas M. Brown, Mark Farrington, Matthew T. G. Holden, Gordon Dougan, Stephen D. Bentley, Julian Parkhill, Sharon J. Peacock
- <https://www.fda.gov/> - U.S. Department of Health and Human Services - Whole Genome Sequencing (WGS) Program
- <https://www.cdc.gov/> - Volume 22, Number 8—August 2016 - Whole-Genome Sequencing Detection of Ongoing *Listeria* Contamination at a Restaurant, Rhode Island, USA, 2014 - Jonathan S. Barkley, Michael Gosciminski, and Adam Miller1
- <https://www.cdc.gov/> - Volume 20, Number 4—April 2014 - **Whole-Genome Sequencing for Risk Assessment of Long-term Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*** - Knobloch J, Niemann S, Kohl TA, Lindner U, Nitschke M, Sayk F, et al.
- <http://www.elta90.com/%D0%BE%D0%B1%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5/%D0%BC%D1%83%D0%BB%D1%82%D0%B8%D0%BC%D0%B5%D0%B4%D0%B8%D0%B9%D0%BD%D0%BE-%D0%BF%D1%80%D0%BE%D0%B4%D1%83%D0%BA%D1%82%D0%BE%D0%B2%D0%BE/%D0%BF%D1%80%D0%B8%D0%BD%D1%86%D0%B8%D0%BF-%D0%BD%D0%B0-%D1%81%D0%B5%D0%BA%D0%B2%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D1%80%D0%B0%D0%BD%D0%B5-%D0%BF%D1%80%D0%B8-%D0%B8%D0%BB%D1%83%D0%BC%D0%B8%D0%BD%D0%B0-%D0%BC%D1%83/>
- Какво представлява цялостното геномно секвениране (WGS) – GENOMA Swiss biotechnology

7. Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis - Clinical Microbiology Reviews - Scott Quainoo, Technical University of Denmark; Sacha A F T van Hijum, Radboud University; **Jordy P. M. Coolen**, Radboud University Medical Centre (Radboudumc); **Martijn Huynen**, Radboud University Medical Centre (Radboudumc) at all
8. Whole genome sequencing and its applications in medical genetics - Jiaxin Wu, Mengmeng Wu, Ting Chen and Rui Jiang - MOE Key Laboratory of Bioinformatics, Bioinformatics Division and Center for Synthetic & Systems Biology, TNLIST; Department of Automation, Tsinghua University, Beijing 100084, China - Quantitative Biology 2016, 4(2): 115–128 DOI 10.1007/s40484-016-0067-0
9. Bioinformatics Sequence and Genome Analysis Ebook – David W. Mount
10. Bio153 Microbial Genomics - Professor Mark Pallen, University of Birmingham
11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3831009/>
12. <https://www.ebi.ac.uk/> - European bioinformatics institute
13. Molecular Genetics - Genome Sequencing - Basic & Applied Research on Jute Project (BARJ)
14. Whole genome analysis - R.Priyanka M.Sc Biotechnology
15. WHOLE GENOME SEQUENCING OF BACTERIA & ANALYSIS – Elamurugan A. – Veterinary immunology
16. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention - Ruud H. Deurenberg, Erik Bathoorn, Monika A. Chlebowicz, Natacha Couto, Mithila Ferdous, Silvia García-Cobos, Anna M.D. Kooistra-Smid, Erwin C. Raangs, Sigrid Rosema, Alida C.M. Veloo, Kai Zhou, Alexander W. Friedrich, John W.A. Rossen, Journal of Biotechnology
17. High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak - T. Lewis, N.J. Loman, L. Bingle, P. Jumaa, G.M. Weinstock, D. Mortiboy, M.J. Pallen, Journal of Hospital Infection
18. Whole genome sequencing as a typing tool for foodborne pathogens like *Listeria monocytogenes* – The way towards global harmonisation and data Exchange - Stefanie Lütha, Sylvia Kletaa, Sascha Al Dahouka - Trends in Food Science & Technology
19. Whole genome sequence-based serogrouping of *Listeria monocytogenes* isolates - Patrick Hydena, Ariane Pietzkab, Anna Lennkhh, Andrea Murerb, Burkhard Springerb, Marion Blaschitzb, Alexander Indrab, Steliana Huhulescub, Franz Allerbergerb, Werner Ruppitschb, Christoph W. Sensen
20. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance - Claudio U. Ko“ ser1, Matthew J. Ellington, and Sharon J. Peacock
21. Real time application of whole genome sequencing for outbreak investigation – What is an achievable turnaround time? - Patrick McGann, Jessica L. Bunin, Erik Snesrud, Seema Singh, Rosslyn Maybank, Ana C. Ong, Yoon I. Kwak, Scott Seronello, Robert J. Clifford, Mary Hinkle, Stephen Yamada, Jason Barnhill, Emil Lesho
22. СЕКВЕНИРАНЕ НА ДНК - Невяна Иванова, Румяна Додова, Даниела Дачева-Център по Молекулна Медицина, Медицински Университет – София

