Доклад относно изискванията за пълен геномен секвентен анализ на микроорганизми, вложени в хранителната верига

ЕВРОПЕЙСКИ ОРГАН ЗА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ

Научна информация

Микроорганизмите, генетично модифицирани или не, могат да бъдат използвани в хранителната верига като такива или като производствени организми на вещества, представляващи интерес. Употребата на такива микроорганизми или производни вещества/продукти на европейския пазар е желателно да минат през процедура за разрешаване преди пускане на пазара. Процесът на разрешаване пускане на пазара изисква извършване на оценка на риска, за да се установи безопасността и/или ефикасността на микроорганизмите, когато се влагат в хранителната верига както и на произведените от тези микроорганизми вещества, представляващи интерес. За да се извърши оценка на риска, е необходимо микроорганизмите, предмет на заявлението за разрешаване пускането на пазара, да бъдат охарактеризирани. В тази връзка, данните, получени от пълният геномен секвентен анализ (WGS), могат да предоставят информация за точна таксономична идентификация на щамовете и за характеризирането на техните потенциални функционални характеристики, които могат да включват фактори на вирулентност, резистентност към антимикробни вещества от клинично значение за хората и животните, производство на токсични метаболити. В действителност, ЕОБХ наложи в някои области на регулираните продукти използването на данни, базирани на WGS, като изискване при оценката на риска.

Този документ цели да представи препоръките към заявителите за начина на описване на анализа на данните и резултатите от проведения WGS анализ на микроорганизмите, които следва да бъдат предоставени на ЕОБХ.

Освен това, когато е възможно, се предоставят указания за това как да се изпълни анализа и критерии за качество или референтен праг (*threshold*), които трябва да бъдат достигнати, както и данните и съответната информация, които трябва да бъдат изпращани заедно, когато те са изисквани.

1. Въведение:

Микроорганизмите, генетично модифицирани или не, могат да бъдат използвани за влагане в хранителната верига като такива или като микрорганизми, произвеждащи вещества, представляващи интерес за хранително вкусовата промишленост. Употребата на такива микроорганизми или производни вещества/продукти на европейския пазар може да бъде предмет на процедура по разрешаване преди пускане на пазара, съгласно съответната регулаторна рамка, включително:

• Генетично модифицирани микроорганизми, освободени съзнателно в околната среда, обхванати от компетенциите на ЕОБХ съгласно Директива 2001/18/ЕО на Европейския Парламент и на Съвета от 12 март 2001 година относно съзнателното освобождаване на генетично модифицирани организми в околната среда и за отмяна на Директива 90/220/ЕИО на Съвета.

• Генетично модифицирани храни и фуражи, Регламент (ЕО) № 1829/2003 на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2003 г. относно генетично модифицираните храни и фуражи.

• Фуражни добавки, Регламент (ЕО) № 1831/2003 на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2003 г. относно добавки за използване при храненето на животните (и регламент за прилагане).

• Храни, за които са предявени хранителни или здравословни твърдения, при спазване на Регламент (ЕО) № 1924/2006 на Европейския парламент и на Съвета от 20 декември 2006 г. относно хранителни и здравни претенции за храните.

• Хранителни ензими, Регламент (ЕО) № 1332/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно ензимите в храните и за изменение на Директива 83/417/ЕИО на Съвета, Регламент (ЕО) № 1493/1999 на Съвета, Директива 2000/13/ЕО, Директива 2001/112/ЕО на Съвета и Регламент (ЕО) № 258/97.

• Хранителни добавки, Регламент (ЕО) № 1333/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно добавките в храните.

• Хранителни ароматизанти, Регламент (ЕО) № 1334/2008 на Европейския парламент и на Съвета от 16 декември 2008 г. относно ароматизантите и определени хранителни съставки с ароматични свойства за влагане във или върху храни и за изменение на Регламент (ЕИО) № 1601/91 на Съвета, регламенти (ЕО) № 2232/96 и (ЕО) № 110/2008 и Директива 2000/13/ЕО.

