

Методът на секвениране на целия геном (**Whole genome sequencing-WGS**) все повече навлиза в съвременната микробиология



Резюме

Цялостното геномно секвениране (WGS) е технология, която има потенциала да се превърне в рутинен анализ в микробиологията. Изолираната геномна ДНК се използва за цялостно геномно секвениране (WGS) чрез платформата Illumina MiSeq, за да се получат четени би-базични двойки (bp), съгласно инструкциите на производителя на диагностичния кит. По такъв начин, чрез включването на този метод в микробиологичния диагностичен алгоритъм, който в момента включва традиционни и молекулярни методи, се постига точна и бърза идентификация на видовете, на тяхната антимикробна чувствителност, вирулентност и генетични подтипове с висока разделителна способност.

Типизирането на патогени, разпространявани чрез храната е едно от най-ранните приложения на WGS и е доказателството за превъзходството му в сравнение с традиционните методи.

Приложенията на WGS включват: изследване на епидемични взривове, свързани с храните; наблюдение, за да се очертае локалната, регионалната и глобалната геномна

епидемиология на патогените и за определяне на източника на инфекция. **По този начин WGS подкрепя оценката на риска и ръководи интервенциите за превенция и контрол на инфекциите.**

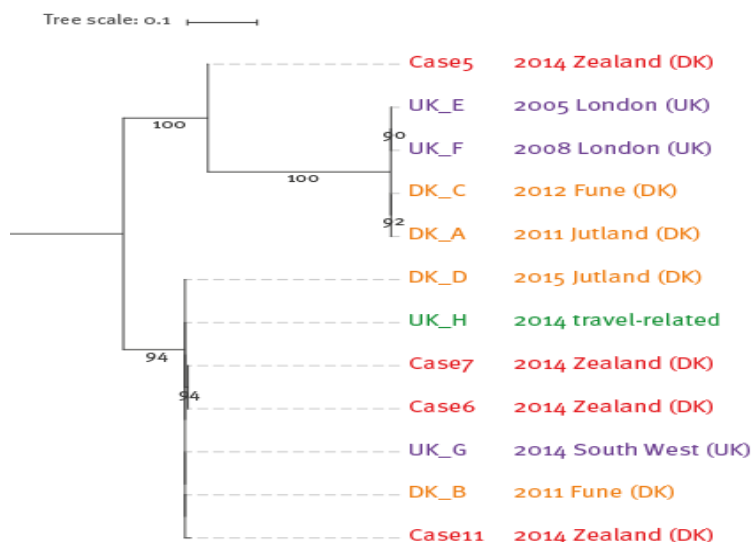
Все повече лаборатории и правителствени агенции (работещи в сферата на общественото здравеопазване) включват WGS в своята рутинна практика за наблюдение на патогени, пренасяни от хранителни продукти и в близко бъдеще се очаква WGS да навлезе още повече в тази област.

За да може WGS да бъде приет като нов „*златен стандарт*“ за проследяване на хранителните патогени (ключов елемент от контрола на заболяванията, причинени от храна) има нужда от стабилни, стандартизирани методи за анализ на данните получени от WGS.