23. How to use whole genome sequencing for monitoring of antimicrobial resistance in bacteria – European union reference laboratory for antimicrobial resistance and DTU
24. Opportunities and challenges of
25. Whole-genome and -exome sequencing - Britt-Sabina Petersen, Broder Fredrich, Marc P. Hoepfner, David Ellinghaus and Andre Franke - BMC Genetics
26. EFSA Scientific Colloquium n°20 - Use of Whole Genome Sequencing (WGS) of food-borne pathogens for public health protection
27. Establishing a Whole Genome Sequence-Based national network for the detection and traceback of Foodborne Pathogens - Marc W. Allard Ph.D., Division of Microbiology, ORS, Center for Food Safety and Applied Nutrition, (FDA) USA
28. Whole genome sequencing of foodborne pathogens: experiences from the Reference Laboratory - Kathie Grant, Gastrointestinal Bacteria Reference Unit, Public Health England
29. One Disrupting Technology Fits it All -Towards Standardized Bacterial Whole Genome Sequencing for Global Surveillance Dag Harmsen University of Münster, Germany
30. Canada's IRIDA Project for Infectious Disease Genomic Epidemiology - Gary Van Domselaar, PhD, NML –PHAC –Canada, Public health agency of Canada
31. Identification and Characterization of Foodborne Pathogens by Whole Genome sequencing: A Shift in Paradigm – CDC
32. Implementation of genomics technologies in regulatory food microbiology testing - Dr. Catherine Carrillo, Canadian Food Inspection Agency
33. GenomeGraphR: A user-friendly open-source web application for foodborne pathogen Whole Genome Sequencing data integration, analysis, and visualization - Moez Sanaa, Régis Pouillot, Francisco Garces Vega, Errol Strain and Jane M. Van Doren - Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, United States of America
34. Comparison of long-read sequencing technologies in the hybrid assembly of complex bacterial genomes - Nicola De Maio, Liam P. Shaw, Alisdair Hubbard, Sophie George, Nick Sanderson, Jeremy Swann, Ryan Wick, Manal Abu Oun, Emma Stubberfield, Sarah J. Hoosdally, Derrick W. Crook, Timothy E. A. Peto, Anna E. Sheppard, Mark J. Bailey, Daniel S. Read, Muna F. Anjum, A. Sarah Walker, Nicole Stoesser
35. Whole genome sequencing for foodborne disease surveillance – WHO
36. 16S Metagenomics Studies with the MiSeq® System – Illumina
37. Meta-G-Name DNA Isolation Kit (www.epibio.com/applications/nucleicacid-purification-extraction-kits/dna-purification-genomic/meta-g-nomedna-isolation-kit)
38. Metagenomic DNA Isolation Kit for Water (www.epibio.com/applications/nucleic-acid-purification-extraction-kits/dna-purification-genomic/metagenomic-dna-isolation-kit-for-water)
39. SoilMaster- DNA Extraction Kit (www.epibio.com/applications/nucleic-acidpurification-extraction-kits/dna-extraction/soilmaster-dna-extraction-kit)
40. Nextera XT DNA Library Prep Kit | Illumina (www.illumina.com/products/nextera_xt_dna_sample_prep_kit.ilmn)
41. De novo Bacterial Sequencing on the MiSeq® System - High-quality, paired-end reads ensure superior de novo genome assembly – Illumina
42. ВЪВЕДЕНИЕ В БИОИНФОРМАТИКАТА – приложна биоинформатика

