Изисквания към ДНК баркодирането и пълното геномно секвениране при използването им в официалния контрол

НАУЧЕН КОЛОКВИУМ
ЦЕНТЪР ЗА ОЦЕНКА НА РИСКА ПО ХРАНИТЕЛНАТА ВЕРИГА
20 НОЕМВРИ 2019, СОФИЯ

д-р Ивелин Ризов,
държавен експерт, ДПАВ, МЗХГ

Изисквания към ДНК баркодирането и пълното геномно секвениране при използването им в официалния контрол

СЪДЪРЖАНИЕ

1. Пълното геномно секвениране (ПГС)

1.1. Приложение на ПГС при анализ безопасността на храните;

1.2. Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол;

1.3 Изисквания към използваната геномна библиотека.

2. ДНК баркодиране

2.1. Приложение на ДНК баркодинга при анализ на храни;

2.2. Стандартизиране на ДНК баркодинга за целите на официалния контрол;

Пълно геномно секвениране

Анализът на целия геном с помощта на следващото поколение секвиниране, може да бъде описано като способността да се секвенират стотици милиони къси ДНК фрагменти, които съставляват целия геном. Това позволява да се анализира специфичния му полиморфизъм като се съпостави с известен референтен геном.

Методът може да открие различни генетични вариации, като:

- единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs);
- малки вмъквания и изтривания (InDels);
- мултинуклеотидни полиморфизми (MNPs);
- вариации на броя на копията (CNVs); и
- структурни варианти (SVs)

което създава възможност да се разкрие връзката между генотип и фенотип.

Интерпретирането на данните от ПГС се нуждае от биоинформационен анализ.

Приложение на ПГС при анализ безопасността на храните

Поради уникалните дискриминационни възможности, ПГС има голям потенциал при анализ безопасността на храните

ПГС създава възможността за:

- диференциране на източници на замърсяване, дори в рамките на едно и също огнище – предоставя информация за анализ на първопричината;
- определя фенотипни свойства на изследваните микроорганизми като антибиотична устойчивост (EFSA, 2019), вирулентност, чувствителност към почистващи препарати или прилепване към повърхности.

Този потенциал на ПГС изисква координиране на усилията между производството на храни, ветеринарния контрол и здравеопазването, за да може да се извлекат максимални ползи от приложението на ПГС за целите на безопасност на храните и защита на общественото здраве.

Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол

Използването на ПГС в контрола безопасността на храните и общественото здраве води до повишени изисквания към качеството и сигурността както за генериране на данни, така и за анализа на резултатите.

Стандартизация, калибриране на процеса и опростяване на анализа на данните и последващото му тълкуване са основни условия, които трябва да бъдат постигнати, за да се гарантира проследяемостта, надеждността и точността на ПГС.

Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол

Изискванията за стандартизирани протоколи и валидиране се отнася до всеки етап от:

- подготовката и провеждането на секвенирането: (i) изолиране на ДНК; (ii) подготовка за сравняване с библиотечните данни, (вмъкване на адаптери и баркодове/индекси); (iii) PCR амплификация; и (iv) следващо поколение секвениране;

- бионинформцаионния анализ: 1) контрол на качеството на четене, 2) определяне на еталонния геном, 3) картографиране на четенето спрямо референтния геном, 4) откриване на единичен нуклеотиден полиморфизъм (SNP) и малки вмъквания или изтриване (indel), 5) сглобяване на геном *de novo*, 6) анотация на генома, 7) изграждане на филогенетично дърво и 8) филогенетичен анализ.

Хармонизирането на анализа е може би най-просто постигнато чрез използване на единен аналитичен протокол, от всички желаещи да сравнят данните.

Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол

Първични показатели за качество:

- Качеството на първичните показания трябва да бъде оценено; ако показателите за минимално качество не са спазени, показанията трябва да бъдат отстранени и последователността да се повтори.
- Всички платформи създават необработени показания както на последователностите, така и на индивидуалните оценки на качеството. Основен показател за качество е покритието, дефинирано като броя на непрочетените данни за средната дължина на четене през генома (т.е. броят пъти, когато всяка база в генома се съдържа в отделни необработени четения). Минималното покритие от 30x е обикновено достатъчно за рутинно наблюдение, но това зависи от платформата и може да варира в зависимост от организма.
- Други показатели за качество, които трябва да се проверяват рутинно, включват средните резултати за Q , който е стандартен показател за качество и измерва вероятността базата да бъде извикана неправилно.

Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол

- За обработката на файлове FASTQ определянето на глобални показатели за качество на ниво четене (като средна дължина на четене или дълбочината на покритие спрямо референтния геном).
- Точността като дълбочина на покритие и се изчислява от средния брой отчитания на Q30 и повече за организми в рамките на геномното секвениране и размера на генома.
- Точността е степента на съответствие между повторните измервания на един и същ материал.
- Повторяемостта е мярка за точност в рамките на един цикъл. Възпроизводимост е мярка за точност между циклите.
- Тези показатели трябва да бъдат избрани внимателно „ за всеки отделен случай», в зависимост от използваната технология, последващия анализ или организма, който се изследва.

Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол

- За анализ и интерпретация на данните от ПГС се използват два различни и взаимно допълващи се подхода: SNP извикване от референтна последователност и сравнения на алелни варианти (сравнение гените по гени).

- Тъй като SNP извикването зависи от последователностите, присъстващи както в бактериалния геном за анализ, така и от референтния геном, с който той се сравнява, методът не позволява откриване на нови гени или въведени елементи.

- Следователно, за ново задълбочено изследване на проба винаги ще се изисква *de novo* рекоструиране *на генома* и ген по ген анализ. И при двата подхода стабилността на данните и анализът на данните е от ключово значение за приложенията за официален контрол.

Изисквания за стандартизиране на ПГС за целите на официалния контрол

- В началото на ноември 2019 г. беше публикуван **ISO 16140-6: 2019** Микробиология на хранителната верига - Утвърждаване на метода - Част 6: Протокол за валидиране на алтернативни (патентовани) методи за микробиологично потвърждаване и типизиране.

  Този документ уточнява общия принцип и техническия протокол за валидиране на алтернативни методи за потвърждаване на микробиологията в хранителната верига. Този документ сравнява резултата от алтернативния метод за потвърждение с процедурата за потвърждение на референтен метод или, ако е необходимо, референтен метод за потвърждение (например, ПГС).

- В процес на разработка е **ISO/CD TR 21394.2** Геномна информатика - терминология на ПГС

ДНК баркодиране

ДНК баркодирането е техника, която се използва за идентифициране на видовете, основаващ се на специфични видови разлики в къси участъци на тяхната ДНК (молекулни маркери, 400–800bp), която трябва да бъде лесно амплифицирана и характеризирана за всички видове на планетата.

Целта на ДНК баркодирането е да се създаде обща база от ДНК последователности, която може да се използва за идентификация, дискриминация или таксономична класификация на организмите.

ДНК баркодирането позволява идентифицирането на конкретни видове, като сравняват маркерите гени на пробата с референтните последователности. Успехът му зависи от: i) молекулярната изменчивост между видовете и ii) наличието на висококачествени бази данни от референтни ДНК последователности на известни видове.

ДНК баркодиране

1. Друг вид ДНК баркодиране е метабаркодиране, използвано за точното и бързо идентифициране на смес от различни видове, присъстващи в пробата. Потенциалът на този подход, който включва капацитет за паралелно секвениране, е огромен. Когато се комбинира с референтни библиотеки за ДНК баркодиране, метабаркодирането позволява идентифицирането с един тест на всички видове, открити в проба.

2. Стратегия за мини-ДНК баркодиране, използва много къси ДНК баркодове (~100–200 бази) за ботанически екстракти, масло и тинктури и в случаите на силно повредена ДНК.

ДНК баркодиране

ДНК баркодирането включва:

- Изолиране на ДНК от пробата
- Амплифициране на ДНК баркода с PCR
- Последователност на PCR продуктите
- Сравняване на получените последователности с референтните бази данни, за идентифициране на съвпадащите видове

Приложение на ДНК баркодинга при анализ на храните

1. ДНК баркодирането, което се основава на амплификацията на къси ДНК сегменти, е ефективен начин да се гарантира безопасността на храните чрез идентифициране на патогени.