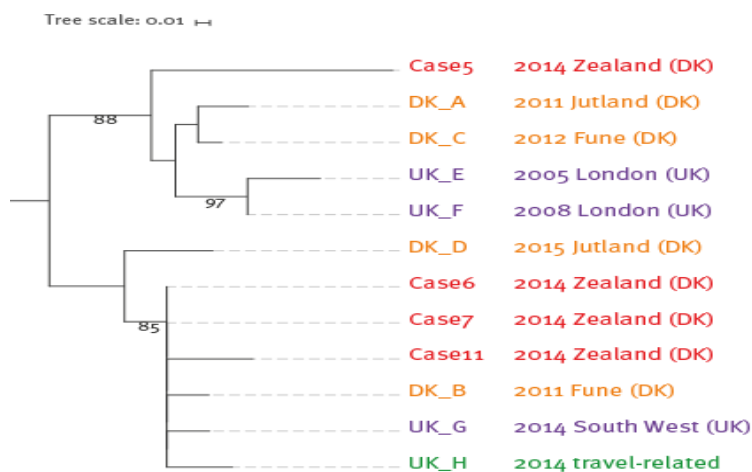
През 2014г. между юли и ноември в Северна Зеландия и Дания са диагностицирани 15 случая на легионерска болест (ЛД), включително четири със секвенция тип *Legionella pneumophila (ST)82*. ST82 не са намерени в проби от околната среда. Четирите предполагаеми изолата на ST82 са подложени на *цялостно геномно секвениране WGS*, последвано от филогенетични анализи с епидемиологично несвързани ST82 последователности. Това проучване потвърждава, че рекомбинацията играе основна роля в еволюцията на *L. pneumophila*. От друга страна, щамовете, които принадлежат към една и съща ST последователност, могат да имат само няколко SNP разлики.

WGS е приложен, за да се получи допълнително изясняване на произхода и свързаността на четирите случая. Неотдавна е описано, че L. pneumophila най-вероятно е генетично хетерогенна, дори между изолати в определени огнища. Филогенетичният анализ на ST82 геномите демонстрира хетерогенност между предполагаемите изолати на епидемията.

A. All identified SNPs within the core genome of the ST82 collection



A. Only the non-recombinant core genome SNPs



Фигура 1

Филогенетичният анализ (Фигура 1) показва, че всички включени изолати могат да бъдат разделени на два основни подтипа (I и II). Показани са коренните филогени с максимална вероятност, които са реконструирани като се използват А) всички идентифицирани SNPs в основния геном на ST82 и В) използвайки само не-рекомбинантни SNPs на генома на ядрото. Имената, които са изобразени в червено, са изследваните щамове на ST82.

WGS анализът се очертава като нов и силно дискриминационен инструмент за микробиологично генотипизиране. Получаването на данни, анализирането и разбирането на резултатите може да бъде предизвикателство както по отношение на анализа на данните, така и поради липсата на стандартизация, което създава трудности.

Последните проучвания се опитват да стандартизират типизирането на *Legionella*. Националното наблюдение в Дания все още се основава на ST типизиране и след това се прилага WGS метода само за избрани клъстери. В този регион на Дания ST82 не са открити във всички случаи, изследвани преди или след 2014 г. Поради това ситуацията с четирите случая със същата рядка ST, която е диагностицирана в рамките на няколко седмици е била извънредна.

PulseNet е глобална мрежа, която е посветена на лабораторно наблюдение на заболяванията, които се пренасят чрез храна. Създадена е в САЩ преди повече от 20 години като лабораторна мрежа за молекулярна епидемиология, базирана на стандартизиран анализ на PFGE. В световен мащаб *PulseNet* успява да обедини много хора, работещи в областта на безопасността на храните. Създава се платформа за обмен на данни и за сравнение на клинични, ветеринарни и хранителни изолати в над 80 страни, като има доказан опит в подкрепата на молекулярното наблюдение. Независимо от това, някои въпроси остават нерешени, като създаването и прилагането на глобална номенклатура, която е важна за обмена на резултатите от молекулярната епидемиология, както научно, така и оперативно.

Всяка година в света почти един на всеки 10 души се разболява поради консумацията на заразена храна. *Диария* е най-честата причина за заболявания с 550 милиона случая, от които близо 230 000 са смъртни. В световен мащаб *Campylobacter jejuni/coli* и *Salmonella enterica* са най-честите причинители на бактериална диария и са отговорни за около 96/80 милиона инфекции всяка година.

Мисията на *PulseNet International* е да прилага стандартизирани методи за генотипиране и да обменя информация в рамките на регионални и национални лабораторни мрежи, за да подпомогне наблюдението на епидемиите, позволявайки директно сравняване на междулабораторни данни, независимо от географията.

В този брой на *Eurosurveillance*, статия на Nadon et al. описва следващото поколение на *PulseNet International*, което се развива в използването на WGS. Тази инициатива представлява широко сътрудничество между много водещи агенции и заинтересовани страни. Авторите илюстрират техническите и практическите аспекти на адаптирането на тази мрежа. Разглеждат се и се обсъждат различни технически и практически аспекти, насочени главно към информационните технологии и биоинформатиката (съхранение на данни, изчисление, номенклатура, обмен на данни, методи за валидиране, контрол на качеството и осигуряването му). Съществува необходимост от решения за лесната употреба на биоинформатика, които да позволят автоматизиран анализ на бактериални геноми от неспециалисти в областта на биоинформатиката, за да извлекат ценна информация по ефективен начин. Тези решения трябва да предлагат колкото се може по-обратна съвместимост с настоящите методи, тъй като глобалният преход към WGS се очаква да бъде постепен. Също така трябва да предлага ефективна номенклатура на щамове/алелите, която да улеснява междулабораторната работа.

Независимо от постигането на успех в стандартизирането на молекулярното подтипизиране и междулабораторната сравнимост в 86 страни, *PulseNet International* не е в състояние да приложи глобална номенклатура на PFGE за патогени, пренасяни чрез храна. До голяма степен това е така поради сложността (и разходите) на прилагането на централна глобална база данни, изискващи честа ръчна обработка. Към днешна дата всяка страна или регион поддържа свои собствени бази данни, като обменят файлове с данни, за да сравняват резултати от различни номенклатури. В допълнение към превъзходното си представяне, WGS най-накрая предоставя възможност за истинска глобална номенклатура, улесняваща лабораторното наблюдение на международно ниво и бъдещо намаляване на тежестта на заболяванията, пренасяни от храна.

Контролът на качеството за отделните лаборатории е много важен и това е от голямо значение за мрежа, в която се разчита на резултатите, генерирани от различни

лаборатории, за да подкрепят вземането на решения в областта на общественото здраве. Строгата програма за контрол на качеството гарантира, че резултатите са надеждни за всички участници и осигуряват контролни пунктове по време на процеса за маркиране и премахване на потенциално неправилните резултати.

Преходът към геномно базираното наблюдение неизбежно включва споделянето на пълни данни за секвенцията. Това има много последствия, не само по отношение на съхраняването на данни, анализирането и споделянето им, но и аспекти като притежаването на данни и прозрачността, отнасящи се както до геномните последователности, така и до свързаните с тях метаданни. Използването на архив с публичен домейн премахва разходите за съхранение от отделни лаборатории и прави данните достъпни за широката научна общност за вечни времена, но също така изисква и обществен обмен на данни. Това е проблематично за някои държави по отношение на защитата на данни.

WGS показва изключителна чувствителност, специфичност и по-навременно разрешаване на образуването на клъстери в сравнение с традиционните методи. Други силни страни на WGS са неговата приложимост към всички организми и неговият потенциал да осигури множество тестове. Преходът към наблюдение, базирано на WGS, трябва да гарантира, че се поддържа достатъчно качествено, за да отговори на националните и международните регулаторни изисквания. Nadon et al. правилно подчертават в доклада си какво е значението от валидирането, стандартизацията и контрола на качеството. PulseNet International ще използва своя опит, за да направлява изпълнението на секвенсирането на генома по начин, който отговаря на непосредствените нужди на общественото здравеопазване и подкрепя по-широките усилия за предотвратяване и смекчаване на последиците от болестите, пренасяни чрез хранителни продукти в световен мащаб.

Източници:

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22811>

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22807>

<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22821>

Изготвил:

Боряна Иванова

младши експерт в Дирекция КРОКЦ

Дата: 30.06.2017г