43. Challenges in the Clinical Use of Genome Sequencing - Robert C. Green, Heidi L. Rehm, and Isaac S. Kohane
44. Картиране и секвениране на генома - 7.1. Картиране на генома
45. <https://www.genome.gov/Funded-Programs-Projects/Computational-Genomics-and-Data-Science-Program#1> – National human genome research institute
46. DNA Sequencing Costs: Data - Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP)
47. The principles of DNA Sequencing – NCBI
48. Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive *Staphylococcus aureus* in Europe - David M. Aanensen, Edward J. Feil, Matthew T. G. Holden, Janina Dordel, Corin A. Yeats, Artemij Fedosejev, Richard Goater, Santiago Castillo-Ramírez, Jukka Corander, Caroline Colijn, i Monika A. Chlebowicz, Leo Schouls, Max Heck, Gerlinde Pluister, Raymond Ruimy, Gunnar Kahlmeter, Jenny Åhman, m Erika Matuschek, Alexander W. Friedrich, Julian Parkhill, Stephen D. Bentley, Brian G. Spratt, Hajo Grundmannj, ESCMID Study Group on Molecular Epidemiological Markers (ESGEM), European Staphylococcal Reference Laboratory Working Group
49. Whole genome sequencing (WGS) for food-borne pathogen surveillance and taking the pulse - J Moran-Gilad, 1. Ministry of Health, Public Health Services, Israel, 2. Faculty of Health Sciences, Ben-Gurion University of the Negev, Israel, 3. ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics, Basel, Switzerland
50. Assessment of metagenomic Nanopore and Illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples - Liana E. Kafetzopoulou, Kyriakos Efthymiadis, Kuiama Lewandowski, Ant Crook, Dan Carter, Jane Osborne, Emma Aarons, Roger Hewson, Julian A. Hiscox, Miles W. Carroll, Richard Vipond, Steven T. Pullan
51. Faction 2: Genome Assembly Lab and Preliminary Data - Christian Colon, Erisa Sula, David Lu, Tian Jin, Lijiang Long, Rohini Mopuri, Bowen, Yang, Saminda Wijeratne, Harrison Kim
52. Real-Time Whole-Genome Sequencing for Surveillance of *Listeria monocytogenes*, France - Alexandra Moura, Mathieu Tourdjman, Alexandre Leclercq, Estelle Hamelin, Edith Laurent, Nathalie Fredriksen, Dieter Van Cauteren, H el ene Bracq-Dieye, Pierre Thouvenot, Guillaume Vales, Nathalie Tessaud-Rita, Myl ene M. Maury, Andreea Alexandru, Alexis Criscuolo, Emmanue Quevillon, Marie-Pierre Donguy, Vincent Enouf, Henriette de Valk, Sylvain Brisse, and Marc Lecuit
53. Interpreting Whole-Genome Sequence Analyses of Foodborne Bacteria for Regulatory Applications and Outbreak Investigations - Arthur W. Pightling, James B. Pettengill, Yan Luo, Joseph D. Baugher, Hugh Rand and Errol Strain
54. ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations - TECHNICAL REPORT
55. The Present and Future of Whole Genome Sequencing (WGS) and Whole Metagenome
56. Sequencing (WMS) for Surveillance of Antimicrobial Resistant Microorganisms and Antimicrobial Resistance Genes across the Food Chain - Elena A. Oniciuc, Eleni Likotraftiti, Adri an Alvarez-Molina, Miguel Prieto ID, Jes us A. Santos ID and Avelino Alvarez-Ord onez
57. GenomeGraphR: A user-friendly open-source web application for foodborne pathogen

