

Zastosowanie sekwencjonowania wysokoprzepustowego w weterynarii

✉ ALEKSANDRA GIZA¹, ✉ EWELINA IWAN¹, ✉ DARIUSZ WASYL^{1,2}

¹Zakład Analiz Omicznych, ²Zakład Mikrobiologii,

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 11.10.2021

Zaakceptowano 30.11.2021

Giza A., Iwan E., Wasyl D.

Application of high throughput sequencing in veterinary science

Summary

High throughput sequencing (HTS) creates an opportunity for comprehensive genomic studies. It can be applied in veterinary science, bacteriology and virology, diagnostics of animal diseases, food safety, examinations of the composition of environmental samples, and even in veterinary vaccinology. Thus HTS a wide-ranging method that can be applied in different areas of the One Health approach. In particular, the whole genome sequencing (WGS) of bacteria is routinely used in food hygiene and outbreak investigations for phylogenetic analysis of pathogenic bacteria isolated from various sources across timeline, molecular characterisation of bacteria, plasmids, antibiotic resistance and identification of virulence factors. Metagenomics can be used to characterize the composition of microbiota in environmental samples. It makes it possible to obtain a taxonomic identification of bacteria, fungi or plants present in a metasample. It can also be used for the monitoring and epidemiological tracing of viruses, such as SARS-CoV-2. The transcriptomic approach makes it possible to study the expression of genes associated with various infections and diseases. HTS is a highly versatile method, but the selection of the proper application is crucial to obtain expected outcomes. The paper presents some HTS approaches and examples of research in veterinary science.

Keywords: high throughput sequencing, whole genome sequencing, metagenomics, transcriptomics

Opracowanie przez Fredericka Sangera i jego współpracowników techniki sekwencjonowania materiału genetycznego otworzyło erę badań molekularnych. Sekwencjonowanie stwarza możliwość poznawania, charakterystyki i porównywania organizmów na poziomie genów i ich ekspresji. W 1990 r. rozpoczęto projekt sekwencjonowania ludzkiego genomu, który trwał 15 lat (14). Jednym z efektów tego przedsięwzięcia był rozwój nowych technologii, zwanych sekwencjonowaniem następnej generacji (Next Generation Sequencing; NGS) lub inaczej sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym (High Throughput Sequencing; HTS) (12). Technologia ta pozwala na poznanie sekwencji całych genomów i transkryptomów, a co za tym idzie – ich analizy pod kątem zróżnicowania, pokrewieństwa, ekspresji genów czy składu materiału genetycznego obecnego w próbce. Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie z powodzeniem znajduje zastosowanie w wielu dziedzinach nauki, między innymi w genomice mikroorganizmów, biologii ewolucyjnej oraz diagnostyce, medycynie spersonalizowanej i badaniu podłoża genetycznego chorób. Prezentowana praca ma na celu przedstawienie możliwości wykorzystania HTS w różnych obszarach weterynarii.

Sekwencjonowanie polega na odczytywaniu i wygenerowaniu cyfrowego zapisu sekwencji badanego materiału genetycznego. HTS jest narzędziem uniwersalnym, jednakże aby w pełni wykorzystać potencjał techniki, należy zdefiniować cel badań i wybrać odpowiednie podejście metodyczne, konieczne do jego wykonania.

Sekwencjonowanie genomowe (WGS) w higienie żywności i mikrobiologii

Zakażenia wywoływane przez mikroorganizmy w obrębie łańcucha żywnościowego są poważnym zagrożeniem zdrowia konsumentów. Jest to obszar, w którym HTS znajduje zastosowanie w podejściu WGS (Whole Genome Sequencing), czyli sekwencjonowania pełnych genomów. Polega ono na odczytywaniu całej informacji genetycznej badanego organizmu. Według European Food Safety Authority (EFSA) bakteryjne zanieczyszczenia żywności pochodzenia zwierzęcego najczęściej wywołują patogeny, takie jak: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., shigatoksyczne szczepy *Escherichia coli* i *Listeria* spp. (9). Sekwencjonowanie genomowe stało się niezwykle przydatne w dochodzeniach epidemiologicznych.

Umożliwia identyfikację źródeł i dróg szerzenia się zakażenia, a także związaną z nimi analizę ryzyka (9).

