

Рекомендация КФМ: Методы высокопроизводительного секвенирования (ВПС) в фитосанитарной диагностике

Статус

| | |
|---|---|
| Настоящий текст не является официальной частью рекомендации КФМ и будет изменен Секретариатом МККЗР после принятия. | |
| Дата документа | 2018-12-06 |
| Категория документа | Проект рекомендации КФМ |
| Текущий этап работы над документом | <i>Для рассмотрения на 14-й сессии КФМ (2019 год)</i> |
| Основные этапы | 2018-03 Австралия, ЕОКЗР и Новая Зеландия предложили включить в программу работы МККЗР разработку рекомендации КФМ на тему "Методы секвенирования нового поколения в фитосанитарной диагностике". 2018-04 КФМ на своей 13-й сессии приняла решение включить в программу работы МККЗР разработку данной рекомендации КФМ. 2018-05 Корректировка с учетом решений 13-й сессии КФМ. 2018-05 Консультации (15 мая – 15 августа 2018 года). 2018-09 Пересмотр с учетом результатов консультаций. 2018-10 Бюро КФМ. 2018-12 Бюро КФМ. |
| Примечания | Настоящий проект документа был представлен для проведения консультаций только на английском языке. 2018-08 Название документа изменено по результатам консультаций (с "Методы секвенирования нового поколения" на "Методы высокопроизводительного секвенирования (ВПС)") 2018-10 Редактирование 2018-12 Редактирование (частичное) |

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 точности, воспроизводимости и специфичности инструментов диагностики.

Методы высокопроизводительного секвенирования (ВПС), также известные как секвенирование нового поколения (СНП) или глубокое секвенирование, представляют собой крайне многообещающую альтернативу традиционным методам диагностики, используемым для обнаружения и идентификации организмов (например, бактерий, грибов, фитоплазмы, вирусов и вироидов). Вместе с тем полученные с помощью ВПС диагностические результаты не являются подтверждением наличия жизнеспособных вредных организмов или причинения ими

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

вреда растениям или растительным продуктам. Поэтому результаты обнаружения и идентификации вредных организмов, полученные с помощью таких высокочувствительных методов как ВПС, следует интерпретировать с осторожностью. В частности, необходимо должным образом учитывать риски и последствия, связанные с использованием полученных с помощью ВПС-диагностики результатов при применении фитосанитарных мер. Кроме того, в силу высокой стоимости внедрения таких платформ и других операционных расходов технологии ВПС могут оказаться неприемлемы для некоторых национальных организаций по карантину и защите растений (НОКЗР). Следует также иметь в виду, что НОКЗР могут использовать различные типы платформ ВПС.

Дополнительная информация о методах ВПС приводится в Приложении 1.

АДРЕСАТЫ

Договаривающиеся Стороны и региональные организации по карантину и защите растений.

РЕКОМЕНДАЦИИ

Комиссия принимает к сведению существующие трудности и необходимость дальнейшей проработки вопроса о применении методов ВПС для обнаружения и идентификации вредных организмов в качестве основы для применения фитосанитарных правил. Результаты апробирования методов ВПС для обнаружения неизвестных микроорганизмов нуждаются в дальнейшей доработке в части, касающейся установления принадлежности организма к категории вредных организмов и обоснования его отнесения к регулируемым вредным организмам.

В случае если Договаривающаяся Сторона предлагает применять технологии ВПС и полученные с их помощью результаты в качестве основы для принятия соответствующих фитосанитарных решений, Комиссия *призывает* Договаривающиеся Стороны:

- a) *разработать* рекомендации по порядку действий при обнаружении неизвестного организма (например, грибка, бактерии или вируса) или обнаружении нежизнеспособных организмов в растительном материале;
- b) *обеспечить* создание необходимой инфраструктуры и инвестиции в развитие информационных технологий и биоинформатики, включая обучение и подготовку в области биоинформатики, в целях хранения соответствующих данных и интерпретации результатов проб, а также эффективного применения таких технологий;
- c) *стандартизировать* и *обеспечить* единообразный порядок применения передовых методов ВПС, в том числе в части, касающейся интерпретации результатов и контроля качества (например, технический контроль), гарантирующих точность и достоверность полученных с помощью ВПС данных и их биологическую значимость в фитосанитарном контексте;
- d) *подтвердить* надежность и точность методов ВПС путем проведения сравнительных испытательных ВПС и других актуальных диагностических платформ;
- e) *довести* информацию об интерпретации полученных с помощью ВПС результатов, в особенности выводы о фитосанитарном риске обнаруженных организмов, до сведения НОКЗР страны-экспортера;
- f) *внедрить* программы обучения использованию методов ВПС, в том числе электронные курсы по передовым лабораторным методам, и *координировать* проведение