58. whole genome sequencing data integration, analysis, and visualization - Moez Sanaa, Re'gis PouillotID, Francisco Garce's VegaID, Errol Strain, Jane M. Van Doren
59. Геномни бази данни за човека – Денис Сиников, НБУ
60. Salmonella enterica Phylogeny Based on Whole-Genome Sequencing Reveals Two New Clades and Novel Patterns of Horizontally Acquired Genetic Elements - Jay Worley, Jianghong Meng, Marc W. Allard, Eric W. Brown, Ruth E. Timmec
61. Methods Guide – Illumina
62. ECDC roadmap for integration of molecular and genomic typing into European-level
63. surveillance and epidemic preparedness – ECDC
64. Foodborne pathogens & whole genome sequencing: impact on public health protection - JOINT CONFERENCE – all participants files and presentations - DTU, EFSA, WHO, ANSES, BfR, National institute of food and drug safety evaluation South Korea, FDA USA; Paris, France
65. Pilot Program Aims to Advance NGS to a Routine Pathogen Testing Platform - Maria Fontanazza
66. LABORATORY STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR PULSENET NEXTERA XT LIBRARY PREP AND RUN SETUP FOR THE ILLUMINA MISEQ
67. PULSENET STANDARD OPERATING PROCEDURE FOR ILLUMINA MISEQ
DATA QUALITY CONTROL
68. Detection and Molecular Epidemiology of Foodborne and Animal Pathogens - IZSLER Parma laboratory adds the MiSeq® System to perform pathogen testing, epidemiology, and genetic screening studies efficiently.
69. Rapid microbial surveillance using nanopore DNA sequencing AAU - Martin H. Andersen, Rasmus H. Kirkegaard and Mads Albertsen
70. NanoAmpliSeq: A workflow for amplicon sequencing from mixed microbial communities on the Nanopore sequencing platform – Szymon T. Calus, Umer Z. Ijaz1, Ameet J. Pinto – University of Glasgow, UK & Northeastern University, USA
71. De novo sequencing and high-quality assembly of yeast genomes using a MinION device - Viktoria Hodorova, Hana Lichancova, Dominik Bujna, Martina Nebohacova, Lubomir Tomaska, Brona Brejova, Tomas Vinar, and Jozef Nosek
72. Getting complete genomes from complex samples using nanopore sequencing – AAU - Rasmus H. Kirkegaard, Søren M. Karst, Mads Albertsen
73. NANOPORE SEQUENCING FOR ONEHEALTH: genome and plasmid characterization of a methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius strain isolated from canine otitis and metagenomics samples from horse rectum - Joaquim Viñes, Olga Francinoa, Anna Cuscó
74. Extracting closed genomes from comammox enrichment cultures using Nanopore sequencing - Laura N. Wenzel, Jeroen Frank, Maartje A.H.J. van Kessel, Mike S.M. Jetten , Sebastian Lückner
75. PulseNet International: On the Path to Implementing Whole Genome Sequencing for Foodborne Disease Surveillance – CDC
76. Skmer: assembly-free and alignment-free sample identification using genome skims - Shahab Sarmashghi1, Kristine Bohmann, M. Thomas P. Gilbert, Vineet Bafna and Siavash Mirarab