• Микроорганизми, използвани като продукти за растителна защита, Регламент (ЕО) № 1107/2009 на Европейския парламент и на Съвета от 21 октомври 2009 г. относно пускането на пазара на продукти за растителна защита и за отмяна на директиви 79/117/ЕИО и 91/414/ЕИО на Съвета.

• Нови храни, предмет на Регламент (ЕС) 2015/2283 на Европейския парламент и на Съвета от 25 ноември 2015 година относно новите храни, за изменение на Регламент (ЕС) № 1169/2011 на Европейския парламент и на Съвета и за отмяна на Регламент (ЕО) № 258/97 на Европейския парламент и на Съвета и на Регламент (ЕО) № 1852/2001 на Комисията.

Процесът на разрешаване определя необходимостта от извършване на оценка на риска, за да се установи безопасността и/или ефикасността на микроорганизмите, когато се влагат в хранителната верига като такива или като производствени щамове. Следователно, микроорганизмите трябва да бъдат изследвани и охарактеризирани и ЕОБХ разработи следните документи, за да подкрепи заявителите при подготовката и предоставянето на необходимите данни:

• Ръководство на групата по ГМО относно оценката на риска от генетично модифицирани микроорганизми и техните продукти, предназначени за употреба в храни и фуражи (GMO Panel, 2011),

• Общи научни насоки за заинтересованите страни относно заявленията за здравни претенции (панел на EFSA NDA, 2016a),

• Ръководство за подготовката и представянето на заявление за разрешаване на нова храна в контекста на Регламент (ЕС) № 2015/2283 (панел на EFSA NDA, 2016b),

• Ръководство на панела FEEDAP относно характеристиката на микроорганизмите, използвани като фуражни добавки или като производствени организми (EFSA FEEDAP Panel, 2018),

• Изявление на ЕОБХ относно характеристиката на микроорганизмите, използвани за производството на хранителни ензими (панел на EFSA CEP, 2019),

Документът ръководство за FEEDAP (панел на EFSA FEEDAP(*Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed*), 2018) и изявлението на ЕОБХ

относно охарактеризирането на микроорганизмите, които се използват за производството на хранителни ензими (EFSA CEP Panel *(Panel on Food Contact Materials, Enzymes and Processing Aids), 2019*) установи пълното геномно секвениране на микроорганизмите (WGS) и последващият биоинформатичен анализ на данни, базиран на WGS, като изискване за характеризирането на бактериални и дрождеви щамове, предназначени за употреба или като продукти, или като производствени щамове. Този подход се препоръчва и при гъбите. По подобен начин, Ръководството на *NDA Panel* (EFSA NDA Panel (*Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens*), 2016) предлага възможност да се използва WGS за идентифициране/характеризиране на бактерии и дрожди. В областта на продуктите за растителна защита (ПРЗ), Регламентът на Комисията (ЕС) № 283/2013 представя изискванията за използване на най-добрата налична технология и методология, при характеризиране на микроорганизмите на ниво геном. Базираният на WGS анализ на данни предоставя пълна информация за таксономичната идентификация на щамовете, както и за техните потенциални функционални белези (напр. фактори на вирулентност, резистентност към антимикробни вещества от клинично значение за хора и животни, производство на токсични метаболити). Минималните изисквания за необходимата информация, която трябва да бъде предоставена в техническите досиета, за анализ на данни от проведен WGS и биоинформатичен анализ след WGS, е посочен в ръководните документи, посочени по-горе в материала. Понастоящем отговорността на ЕОБХ е да оцени работата на заявителите и да оцени получените резултати от секвентния анализ. В това отношение и в областта на регулираните продукти отговорност на заявителя е да извърши секвенирането и биоинформатичния анализ след това на оценявания микроорганизъм, като информацията се преглежда от ЕОБХ. Следователно, отчитането на работата, извършена от заявителите/кандидатите, и данните, предоставени в заявленията, трябва да дават възможност на ЕОБХ да извърши оценка на риска по научно обоснован и хармонизиран начин, за да може да прави заключения относно идентификацията и характеризирането на микроорганизмите, както и информативността на проведеното изпитване.

2. Обхват:

Обхватът на настоящия документ се изразява в предоставяне на допълнителни препоръки на заявителите относно начин на представяне на информацията от проведения пълен геномен секвентен анализ, както и формата на получените данни/резултати и биоинформатичния анализ след това, които данни трябва да бъдат предоставени за оценка в контекста на заявление, включително, когато е възможно, указания за това как да се извърши тя и всички критерии за качество/ допустим праг, които трябва да бъдат осигурени/достигнати.

3. Изисквания към данните:

Кандидатите трябва да подготвят досиетата за оценка на риска в съответствие с изискванията, посочени в приложимата регулаторна рамка и/или ръководните документи на ЕОБХ. По-долу изискванията са определени за случаите, в които е необходимо да се представи анализ на базата на WGS.

3.1. Микроорганизми и екстракция на ДНК:

Проучванията трябва да включват анализираният микроорганизъм, който е предмет на заявлението за разрешение. Съответствието на пробите, използвани за екстракция на ДНК, WGS, анализ на данни от WGS и резултатите, докладвани за оценявания микроорганизъм, трябва да бъдат ясно посочени и да са съответстващи на тестовия организъм. Тестваният микроорганизъм трябва да се култивира като чиста култура преди извличането на ДНК. Трябва да се приложи адекватен протокол/метод за извличане на ДНК.

3.2. Секвенции и контрол на качеството на данните:

Стратегията и технологията за секвениране трябва да включват произволно вземане на проби за геномно секвениране, достигащи високо ниво на качество, както е описано по-долу. За бактериите трябва да се изследва пълната последователност на генома.

3.2.1. Създаване на библиотеки и бази данни:

Изграждането на библиотеки от проведен WGS, включващ методът на фрагментния анализ на ДНК, трябва да се докладва. Инструкциите на производителя, включително номера на версията и всички отклонения от този метод трябва да бъдат предоставени и докладвани. Не се препоръчва подбор на фрагменти по размер, освен ако методологията не включва стандартна стъпка за избор на размер на фрагмента. Ако се прилага, трябва да се зададе максимален праг (*threshold*) от 1,5 kb размер на фрагмента.

3.2.2. Стратегия при секвентен анализ и контрол на качеството:

Докладът от заявителя трябва да описва стратегията за секвентния анализ, използваната техника и и прилаганата, където е възможно базова технология/ методология. Препоръчва се да се ограничи рамката на четене (FASTQ или други еквивалентни), за да се избегне сглобяването (de novo-seq стратегия) или да се четат артефакти при картографиране. Прилаганите критерии за подравняване, изрязване и премахване на адаптера FASTQ, включително софтуера, версията на софтуера и параметрите, трябва да бъдат докладвани. Заявителите трябва да предоставят броя на прочитите на секвенцията и данни за общия брой базови двойки от последователността/секвенцията преди и след подрвняването. Средната постигната дълбочина на четене трябва да бъде най-малко 50-кратна с препоръчителна цел от 100 пъти. Броят на четенията, необходими за постигане на 100-кратна дълбочина, може да се изчисли по следния начин:

размер на генома (в базови двойки) * 100 (целева дълбочина)/дължина на четене (умножени по 2, ако се използва секвениране в двете посоки)

Ако точният размер на генома не е известен, заявителят трябва да използва данни за размера на генома на близкородствен на тествания микроорганизъм щам за изчисляване.