международных квалификационных испытаний в целях независимой оценки лабораторного потенциала;

- g) *публиковать* протоколы ВПС (разработанные для соответствующих платформ ВПС) и *обмениваться* руководствами и учебными материалами в целях обеспечения прозрачности;
- h) публиковать информацию о неожиданных сообществах карантинных организмов в растениях и растительных продуктах, обнаруженных с помощью ВПС.

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

Отсутствуют.

Настоящее приложение приводится лишь для информации и не является одним из предписывающих разделов рекомендации КФМ.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Общая информация

В декабре 2017 года Бюро Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) рассмотрело подготовленный Комитетом по стандартам (КС) документ о результатах обсуждения Технической группой экспертов по разработке диагностических протоколов (ТГДП) МККЗР возможностей и трудностей, связанных с применением методов высокопроизводительного секвенирования (ВПС) в фитосанитарной диагностике. 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 ВПС, и необходимость их доработки в качестве инструмента обнаружения и идентификации вредных организмов.

КС подготовил документ об использовании методов ВПС в фитосанитарной диагностике с учетом результатов обсуждения ТГДП МККЗР возможностей и трудностей, связанных с ВПС.

В декабре 2017 года Бюро КФМ было предложено согласовать направление данного информационного документа на рассмотрение 13-й сессии КФМ и просить ее принять к сведению трудности, связанные с использованием методов ВПС, и необходимость их доработки в качестве инструмента обнаружения и идентификации вредных организмов.

Бюро КФМ отметило, что данная новая тема представляет интерес для Договаривающихся Сторон и в этой связи необходимо подготовить проект рекомендации КФМ, содержащий предложения и указания для Договаривающихся Сторон и региональных организаций по карантину и защите растений (РОККЗР) в отношении применения методов ВПС в фитосанитарной диагностике.

Австралия, Новая Зеландия и Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений (ЕОКЗР) представили проект рекомендации КФМ на ее 13-й сессии, на которой было принято решение включить в программу работы МККЗР разработку рекомендации КФМ на тему "Методы высокопроизводительного секвенирования в фитосанитарной диагностике".

Что такое ВПС и чем оно отличается от других методов анализа?

Методы высокопроизводительного секвенирования (ВПС), также известные как секвенирование нового поколения (СНП) или глубокое секвенирование, обеспечивают секвенирование генома целиком и могут применяться для диагностики всех типов организмов, прежде всего не поддающихся культивированию (например, вирусов и грибов, а также некоторых видов бактерий, оомицетов и грибов). Методы ВПС могут использоваться для выявления конкретных регулируемых вредных организмов, а также неизвестных организмов (т.е. информация о наличии которых отсутствовала). Методы ВПС позволяют проводить секвенирование генетического материала, который может применяться для идентификации генома микроорганизмов, представляющих фитосанитарный интерес, но которые не поддаются идентификации с использованием традиционных методов. Применение этих методов позволило установить присутствие ранее не обнаруживавшихся микроорганизмов, таких как грибки, бактерии, фитоплазма и прежде всего вирусы, в отношении которых применение данного метода более проработано, чем в отношении других патогенов (приведенные в настоящем документе примеры касаются вирусов и виридов). Исследователи и специалисты-диагносты с помощью методов ВПС продолжают работу по поиску новых организмов и идентификации и описанию новых таксонов, в отношении которых национальным организациям по карантину и защите растений (НОКЗР) предстоит оперативно принять принципиальные решения, опираясь на

ограниченный объем информации и не всегда точные оценки потенциального фитосанитарного риска (Olmos *et al.*, 2018). Эти методы обеспечивают новый комплексный подход к выявлению и определению характеристик потенциальных вредных организмов в биологическом образце.