77. Infection control in the new age of genomic epidemiology - Patrick Tang MD, PhD, Matthew A. Croxen PhD, Mohammad R. Hasan PhD, William W.L. Hsiao PhD, Linda M. Hoang MD
78. Navigating the future of bacterial molecular epidemiology - Stephen Baker, William P Hanage and Kathryn E Holt
79. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene based approaches - A.C. Schürch, S. Arredondo-Alonso, R.J.L. Willems, R.V. Goering
80. DNA sequencing at 40: past, present and future - Jay Shendure, Shankar Balasubramanian, George M. Church, Walter Gilbert, Jane Rogers, Jeffery A. Schloss & Robert H. Waterston
81. What are whole exome sequencing and whole genome sequencing? – Genetics Home Reference
82. Use of Whole-Genome Sequencing in Food Safety - Martin Wiedmann, Ph.D., D.V.M.
83. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA - James M. Heather and Benjamin Chain
84. Whole-Genome Sequencing of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis Strains, Tunisia, 2012–2016 – CDC
85. Current Status of Whole Genome Sequencing in the Human Foods Program at FDA - www.fda.gov - Steven M. Musser, Ph.D.
86. Course on Introduction to microbial whole genome sequencing and analysis - Mette Voldby Larsen - DTU – Center for Biological Sequence Analysis (CBS), Henrik Hasman - DTU – National Food Institute
87. Whole genome sequencing and its applications in medical genetics - Jiaxin Wu, Mengmeng Wu, Ting Chen and Rui Jiang
88. Past, present and future in the Danish antimicrobial resistance monitoring programme (DANMAP) - Valeria Bortolaia, DVM, PhD
89. Campylobacter: recent knowledge using genomics and metagenomics - Marianne Chemaly, Anses
90. RAKIP: Resources for harmonized annotation and efficient exchange of risk assessment models - Matthias Filter
91. Integration of genomics in outbreak detection and investigation of foodborne pathogens - Mirko Rossi, EFSA
92. The presence and future in antimicrobial resistance surveillance - Rene S. Hendriksen, Research Group of Genomic Epidemiology, WHO CC AMR & Genomics
93. Plasmid-mediated colistin resistance in German Salmonella enterica strains isolated from livestock, food and the environment - Maria Borowiak
94. WGS and antimicrobial resistance - Isabelle Kempf, ANSES
95. Investigation of listeriosis outbreaks in small ruminants using pulsed-field gel electrophoresis and whole-genome sequencing - Bojan Papić, Mateja Pate, Darja Kušar
96. Implementation und Validation of Bioinformatics Pipelines for Routine Diagnostic based on Whole Genome Sequencing - Jörg Linde, Mostafa Abdel Glil, Herbert Tomaso, Institute for Bacterial Infection and Zoonoses (IBIZ), Jena, Germany

97. Genetic variety of plasmid mediated colistinresistance in Gram-negative bacteria from raw meat products - Alžběta Baráková, Tereza Gelbíčová, Søren Overballe-Petersen, Martina Floriánová, Eva Litrup, Renáta Karpíšková
98. NGS-based workflow to improve the detection of antimicrobial resistance: from wet-lab to data analysis - Bas Berbers, Assia Saltykova, Pieter-Jan Ceyskens, Cristina Garcia-Graells, Kevin Vanneste, Nadine Botteldoorn, Nancy Roosens, Kathleen Marchal, Sigrid C.J. De Keersmaecker
99. Foodborne Outbreak Investigation and Whole Genome Sequences Analysis in Korea MFDS – Jin Hee Hwang PhD
100. One Health Approach on AMR surveillance in Korea - Food Microbiology division, NIFDS, MFDS
101. Identification of Probiotic Bacteria in Foods through Metagenomic Approach - Woojung Lee
102. www.ebi.ac.uk/
103. <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>
104. www.rcsb.org/pdb/
105. Medline
106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>
107. <http://www.geneontology.org/>
108. Final report of ENGAGE - Establishing Next Generation sequencing Ability for Genomic analysis in Europe - <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/sp.efsa.2018.EN-1431>



Други научни становища и актуална информация от областта на здравето, хуманното отношение и благосъстоянието на животните, антимикробната резистентност, както и оценка на риска по цялата хранителна верига може да намерите на сайта на Центъра за оценка на риска по хранителната верига:

„ДНК баркодинга като най- новият метод за таксономично определяне на компетентни вектори“

http://corhv.government.bg/?cat=27&news_id=805

„Алтернативни методи заменящи от части изпитванията върху животни и оценката на безопасността на химикалите и продуктите за хуманната и ветеринарната медицина и растителната защита“

http://corhv.government.bg/?cat=27&news_id=761

Както и други материали:

<http://corhv.government.bg/>

<http://corhv.government.bg/?cat=27>

<http://corhv.government.bg/?cat=71>

Изготвил:

Красимира Захариева

Главен експерт

Отдел ЗРЖ, дирекция ОРХВ

Център за оценка на риска по хранителната верига

Министерство на земеделието, храните и горите

22.05.2019 г.

X

Красимира Захариева
главен експерт в отдел ЗРЖ

ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА