



КОМИССИЯ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

Тринадцатая сессия

Рим, 16–20 апреля 2018 года

Рекомендации КФМ – применение методов секвенирования нового поколения для диагностики вредных организмов растений в фитосанитарном контексте

Пункт 8.6 повестки дня

Подготовлено Австралией, ЕОКЗР и Новой Зеландией

I. Справочная информация

1. В декабре 2017 года Бюро рассмотрело подготовленный Комитетом по стандартам (КС) документ о результатах обсуждения Технической группы экспертов по разработке диагностических протоколов (ТГДП) МККЗР возможностей и трудностей, связанных с применением методов секвенирования нового поколения (СНП) для фитосанитарной диагностики. Бюро было предложено согласовать направление данного информационного документа на рассмотрение 13-й сессии КФМ и просить ее принять к сведению трудности, связанные с использованием методов СНП, и необходимость их доработки до внедрения в качестве единственного инструмента выявления и идентификации вредных организмов.

2. Бюро отметило, что данная новая тема представляет интерес для Договаривающихся Сторон, и в этой связи необходимо подготовить проект рекомендации КФМ, содержащий предложения и указания КФМ в отношении применения методов СНП для фитосанитарной диагностики.

II. Что такое СНП, и чем этот метод отличается от других методов анализа?

3. Методы секвенирования нового поколения (СНП) позволяют секвенировать геном целиком и могут применяться для всех типов организмов. Методы СНП могут использоваться

В целях сведения к минимуму воздействия процессов ФАО на окружающую среду и достижения климатической нейтральности настоящий документ напечатан в ограниченном количестве экземпляров. Делегатам и наблюдателям предлагается приносить свои копии документа на заседания и не запрашивать дополнительных копий. Большинство документов к совещаниям в рамках ФАО размещено в Интернете по адресу: www.fao.org.

для выявления конкретных регулируемых вредных организмов, а также ранее невыявлявшихся организмов (т.е. информация о наличии которых отсутствовала). В частности, применение этих методов позволило установить присутствие ранее невыявлявшихся микроорганизмов, в особенности вирусов, в отношении которых применение данного метода более проработано, чем в отношении других патогенов (в настоящем документе приведены примеры выявления вирусов и вириодов). Используя методы СНП, исследователи и специалисты по диагностике продолжают идентификацию и описание новых таксонов множества еще неизвестных организмов. Эти методы обеспечивают новый комплексный подход к выявлению и определению характеристик вредных организмов в биологическом образце.

4. В настоящий момент при проведении фитосанитарного анализа с целью выявления вирусов и вириодов в растениях и растительных продуктах, транспортируемых по всему миру, применяется комплекс специфических (молекулярный и серологический) и общих (визуальный, электронная микроскопия, биологические индикаторы или биопробы) методов анализа. Несмотря на то, что перечисленные методы анализа на данный момент считаются наиболее эффективными, у них есть ряд недостатков. Проведение специфического анализа требует наличия предварительной информации о выявляемом вирусном патогене; кроме того, каждый образец должен быть обработан и валидирован, включая валидацию для различных пар вредный организм/хозяин, что ведет к увеличению нагрузки на национальные организации по карантину и защите растений (НОКЗР). Спектр растений-хозяев многих патогенов четко не определен, а экзотические вирусы и вириоды, поражающие новые виды растений, в таких новых парах вредный организм/хозяин могут оставаться невыявленными.

5. Метод биопроб традиционно используется для выявления вирусов, однако для установления идентичности возбудителя при проявлении симптомов болезни обычно требуется проведение дополнительных молекулярных или серологических анализов. Зачастую этот метод дает неопределенный, ложноположительный или ложноотрицательный, результат, поскольку проявление симптомов напрямую зависит от окружающих условий. При ввозе растения на длительный период помещаются в карантинные пункты, что влечет за собой значительные дополнительные расходы и задержки для импортеров. Еще один недостаток метода биопроб заключается в том, что штамм может быть не выявлен, если у растения-хозяева не проявляются симптомы. Учитывая ограничения традиционных методов диагностики, необходимы новые, точные, надежные и экономически эффективные методы быстрого и точного выявления вирусов и вириодов растений и растительных продуктов.

6. Проведенные исследования показали, что метод СНП столь же эффективен или даже превосходит метод растений-индикаторов при выявлении значимых с агрономической точки зрения вирусов и вириодов. (Rott, et al, 2017; Rwahnih et al. 2015; Mackie et al, 2017; Barrero et al. 2017). Более того метод СНП позволяет получить результаты намного быстрее, чем метод биопроб.