Всяко замърсяване при провеждане на WGS и при данните от секвенирането трябва да се изследва чрез метагеномен класификатор. Повече от 90% от прочитите на секвенциите трябва да принадлежат на очаквания организъм, ако това не е така, заявителите трябва да дадат обяснение. Резултатите трябва да се предоставят заедно

с използвания инструмент, версията на софтуера и всички използвани параметри. Геномите в базата данни, използвани при класификацията на тестовия микроорганизъм, също трябва да се отчитат, това може да бъде като приложение към доклада, ако е много дълъг или просто може да бъде като текст с препратка към съответната база данни (напр. *GenBank* или *Genome Taxonomy Database*). Ако се съобщава името на базата данни, тогава трябва да се отчете и датата, на която е депозирана/публикувана секвенцията.

3.3. Сглобяване на генома и пояснение:

Ако се използва подход, базиран на сглобяване на секвенираните фрагменти от генома, за да се предостави необходимата информация, тогава са необходими следните данни:

- *De novo* метод за сглобяване, включително софтуер, версия и параметри. Ако се извърши обработка след сглобяване: подход, софтуер, версия и параметри също трябва да се отчитат.
- Contigs/Контиги:
    - Общият брой контиги за бактериите трябва да бъде < 500, а за дрожди и филаментозни гъби <1000. Ако се докладва по-голям брой контиги, заявителят следва да обоснове невъзможността за по-пълно събиране.
    - Общата дължина на секвенциите, ако не е в рамките на ± 20 % от размера на очаквания геном, трябва заявителите да предоставят обосновка.
    - N50 метър
    - Що се отнася до геномите на гъбите, следва да се отчете броят на BUSCO гените, присъстващи при сглобяването на генома (https: //busco.ezlab.org/). Предлага се при асемблирането на генома да присъства таргет > 90 % от гените BUSCO, при най-тясно звързаната група гъби.

Ако се извършва геномна анотация, то е за да се осигури максимално подробна на изискваната информация, следва да се докладва името на софтуера, версията и използваните параметри. Заявителят трябва да се увери в актуалността на използваните бази данни. Следва да се отчете и общият брой на анотираните гени и броят на псевдогените.

3.4. Картиране съобразно референтни секвенции:

Съществува възможност да се използва четене, сравняване и съпоставяне на геномната секвенция с референтни такива като алтернатива на новия подход *de novo* асемблиране и четене. Този нов подход не е подходящ за генетично модифицирани щамове.

3.5. Използване на данни от пълното геномно секвениране за характеризиране на целевия микроорганизъм:

3.5.1. Идентификация на микроорганизма, съблюдавайки данните от секвенирането на целия геном:

Всеки микроорганизъм, подлежащ на оценка и одобрение трябва да бъде недвусмислено идентифициран на ниво вид. Трябва да се предостави потвърждение за идентичността на оценявания организъм:

- За бактериите идентичността на оценявания организъм, за предпочитане, трябва да се установи чрез цифрова ДНК-ДНК хибридизация (dDDH), средна нуклеотидна идентичност (ANI) или филогеномни методи. Организмът трябва да се сравнява с типове секвенции или свързани геноми, ако не са налични видови секвенции. За идентификация на ниво видове, dDDH трябва да достигне> 70% идентичност, а ANI трябва да достигне > 95–96% (*Chun et al*, 2018). За идентификация на ниво секвенции ANI трябва да достигне > 99,9% (*EFSA*, 2018). Данните от секвенирането могат също да бъдат използвани за идентифициране чрез сравняване на рибозомалните ДНК последователности, които обикновено се използват за таксономична идентификация (например, 16S рРНК ген) или тази на всеки друг характерен ген (напр. *housekeeping genes* / гени за поддръжка) с подходящи налични бази данни.
- За дрождите, потвърждаването на идентичността трябва да се извърши чрез филогеномен анализ (например, с помощта на конкатенация на няколко консервативни гени (например, AFToL гени), за да се получи филогения спрямо наличните близки геноми), 18S rDNA/ITS регион или чрез сравнявване на пълен геном от същия вид микроорганизъм.
- При филаментозните гъбички, когато е налична цялата последователност на генома, идентифицирането трябва да се извърши чрез филогенетичен анализ, който сравнява генома с наличните близки геноми, както е описано за дрождите.