В настоящий момент при проведении фитосанитарного анализа с целью выявления вирусов и виридов в растениях и растительных продуктах применяется комплекс специфических (молекулярный и серологический) и общих (визуальный осмотр, электронная микроскопия, биологические индикаторы или биопробы) методов анализа. Это самые передовые современные методы, которые широко применяются лабораториями по диагностике вредных организмов растений, однако они не лишены недостатков. Проведение специфического анализа требует наличия априорных знаний о вирусном патогене, и, кроме того, каждый образец должен быть обработан и валидирован, включая валидацию для различных пар вредный организм/хозяин, что ведет к увеличению нагрузки на НОКЗР. Кроме того, проведение такого специфического анализа также позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты или следы белков разложившихся частиц вредного организма, что чревато завышением результатов оценки присутствия вредного организма. Спектр растений-хозяев многих патогенов четко не определен, а экзотические вирусы и вириды в новых парах вредный организм/хозяин могут избегать обнаружения. 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.

Учитывая, что метод биопроб требует много времени, 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. Проведенные исследования показали, что метод ВПС столь же эффективен или даже превосходит метод растений-индикаторов при выявлении значимых с агрономической точки зрения вирусов и виридов (Barrero *et al.*, 2017; Mackie *et al.*, 2017; Rott *et al.*, 2017; Rwahnih *et al.*, 2015). Более того, по данным исследований метод ВПС позволяет получить результаты намного быстрее, чем метод биопроб. Вместе с тем, методы ВПС используются параллельно с другими методами проверки и не отменяют необходимости подтверждения биологической значимости обнаруженного организма.

Вследствие ограничений, присущих традиционным методам диагностики, необходимо разработать новые, действенные, надежные и экономичные методы, позволяющие оперативно исследовать растения и растительные продукты на наличие вирусов и виридов, а также других неподдающихся культивированию или специфичных вредных организмов и получать достоверные результаты, и методы ВПС представляются в этой связи крайне перспективными. В фитосанитарной диагностике также могут применяться меташтрихкодирование или ВПС с амплификацией методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Вышеупомянутый подход к применению ВПС представляется наиболее перспективным для целей диагностики в фитосанитарных целях, в том числе вирусов.

Таким образом, для целей рутинной диагностики методы ВПС могут применяться для: 1) определения статуса вредного организма в регионе в рамках программ надзора, 2) сертификации племенного ядра и растительного материала для размножения, 3) проверки эффективности карантина после ввоза и 4) мониторинга товаров на предмет новых потенциальных карантинных рисков. Использование ВПС представляется перспективным для всех перечисленных видов применения (Al Rwahnih *et al.*, 2015; Hadidi *et al.*, 2016; Rott *et al.*, 2017). Вместе с тем, внедрение данных технологий также чревато трудностями, включая

требования к наличию соответствующей лабораторной инфраструктуры, развитой биоинформатики, обмену данных и их валидации (Olmos *et al.*, 2018).

Трудности, связанные с нормативной и научной сферой

Появление новых технологий чревато появлением новых, связанных с ними трудностей. Для технологии ВПС характерны те же трудности, что и при внедрении других технологий молекулярного детектирования и детектирования на основе методов секвенирования. Вместе с тем, внедрение методов СНП может повлечь серьезные последствия для фитосанитарной сферы. Например, существует риск того, что перемещение растительного материала будет ограничено из-за предполагаемого наличия (ранее неизвестного) микроорганизма, который может оказаться непатогенным для такого растительного материала. Не все организмы, связанные с растениями, относятся к категории вредных; некоторые из них могут являться частью микробиома растения или симбионтами, приносящими пользу растению-хозяину, или условно-патогенными организмами. Поэтому одним из основных критериев использования полногеномного секвенирования в качестве метода диагностирования является обеспечение принятия нормативных решений именно в отношении вредного организма, а не симбионта или условно-патогенного организма. Еще одна проблема связана с тем, что, как и в случае с другими непрямими методами, при применении ВПС выявляются также и нежизнеспособные организмы.