WGS opiera się na analizie całego genomu, dlatego też jest metodą dokładniejszą i bardziej wiarygodną od dotychczas stosowanych technik typowania molekularnego drobnoustrojów, takich jak np. PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) czy MLVA (Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis). Posiadając odpowiednie referencje (izolaty lub sekwencje *in silico*), sekwencjonowanie wysokoprzepustowe umożliwia precyzyjne ustalenie zależności filogenetycznych pomiędzy bakteriami. Pozwala na porównanie ze sobą izolatów pochodzących z różnych źródeł (np. materiał kliniczny, produkty żywnościowe, etapy procesów produkcyjnych), a także izolowanych z różnych regionów geograficznych i w różnym czasie. Dzięki możliwości wykorzystania do analizy porównawczej sekwencji zgromadzonych w bazach danych można wykryć powiązania przypadków uznawanych wcześniej za sporadyczne i sklasyfikować jako ogniska epidemiczne. WGS umożliwia także identyfikację zagrożeń mikrobiologicznego przez rozpoznanie i charakterystykę genów odpowiedzialnych za wirulencję, oporność na środki przeciwdrobnoustrojowe lub stwierdzenie obecności określonych plazmidów, lub innych mobilnych elementów genetycznych, umożliwiających transfer fragmentów materiału genetycznego pomiędzy bakteriami (16, 32). Analiza taka pozwala na określenie dróg przenoszenia się drobnoustrojów, połączenie czynników przestrzenno-czasowych oraz stworzenie wielokierunkowego modelu transmisji. Takie szczegółowe informacje umożliwią ukierunkowane zarządzanie ryzykiem i precyzyjne działanie odpowiednich organów (9).

Wyniki przeprowadzonego w 2014 r. kolokwium naukowego pt. „Whole Genome Sequencing of food-borne pathogens for public health protection” (<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.EN-743>) wskazały na potrzebę koordynacji przez EFSA i ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) działań na rzecz wykorzystania WGS w ramach koncepcji „Jedno zdrowie” dla poprawy bezpieczeństwa żywności i ochrony zdrowia publicznego. Jednym z przykładowych osiągnięć w tym obszarze było stworzenie bazy danych izolatów *Listeria monocytogenes* pozyskanych z żywności, obszarów jej produkcji oraz od ludzi (23). Charakterystyka epidemiologiczna oparta o dane z WGS umożliwiła np. przeprowadzenie analizy ryzyka wystąpienia *Listeria monocytogenes* w żywności gotowej do spożycia (17, 23).

Dzięki inicjatywie EFSA w 2018 r. zakończono realizację dwóch projektów: ENGAGE i INNUENDO, których celem było wykorzystanie sekwencjonowania wysokoprzepustowego do charakterystyki patogenów pochodzących z żywności dla lepszego zrozumienia sposobu rozprzestrzeniania się zakażeń pokarmowych u ludzi (13, 19). Pierwszy z projektów (<https://www.engage-europe.eu>) opierał się na sekwencjonowaniu

genomowym komensalnych szczepów *Escherichia coli* oraz *Salmonella* spp. Dzięki współpracy ośmiu europejskich instytucji ujednolicono procedury postępowania z próbkami oraz zharmonizowano metodykę wykorzystywaną do bioinformatycznej analizy danych WGS. Ponadto w większości przypadków wykazano korelację genotyp-fenotyp przy określaniu serotypów *Salmonella* spp. oraz wykrywaniu oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (13).

Projekt INNUENDO (<https://sites.google.com/site/theinnuendoproject/>) miał z kolei na celu wykorzystanie WGS w dochodzeniach epidemiologicznych związanych z bakteryjnymi zanieczyszczeniami żywności. W ramach jego realizacji opracowano platformę do analizy, zarządzania, przetwarzania i udostępniania sekwencji genomowych. Dodatkowo wypracowano procedury wykorzystywania wyników WGS w przypadku wystąpienia ognisk epidemicznych (19).

Istnieje wiele przykładów wykorzystania WGS w dochodzeniach epidemiologicznych. Jednym z nich są zakażenia *Salmonella* Agona, odnotowane w pięciu krajach Unii Europejskiej w latach 2014-2018. Większość przypadków pochodziła z Wielkiej Brytanii, gdzie do ogniska zaliczono także kilkadziesiąt przypadków uznawanych wcześniej za sporadyczne. Stwierdzono, że prawdopodobnym źródłem były gotowe do spożycia (ready to eat – RTE) produkty zawierające ogórki. Chociaż nie udało się zidentyfikować pierwotnego źródła zanieczyszczenia w łańcuchu produkcyjnym, to podjęte działania zapobiegawcze, takie jak monitoring żywności RTE i dochodzenia epidemiologiczne przypadków zatrucia po jej spożyciu, pozwoliły ograniczyć skalę ogniska (10).