Трябва да се включи обобщение на метода, използван за сравнение, последователностите, използвани за сравнение, и резултатите от сравнението, включително идентичност на последователността или филогенетично дърво.

Ако за идентификация се използва подходът за четене-картографиране (*read-mapping approach*), данните за последователността трябва да бъдат подравнени спрямо подходящ референтен геном/и (напр. тип щам или тясно свързани щамове). Изборът на справка трябва да бъде добре обмислен, обоснован и отчетен. Използваният софтуер, включително номера на версията и параметри, свързани с показанията (включително минималната дължина на картографиране и процент съвпадение с референтния геном) трябва да се докладва.

3.5.2. Идентифициране на гени, които представляват интерес / будят притеснение:

Данните за WGS могат да бъдат използвани за проверка наличието на гени, които предизвикват загриженост, които могат да включват гени, отговорни за антимикробна резистентност, свързани с употребата на тези микроорганизми при хора и животни, вирулентност, патогенност и/или токсигенност. Сглобената последователност/ геномна секвенция може да бъде анализирана посредством BLAST базиран подход с бази данни и резултатите от сравнителният анализ трябва да бъдат предоставени в таблица. За всеки отчетен резултат трябва да се посочат тестваната секвенция (т.е. последователността в базата данни) име и дата на присъединяване, функция на кодирания протеин, Е-стойност, BLAST резултат, сходство на последователността, покритие на последователността, стартиране на последователностите и съвпаденията им и край на секвенцията и съвпаденията им.

Ако се използва подход за картографиране (*mapping approach*), данните за последователността трябва да бъдат подравнени спрямо колекция от последователности, следва да се докладват следните статистически данни заедно с името на тестваната последователност (включително присъединяване и функция на кодирания протеин); сходство на последователността, средната дълбочина на картографиране/четене, процентът на припокриване на тестовата последователност, която е прочетена (заедно с минималната дълбочина на картографиране, използвана като праг за отчитане на последователността като „покрита“). Стратегията, софтуерът и всички съответни параметри (включително алгоритъм, ако е посочен в софтуера), използвани за идентифициране на гени, които представляват интерес, версията на съответната използвана база данни трябва да бъде посочена или, ако не е налична, датата, на която е била достъпена базата данни.

Антимикробна резистентност:

Препоръчва се да се проучат гените за антимикробна резистентност (AMR) в поне две бази данни (например *CARD, ARG-ANNOT, ResFinder, Hendriksen et al., 2019*). За микроорганизми, които не са добре представени в базите данни, се препоръчва база данни *Hidden-Markov models database* (например *Resfams*).
Като цяло трябва да се отчитат важни съвпадения в геномните секвенции с поне 70% сходство (на ниво протеин или еквивалент) и 60% покритие на последователността на заявките.

Токсигенност и патогенност

За бактериални щамове, в зависимост от тяхната таксономия и приложение, оценката може да изисква идентифициране на гени, кодиращи фактори на вирулентност (например токсини, инвазивни и адхезионни фактори).

По същия начин за еукариотните микроорганизми трябва да бъде оценена тяхната потенциална патогенност или способност да произвеждат метаболити, които биха могли да бъдат вредни за хората и/или животните. Цел на оценката могат да бъдат и установяване наличието/отсъствието на метаболитни пътища, участващи в токсигенността и токсична метаболитна активност. Допълнителна информация за микотоксини или токсични вторични метаболити, потенциално произведени от няколко микробиални вида, може да бъде намерена в научни публикации като *AINIA* (2017) и *Frisvad et al*, (2018).