Точное выявление или прогнозирование наличия вредных организмов в результате полногеномного секвенирования представляют собой две отдельные важные проблемы применения данных технологий. Правильное толкование результатов – это еще одна трудная задача при использовании метода ВПС. Требуется наличие очень обширной и хорошо проработанной базы данных целых геномов или штрих-кодов известных вредных организмов и микроорганизмов, с которой можно было бы сопоставить полученную с помощью ВПС информацию о генетических основаниях. Учитывая возросшие темпы открытия новых микроорганизмов, перед НОКЗР встает трудная задача принятия решения о биологическом значении такого открытия, например, о способности такого микроорганизма инфицировать растения или растительные продукты на основе анализа полинуклеотидов и в отсутствие полной информации (или даже ее полного отсутствия). Данный вид диагностики отличается от других видов определения патогенности тем, что ставит вопрос о том, являются ли полученные данные признаком присутствия реального живого патогенного биологического организма, относящегося к числу карантинных, и как следствие, требует принятия соответствующего решения. Схожая проблема встает и при применении молекулярных методов и методов секвенирования первого поколения, в особенности в случае с "неизвестными науке" вирусами. Другие трудности, связанные с использованием методов ВПС для целей регулирования, отмечены в работах Martin *et al.* (2016). (2016 г.), Massart *et al.* (2017) и Olmos *et al.* (2018).

Для того, чтобы НОКЗР с большей готовностью внедряли методы ВПС для диагностики вредных организмов, необходимо гармонизировать подходы на международном уровне, в том числе разработать оперативные руководства по применению ВПС, обеспечивающие стабильное получение надежных результатов, включая контроль качества и валидацию полученных с помощью ВПС данных (Boonham *et al.*, 2014). Кроме того, необходимо провести валидацию метода и его сравнение с уже применяемыми методами с учетом их ограничений. Методы ВПС требуют тщательного валидирования в отношении каждого вредного организма-мишени и матрицы на предмет подтверждения их соответствия целевому назначению. Необходимо разработать лабораторные протоколы, включая описание порядка подготовки образцов, анализа полученных данных и используемых баз данных.

Международное сотрудничество

В различных регионах мира идет осуществление ряд инициатив по исследованию применения методов ВПС для фитосанитарной диагностики (например, в Австралии, Европе и Северной Америке). В рамках этих инициатив также ведется обсуждение возможных сопутствующих мер политики. Для обеспечения своевременной разработки единых международных стандартов применения методов ВПС в целях регулирования следует принять во внимание результаты этих инициатив.

Библиография

- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C. & 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.
- Barrero, R.A., Napier, K.R., Cunnington, J., Liefting, L., Keenan, S., Frampton, R.A., Szabo, T., et al.** 2017. An internet-based bioinformatics toolkit for plant biosecurity diagnosis and surveillance of viruses and viroids. *BMC Bioinformatics*, 18: 26.
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Plugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J., & Mumford, R.** 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. *Virus Research*, 186: 20–31.
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T. & Barba, M.** 2016. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1325.
- Mackie, J., Liefting, L., Barrero, R.A., Dinsdale, A., Napier, K.R., Blouin, A.G., Woodward, L. et al.** 2017. Comparative diagnosis of viral pathogens using side-by-side trials of existing post entry quarantine and small RNA next generation sequencing methods. Abstract, Plant Biosecurity Cooperative Research Centre conference on Science Protecting Plant Health, 23–28 September 2017, Brisbane, Australia. См.: <http://apps-2017.p.yrd.currinda.com/days/2017-09-26/abstract/4017> (по состоянию на 21 октября 2018 года).
- Martin, R.R., Constable, F. & Tzanetakis, I.E.** 2016. Quarantine regulations and the impact of modern detection methods. *Annual Review of Phytopathology*, 54: 189-205.
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J.-S. et al.** 2017. A framework for the evaluation of biosecurity, commercial, regulatory and scientific impacts of plant viruses and viroids identified by NGS technologies. *Frontiers in Microbiology*, 8: 45.
- Olmos, A., Boonham, N., Candresse, T., Gentit, P., Giovani, B., Kutnjak, D., Liefting, L., et al.** 2018. High-throughput sequencing technologies for plant pest diagnosis: challenges and opportunities. *EPPO Bulletin*, 48: 219–224.
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S., et al.** 2017. Application of next generation sequencing for diagnostic testing of tree fruit viruses and viroids. *Plant Disease*, 101: 1489–1499.