Technika WGS została zastosowana także w dochodzeniach dotyczących 167 przypadków zakażeń wywołanych przez shigatoksyniczne szczepy *Escherichia coli* (STEC) O157:H7 w Stanach Zjednoczonych w 2019 r. Na podstawie wywiadu epidemiologicznego jako źródło zakażenia wytypowano sałatę rzymską. Wyniki WGS wskazywały na powiązania genetyczne szczepów *Escherichia coli* O157:H7 wyizolowanych od ludzi i z sałaty. Ponadto wykazano, iż ten sam szczep stanowił przyczynę zatrucia warzywami liściastymi w latach 2017 oraz 2018. Wycofanie zanieczyszczonych produktów z obrotu i zaostrożenie zaleceń sanitarnych w łańcuchu produkcji żywności poskutkowało brakiem nowych przypadków (3).

WGS stanowi również praktyczne narzędzie wykorzystywane w mikrobiologii m.in. do charakterystyki szczepów opornych na środki przeciwdrobnoustrojowe (16, 32). Zagrożeniem dla zdrowia publicznego jest wykryty w ostatnich latach plazmidowy gen *mcr-1*, kodujący oporność na kolistynę. Przeprowadzone badania potwierdziły zarówno występowanie tego genu u szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych od zwierząt w Polsce, jak też fakt, że oporność ta pozostałaby niewykryta przy użyciu tylko metod fenotypowych (38). Użyteczność sekwencjonowania genomowego

sprawiła, iż w perspektywie najbliższych lat WGS może być stosowane w badaniach monitoringowych oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe (1).

WGS od niedawna stał się metodą alternatywną w charakterystyce *Salmonella*, szczególnie w odniesieniu do izolatów, których identyfikacja metodami serologicznymi nie powiodła się (2, 9, 16). Potwierdzeniem rosnącej roli sekwencjonowania HTS w nowoczesnej weterynarii są wytyczne Głównego Lekarza Weterynarii, dotyczące wykorzystania sekwencjonowania wysokoprzepustowego (HTS) przez Inspekcję Weterynaryjną.

Metagenomika w badaniach bioty

Tradycyjne metody hodowli mikroorganizmów są czasochłonne i nie zawsze przynoszą oczekiwane rezultaty. Niektórych bakterii nie można wyhodować w warunkach laboratoryjnych, inne z kolei wymagają specjalnych warunków hodowlanych. Technologia HTS w podejściu metagenomicznym daje możliwość sekwencjonowania całkowitego DNA znajdującego się w niejednorodnej próbce (np. wody, kału, ścieków). Pozwala to na określenie składu gatunkowego organizmów obecnych w badanym materiale. Wyróżnić można dwa rodzaje badań: metagenomika typu „shotgun” i metagenomika celowana (np. metataksonomika 16S lub ITS).

Podejście typu „shotgun” (shotgun sequencing) polega na bezpośrednim sekwencjonowaniu całego materiału genetycznego, który znajduje się w próbce. Bezpośrednia metagenomika jest przydatnym narzędziem np. do analizy wszystkich genów oporności obecnych w próbce (tzw. rezystom). Przykładem są badania nad różnorodnością rezystomu brojlerów oraz świń rzeźnych, prowadzone w ramach projektu EFFORT (<http://www. effort-against-amr.eu/>) (25).

Podejście metagenomiczne zostało wykorzystane do pilotażowych badań ścieków miejskich z wielu regionów świata w celu charakterystyki obecnych w nich wirusów (tzw. wiriomu). Zidentyfikowano m.in. sekwencje wirusów z potencjałem epidemicznym, w tym objętych nadzorem pod kątem chorób biegunkowych i neurologicznych, a także wirusów będących pośrednim wskaźnikiem obecności określonych gatunków komarów. Sekwencjonowanie metagenomiczne może stanowić w przyszłości uniwersalne narzędzie do globalnego monitoringu wirusów, jednakże wdrożenie metody do standardowych analiz stanowi duże wyzwanie. Istnieje wiele zmiennych mogących mieć wpływ na wynik badania oraz jego interpretację, stąd konieczna jest wielokierunkowa walidacja metody (26).