Гените, които представляват потенциална опасност, трябва да бъдат представени като таблица, фокусираща се върху пълни генни последователности, кодиращи фактори на вирулентност, за които е известно, че се откриват във вида микроорганизъм или сродните им видове, към които принадлежи щамът или гените, участващи в биосинтезата на микотоксини/вторични метаболити.
К ато цяло трябва да се отчитат в базата данни секвенции с поне 80% сходство (на ниво протеин или еквивалент) и 60% покритие на последователността на заявките. Ако в базата данни има неочаквано попадение на ген, приложението трябва да бъде маркирано за допълнително изследване / токсикологичен контрол.

3.6. Предоставяне на сурови данни и стандартни формати на данни:

Суровите данни от WGS трябва да се предоставят в съответните стандартни формати, както е посочено по-долу. Необработените данни трябва да се изпращат в

FASTQ или подобни формати, компресирани или не (например zip), сдвоени или единични краища.

Сглобената секвенция трябва да бъде изпратена като електронни ASCII текстови файлове, използвайки или формат EMBL/GenBank, или формат Sequin (ASN.1) на NCBI. Ако се направи пояснение, то трябва да бъде подадено, следвайки документа INSDC (INSDC Feature Table Definition Document).

Всяко подравняване трябва да се предоставя във формат: подравняване на последователност/картографирана секвенция, двоично подравняване/картографирана секвенция (*Li, et al.*, 2009) или CRAM формат.
Списъкът на съответните данни и информацията, която трябва да бъде докладвана заедно с тези данни, може да бъде намерен в приложение А.

4. Други ръководни документи за справка:

Други референтни документи, публикувани от ЕОБХ, относно използването на NGS (секвениране от следващо поколение) за характеризиране на патогени в храни:

- Окончателен доклад на ENGAGE - установяване на следващо поколение способност за генетичен анализ в Европа (*Final report of ENGAGE - Establishing Next Generation sequencing Ability for Genomic analysis in Europe (Hendriksen et al., 2018*))
- Научен колоквиум на EFSA 24 - „Омикс технологиите в оценката на риска: най-новите технологии и следващите стъпки (*EFSA Scientific Colloquium 24- 'omics in risk assessment: state of the art and next steps (EFSA, 2018*)),
- Окончателен доклад на INNUENDO: Междусекторна платформа за интегриране на геномиката в мониторинга на патогени в храни (*Final report of INNUENDO: A cross-sectoral platform for the integration of genomics in the surveillance of food-borne pathogens (Llarena et al., 2018*)),
- Технически доклад за предоставяне на техническа помощ при събирането и анализа на данни от птоведен пълен геномен секвентен анализ в съвместната ECDC-EFSA база данни за молекулярно типизиране (*Technical report to provide technical support in the collection and analysis of whole genome sequencing data in the joint ECDC-EFSA molecular typing database (ECDC and EFSA, 2019*)),
- Технически спецификации за хармонизиран мониторинг на антимикробната резистентност при зоонозни и индикаторни бактерии, изолати от животни и продуктивни животни (*Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food (EFSA, 2019*)),
- Пълно геномно секвениране и метагеномика за изследване на огнища, установяване на източника и оценка на риска от инфекции с патогенни микроорганизми в храни (*Self-tasking whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source 276 attribution and risk assessment of foodborne microorganisms (BIOHAZ Panel, 2019*)).

Заявителите могат също така да се консултират с Ръководния документ на EURL-JRC за предоставяне и споделяне на ДНК секвенции от генетично модифицирани организми и свързаните с него Директива 2001/18/ ЕО и Регламент (ЕО) № 1829/2003, ЕС, 2016 г.

И накрая, ГМО панелът публикува през 2018 г. Технически доклад за качеството на ДНК секвенирането за молекулярна характеристика на генетично модифицирани растения (*EFSA GMO Panel, 2018*).

Приложение А - Списък на информацията и данните, които трябва да бъдат предоставени:

Таблицата по-долу изброява информацията и данните, които следва да бъдат предоставени от заявителите в техническите досиета в случаите, в които е необходимо да се предостави анализ на базата на WGS. Този формуляр трябва да бъде надлежно попълнен и подписан от кандидатите към момента на подаване.