III. Трудности, связанные с нормативной и научной сферой

7. Как следует из результатов научного апробирования, внедрение методов СНП может повлечь серьезные последствия для фитосанитарной сферы. Например, существует риск того, что перемещение растительного материала будет ограничено из-за предполагаемого наличия микроорганизма (например, вируса), который может оказаться непатогенным для своего хозяина. Не все организмы, связанные с растениями, относятся к категории вредных; некоторые из них могут являться симбионтами, приносящими пользу растению-хозяеву, или условно-патогенными организмами. Еще одна проблема связана с тем, что, как и в случае с другими непрямими методами, при применении методов СНП выявляются также и нежизнеспособные организмы.

8. Правильное толкование результатов – одна из самых трудных задач при использовании метода СНП в фитосанитарном контексте. Требуется наличие очень обширной и хорошо

проработанной базы данных о последовательности оснований известных вредных организмов и микроорганизмов, с которой можно было бы сопоставить полученную с помощью СНП информацию о генетических основаниях. НОКЗР должны будут принимать решения, основываясь на анализе данных, а не на информации о биологической значимости и патогенности. Таким образом результаты анализа следует рассматривать не с точки зрения патогенности выявленного организма, а с точки зрения того, можно ли на основе полученных данных отнести его к биологической единице, представляющей собой подкарантинный вредный организм. Схожая проблема встает и при применении современных методов молекулярного секвенирования, в особенности в случае с "неизвестными науке" вирусами. Другие трудности, связанные с использованием методов СНП для целей регулирования, отмечены в работах Massart et al (2017) и Martin et al (2016).

9. Для того, чтобы НОКЗР с большей готовностью внедряли методы СНП для диагностики вредных организмов, необходимо гармонизировать подходы, в том числе разработать оперативные руководства по применению СНП, обеспечивающие стабильное получение качественных результатов, включая контроль качества и валидацию полученных с помощью СНП данных (Boonham et al, 2014). Кроме того, необходимо провести валидацию метода и его сравнение с уже применяемыми методами с учетом их ограничений.

IV. Международное сотрудничество

10. На глобальном уровне существует ряд инициатив по исследованию применения методов СНП для фитосанитарной диагностики (например, в Австралазии, Европе и Северной Америке). В рамках этих инициатив также ведется обсуждение возможных сопутствующих мер политики. Для обеспечения своевременной разработки единых международных стандартов применения методов СНП в целях регулирования следует принять во внимание результаты этих инициатив.

11. Представляемая на рассмотрение КФМ рекомендация (Приложение 1) о применении методов секвенирования нового поколения для фитосанитарной диагностики призвана задать направление работы в этой сфере.

V. Рекомендации

12. КФМ предлагается:

- 1) *принять к сведению* трудности, связанные с применением методов секвенирования нового поколения (СНП), а также необходимость их доработки до внедрения в качестве единственного инструмента выявления вредных организмов;
- 2) *утвердить* рекомендацию КФМ о применении методов секвенирования нового поколения для фитосанитарной диагностики (Приложение 1);
- 3) *учредить* международную целевую группу в составе специалистов по СНП, представителей регулирующих органов и членов ТГДП, которая займется определением преимуществ и недостатков внедрения этого метода с точки зрения регулирования.

Библиография

- Barrero RA, Napier KR, Cunnington J, Liefting L, Keenan S, Frampton RA, Szabo T, Bulman S, Hunter A, Ward L, Whattam, M and Bellgard, M (2017) An internet-based bioinformatics toolkit for plant biosecurity diagnosis and surveillance of viruses and viroids. *BMC Bioinformatics*, 18:26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5225587/>
- Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, and Mumford R. (2014) Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Res.* 24 186:20-31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24361981>
- Mackie J., Liefting L., Barrero, R.A., Dinsdale, A., Napier, K.R., Blouin, A.G., Woodward, L., Khan S., Bellgard, M.I., Ward L. and Whattam, M. (2017) Comparative diagnosis of viral pathogens using side-by-side trials of existing Post Entry Quarantine and small RNA next generation sequencing methods. Abstract PBCRC Science Protecting Plant Health 2017 conference <http://apps-2017.p.yrd.currinda.com/days/2017-09-26/abstract/4017>
- Martin, R.R, Constable, F. and Tzanetakis, I.E. (2016) Quarantine Regulations and the Impact of Modern Detection Methods. *Ann. Rev. Phytopath.* Vol. 54:189-205 <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-phyto-080615-100105>
- Massart S, Candresse T, Gil J, Lacomme C, Predajna L, Ravnikar M, Reynard JS, Rumbou A, Saldarelli P, Škorić D, Vainio EJ, Valkonen JP, Vanderschuren H, Varveri C, Wetzel T. (2017) A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Front Microbiol.* 2017 Jan 24;8:45 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28174561>
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., Lawrence, T., Birch, C., Bhagwat, B. and Rast, H. (2017) Application of Next Generation Sequencing for Diagnostic Testing of Tree Fruit Viruses and Viroids. *Plant Disease* 101:1489-1499 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-03-17-0306-RE>
- Rwahnih M. A., Daubert, S., Golino, D., Islas, C. and Rowhani, A. (2015) Comparison of Next-Generation Sequencing Versus Biological Indexing for the Optimal Detection of Viral Pathogens in Grapevine. *Phytopathology* 105:6:758-763 <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO-06-14-0165-R>

Приложение 1

ТЕКСТ РЕКОМЕНДАЦИИ**Рекомендация:**

Применение методов секвенирования нового поколения для фитосанитарной диагностики

СПРАВОЧНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Комиссия по фитосанитарным мерам (КФМ) признает, что надлежащая экспортная сертификация, досмотр при ввозе и применение соответствующих фитосанитарных мер требуют точной и своевременной диагностики вредных организмов¹. Как известно, эффективность выявления и идентификации вредного организма растения зависит от качества и точности инструментов диагностики.

Методы секвенирования нового поколения (СНП), также известного как высокопроизводительное секвенирование, представляют собой многообещающую альтернативу выявлению и идентификации организмов на основе уже имеющихся знаний. Вместе с тем получение таких диагностических результатов еще не доказывает наличие жизнеспособных вредных организмов или причинение ими вреда растениям или растительным продуктам. С учетом этого такие высокоточные методы выявления и идентификации вредных организмов растений, как СНП, следует внедрять для целей регулирования фитосанитарных рисков с осторожностью, учитывая возможные последствия и риски, связанные с использованием результатов диагностики.

АДРЕСОВАНО

Договаривающимся Сторонам и региональным организациям по карантину и защите растений.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Комиссия принимает к сведению результаты апробирования методов СНП для выявления неизвестных микроорганизмов и отмечает необходимость их дальнейшей доработки в части, касающейся установления принадлежности организма к категории вредных организмов растений и обоснования его отнесения к регулируемым вредным организмам. Комиссия принимает к сведению существующие нерешенные задачи и необходимость проведения дальнейшей доработки методов СНП до их внедрения в качестве единственного инструмента выявления вредных организмов.

Для содействия более широкому внедрению Договаривающимися Сторонами методов СНП Комиссия *призывает* Договаривающиеся Стороны и региональные организации по карантину и защите растений:

- а) *обсудить целесообразность и учредить* международную целевую группу в составе в том числе специалистов по СНП, представителей регулирующих органов и членов ТГДП для выявления преимуществ и трудностей или препятствий, связанных с применением этого метода в целях регулирования;
- б) *обсудить и согласовать* конкретный график работы целевой группы с указанием промежуточных результатов в целях внедрения СНП на международном уровне для проведения регулярного фитосанитарного скрининга вирусов и виридов;

¹ См. также рекомендацию КФМ R-07: Важность диагностики вредных организмов (<https://www.ippc.int/ru/publications/84234/>)

- с) *поддерживать и активно участвовать* в международных усилиях по развитию и окончательному оформлению стандартных оперативных руководств по применению методов СНП, в том числе для интерпретации результатов и применения утвержденных методов контроля качества для подтверждения точности и достоверности результатов СНП;
- д) *поддерживать* международные усилия по расширению базы научных данных о достоверности и точности СНП путем проведения испытаний в целях сравнения СНП с другими существующими диагностическими платформами;
- е) при возможности *обмениваться* знаниями и специалистами с другими странами и поддерживать программы обучения СНП, в том числе проведение и координацию международных квалификационных испытаний, призванных обеспечить независимую оценку лабораторного потенциала; и
- ф) по мере готовности *размещать* согласованные международные протоколы СНП и учебные материалы на странице, посвященной фитосанитарным ресурсам МККЗР.

РЕКОМЕНДАЦИЯ (РЕКОМЕНДАЦИИ), ЗАМЕНЯЕМАЯ (ЫЕ) ПРИВЕДЕННЫМИ ВЫШЕ:

Отсутствуют.