Walidacja metod metagenomicznych sekwencjonowania wysokoprzepustowego stanowi niezbędny etap przed ich zastosowaniem w obszarze zdrowia publicznego i zapewnienia bezpieczeństwa w łańcuchu żywnościowym. Realizowany w ramach konsorcjum One Health EJP projekt METASTAVA ([\[onehealth.ejp.eu/jrp-metastava/\]\(https://onehealth.ejp.eu/jrp-metastava/\)\) ma na celu opracowanie referencyjnych danych dla patogenów modelowych, takich jak: HEV, NOV, STEC i bakterie wielooporne. Dane te będą mogły zostać wykorzystane przez laboratoria wdrażające protokoły laboratoryjne i bioinformatyczne do walidacji metod diagnostyki metagenomicznej.](https://</p></div><div data-bbox=)

W trakcie sekwencjonowania „shotgun” generowana jest bardzo duża ilość danych – z próbki metagenomicznej uzyskuje się sekwencje bakteryjne, wirusowe, eukariotyczne i archeonów, jak również dużą frakcję odczytów niezidentyfikowanych. Utrudnia to znacząco późniejszą analizę oraz pociąga za sobą wysokie koszty. Metagenomika wymaga również sekwenatora o wysokiej przepustowości oraz sprzętu komputerowego o dużej mocy obliczeniowej (26). Dostarcza jednak dane, które mogą zostać wykorzystane do różnych analiz. Przykładem mogą być badania Skarżyńskiej i wsp., w których obok analizy genów oporności możliwa była charakterystyka mikrobiomu oraz diety zwierząt dzikich i hodowlanych (31).

Badania metataksonomiczne z kolei są bardziej ukierunkowane, tańsze i mniej problematyczne w kontekście ilości generowanych danych. Dostarczają jednak tylko ograniczoną ilość informacji o badanej próbce. Technika ta pozwala na ilościowe określenie składu bakterii, grzybów lub roślin w próbkach pochodzących np. od ludzi lub zwierząt, z żywności, pasz, wody czy ścieków.

Metataksonomika wykorzystuje geny używane do taksonomicznej klasyfikacji bakterii (16S rRNA – koduje małą podjednostkę rybosomu organizmów prokariotycznych) (34) i grzybów oraz roślin (ITS – Internal Transcribed Spacer – region w rybosomalnym DNA) (4, 33). Te uniwersalne dla wymienionych grup organizmów geny charakteryzują się obecnością regionów ultrakonserwatywnych, wykorzystywanych do konstrukcji starterów oraz ultrazmiennych, które służą do taksonomicznej klasyfikacji. Ukierunkowana na regiony ultrakonserwatywne amplifikacja genu metodą PCR, po której następuje sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów, umożliwia ustalenie składu mikrobiomu oraz procentowego udziału różnych taksonów organizmów w badanej próbce. Niestety, w przypadku wirusów, ze względu na ich olbrzymie zróżnicowanie genetyczne, nie ma sekwencji na tyle konserwatywnej, aby mogła zostać wykorzystana w analizie metataksonomicznej. Z kolei istotne ograniczenia metataksonomiki bakterii wynikają z faktu, że różnice w genie 16S rRNA pomiędzy niektórymi organizmami (np. *Escherichia* i *Shigella*) są niewielkie (6). W konsekwencji wiarygodne analizy są możliwe co najwyżej do poziomu rodzaju, a identyfikacja gatunkowa musi być potwierdzona innymi metodami. Analogicznie, analiza regionu ITS umożliwia identyfikację roślin do poziomu gatunku oraz grzybów do poziomu rodzaju. Zastosowanie dodatkowych markerów genetycznych umożliwia dalsze różnicowanie gatunkowe grzybów.

Nie mają one jednak uniwersalnego zastosowania, gdyż ich użyteczność jest uzależniona od rodzaju grzybów (33). Ograniczeniem badań metataksonomicznych jest również zastosowanie amplifikacji, która może powodować pewne zaburzenie struktury mikrobiomu w sekwencjonowanej próbce, szczególnie jeśli udział procentowy danej grupy bakterii jest niewielki. Kluczowe jest zatem właściwe przygotowanie materiału, dobór metod ekstrakcji kwasów nukleinowych, stosowanie enzymów o dużej wierności (HiFi – high fidelity) oraz wieloetapowa kontrola procesu analitycznego. Metataksonomia jest użyteczną metodą uzupełniającą i wspomagającą tradycyjne metody badawcze.