Section	Item	Provided Yes	Provided NA	Comments
	Reporting of methodologies and outcomes			
3.1	**Microorganism and DNA extraction**			
	Identifier for the microorganism subject of the application for authorisation (same used in other sections of the dossier)	☐		
	Confirmation of the correspondence of the samples used, WGS and results reported with the microorganism subject of the application	☐		
3.2	**Sequencing and FASTQ data quality control**			
3.2.1	**Library construction**			
	Library construction method including the fragmentation method	☐		
	Threshold fragment size, where applied	☐	☐	
3.2.2	**Sequencing strategy and quality control**			
	Sequencing strategy and instrumentation used (base-calling method, where relevant)	☐		
	Trimming and adaptor removal criteria applied, software, software version and parameters used	☐		
	Average read depth coverage	☐		
	Contamination in the sequencing data – Percent of reads assigned to the expected organism Tool used, the software version and parameters used, the genomes in the database used for classification should also be reported or database name and date of access	☐		
3.3	**Assembly and annotation**			
	Software version and parameters (including those applied in post-assembly processing)	☐	☐	
	Data related to the contigs: total number of contigs, total length of contigs and N50	☐	☐	
	BUSCO genes present for fungal genomes	☐	☐	
3.5	**Use of whole genome sequence data for the characterization of the microorganism**			
3.5.1	**Identification and characterization of the microorganism**			
	Methodology used, sequences used for comparison, results of the comparison including sequence identity or phylogenetic tree (where relevant) For read-mapping approach, the software used, including version number, and parameters related to the reads (including minimum length of mapping and percent coverage of the reference genome) should be reported.	☐	☐	
3.5.2	**Identification of genes of concern**			
	Assembly and BLAST approach	☐	☐	
	Strategy, software and parameters used to identify genes of interest and database/s used (including version or accession date)	☐	☐	
	For each hit: - Subject sequence (including name accession and encoded protein) - E-value - BLAST score - Sequence similarity - Sequence coverage - Query sequence start and stop	☐	☐	
	Reference-based read mapping approach	☐	☐	
	Strategy and software used and information on the subject sequences used	☐	☐	
	For each hit:	☐	☐	
	- Subject sequence (including name accession and encoded protein) - Median depth of mapping - Percentage of the subject sequence covered - Sequence similarity - Sequence coverage			
3.6	**Provision of raw data and standard data formats**			
	The raw reads should be submitted in FASTQ or similar formats, compressed or not, pair or single end	☐	☐	
	Assembled sequence (FASTA) as electronic ASCII text files using either the EMBL/GenBank format, or the NCBI's Sequin (ASN.1) format.	☐	☐	
	Alignments in Sequence Alignment/Map format, Binary Alignment/Map format or CRAM format.	☐	☐	
Name: Date: Signature:				

DRAFT

Този материал показва, освен изискванията към заявителите за предоставяне на данни за генома на вложените в храни микроорганизми, а и неоходимостта най-новите молекулярни техники като WGS, метагенамиката и биоинформатиката да залегнат основно като методи за изпитване и в производството на храни. Освен с цел установяване на опасност и епидемиологично или епизоотично проучване на огнища, тези методи могат да бъдат използвани и за други етапи от процеса на оценка на риска, при охарактеризиране на микроорганизмите, влагани в хранителната верига и за охарактеризиране на тяхната ефективност и безопасност. Когато биват влагани микроорганизми или така наречените стартерни култури в храните, така може да се намали нуждата от добавки в храните, като нитрити, нитрати и други консерванти.

Използвана литература:

- „Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms“ - EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel), DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5898
- ECDC TECHNICAL REPORT - ECDC strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations 2019–2021 – DOI 10.2900/805317
- “The Microbiological Risk Assessment of Food” -Wiley-Blackwell (2002)
- “EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain” - EFSA

Превел:

Красимира Захариева,

главен експерт в дирекция ОРХВ
25.02.2020 г.