2. Подходът на ДНК баркодиране има много широко приложение, особено в мониторинга на вредители и болести по растенията, карантинния контрол и програмите за сертифициране на растенията; това се дължи на способността му бързо да идентифицира вредители и фитопатогени от насекоми на различните им стадии на развитие.

3. ДНК баркодовете се използват и за откриване на измами с храни.

Приложение на ДНК баркодинга при анализ на храните

4. Когато замърсителите са токсични или алергенни, могат да възникнат сериозни последици за общественото здраве. В този случай неправилното етикетиране на храните не само ограбва потребителите на стойност, но може да застраши и хората, които имат непоносимост или алергии към определени храни или техните компоненти. Най-честите инциденти, базирани на литературата от 1980 г., са групирани в 11 категории храни: риба и морски дарове, млечни продукти, плодови сокове, масла и мазнини, зърнени продукти, мед и други натурални подсладители, подправки и екстракти, вино и други алкохолни напитки, детска формула, растителни протеини и други хранителни продукти .

5. Проверка на произхода на храните

6. Промишлената обработка променя основните характеристики на хранителните продукти, като прави невъзможно идентифицирането им въз основа на морфологични характеристики. В такива случаи може да се използва ДНК анализ, за да се определи с голяма точност различните компоненти на продукта.

Стандартизиране на ДНК баркодинга за целите на официалния контрол

ДНК баркодирането е стандартизиран метод, който е възможно най-малко таксономично зависим.

През февруари 2019 г. е публикуван **ISO/TS 16393:2019** Анализ на молекулярния биомаркер - Определяне на функционалните характеристики на качествените методи за измерване и валидиране на методите.

Този документ уточнява методи, които дават двоичен резултат и се използват за определяне в храни или хранителни продукти (включително семена от хранителни култури) за наличието на молекулярни биомаркери. Тези методи обикновено се използват там, където се очаква измерваната стойност да присъства в много малки количества и концентрации на границата на откриване (LOD).
Методите са валидирани по отношение на вероятността за откриване (POD) и точността на POD. Те не разчитат на концепцията за фалшиви положителни/фалшиво отрицателни резултати или концепцията за LOD. Въпреки това може да се направят изводи за точността на класическия LOD.

Стандартизиране на ДНК баркодинга за целите на официалния контрол

През март 2019 г. е публикуван **ISO 21286: 2019** Качество на почвата - Идентифициране на екотоксикологични тестови видове чрез ДНК баркодиране

Този документ уточнява протокол за идентифициране на екотоксикологични тестови образци (главно безгръбначни и растения) до ниво видове, въз основа на техниката на ДНК баркодиране. Този протокол може да бъде използван от лаборатории, извършващи ДНК баркодиране, за да се стандартизират както работните процеси на «мократа» лаборатория, така и анализа на данните.

Стандартизиране на ДНК баркодинга за целите на официалния контрол

През май 2019 г. е публикуван **ISO 20813:2019** Анализ на молекулярния биомаркер - Методи за анализ за откриване и идентифициране на животински видове в храни и хранителни продукти (методи на базата на нуклеинова киселина) - Общи изисквания и определения

Този документ уточнява минимални изисквания за експлоатационни характеристики за откриване на ДНК последователности, като PCR реакция, включително различни методи за откриване след PCR, PCR в реално време, единични и/или множествени методи за откриване, както и комбинацията от такива методи.

ЗАКЛЮЧЕНИЯ

1. Верифицирането и/или валидирането на ПГС и ДНК баркодинга е задължително преди използването им за официални изпитвания. ДНК баркодинка е напълно стандартизиран, а усилията за стандартизиране на ПГС са в ход.

2. Използването на сравнителни ДНК бази данни и при двата метода подчертава необходимостта от кооперираме както при тяхното създаване, така и приложение.

БЛАГОДАРЯ
ЗА ВАШЕТО ВНИМАНИЕТО !