Metataksonomia z powodzeniem znajduje zastosowanie w obszarach medycyny i weterynarii. Przykładami jej wykorzystania są: badanie składu bioty bakteryjnej i jej zmian u zwierząt wskutek stosowania określonych pasz, suplementów diety lub leczenia. Występowanie niektórych chorób może być również powiązane ze zmianami w strukturze mikrobiomu. Przykładem są badania zespołu oddechowego bydła (BRD, Bovine Respiratory Disease), choroby, której wczesna diagnostyka jest punktem krytycznym skutecznego leczenia. W badaniach metataksonomicznych wykazano różnice w strukturze mikrobiomu płuc i węzłów chłonnych cieląt klinicznie zdrowych i padłych z objawami BRD, wiążąc zachorowania z liczniejszą reprezentacją takich rodzajów bakterii, jak *Mycoplasma* i *Fusobacterium* oraz należących do rodzin *Leptotrichiaceae* i *Pasteurellaceae* (15). Przykładem korelacji pomiędzy składem mikrobiomu a predyspozycją do rozwoju różnych chorób są również pilotażowe badania nad wykorzystaniem mikrobiomu jelit jako czynnika prognostycznego w leczeniu nowotworów płuc (11).

HTS w wirusologii

Technologia HTS stanowi cenne narzędzie do badań nad wirusami, jednak ze względu na niezwykle mały udział materiału wirusowego w stosunku do całkowitego DNA/RNA próbki, bezpośrednie sekwencjonowanie genomu wirusów jest niezwykle trudne. Dzięki HTS uaktualniono wiedzę na temat taksonomii (odkrycie nowych gatunków), rozpowszechniania wirusów oraz ich składu genetycznego. Obszerna wiedza na temat genetyki wirusów umożliwia zrozumienie procesu ich ewolucji. Ma to na celu monitorowanie transmisji patogenu oraz sprawdzenie, czy z biegiem czasu stosowane metody terapeutyczne, szczepionki oraz testy diagnostyczne są nadal efektywne.

Afrykański pomór świń (ASF) jest chorobą, która od kilku lat stanowi poważny problem dla hodowców trzody chlewnej w wielu regionach świata. Chorobę wywołuje ASFV (*African swine fever virus*; ASFV), który w 2014 r. rozprzestrzenił się do krajów Europy, w tym Polski (27). W wyniku sekwencjonowania genomowego polskich izolatów ASFV zidentyfikowano warianty stanowiące markery genetyczne wykorzy-

stywane do śledzenia rozprzestrzeniania się wysoce patogenego genotypu II w Europie. Ponadto analiza dwóch polimorfizmów w genach K145L oraz MGF 505-5R wykazała, iż są one specyficzne dla wszystkich polskich izolatów i na dzień dzisiejszy nie występują w pozostałych krajach europejskich i Chinach, poza jednym szczepem pochodzącym z Ukrainy. Identyfikacja takich wariantów, jak K145L i MGF 505-5R stanowi przydatny marker genetyczny do analizy dróg transmisji w kraju i weryfikacji udziału czynnika ludzkiego w rozprzestrzenianiu się wirusa (20, 21).

Metoda HTS znalazła także zastosowanie w badaniach nad wirusem grypy ptaków (*avian influenza virus*; AIV), który wywołuje sezonowe epidemie i przyczynia się do znacznych strat ekonomicznych. Jest to zróżnicowany patogen, który bytuje u wielu gatunków zwierząt, a niektóre typy mogą stanowić zagrożenie dla ludzi. Zastosowanie HTS w badaniach nad charakterystyką i zmiennością AIV u różnych gospodarzy wykazało, iż adaptacja wirusa do nowego organizmu jest procesem wieloczynnikowym. Udało się potwierdzić ciągłą ewolucję AIV ze względu na większą liczbę i różną lokalizację wykrywanych mutacji w kolejnych pasażach. Złożone populacje wirusowe mają większą zdolność do przetrwania w nowych warunkach środowiskowych, a HTS umożliwia badanie heterogenicznej populacji wirusa, złożonej z tzw. quasispecies (35). Zastosowanie HTS do badań grypy ptaków umożliwiło również obserwowanie ewolucji nisko patogennych szczepów AIV w wysoce patogenne (7, 22, 30), analizę transmisji wirusa (24) oraz badanie adaptacji wirusa do organizmów ssaków (39) lub różnych ptaków (5).

Najbardziej aktualnym przykładem wykorzystania sekwencjonowania w wirusologii weterynaryjnej jest charakterystyka genetyczna wirusa SARS-CoV-2 u norek. Ze względu na duże zagęszczenie i bliski kontakt tych zwierząt na farmach, infekcja w stadach szerzy się bardzo szybko. W rezultacie istnieje ryzyko wytworzenia wariantów wirusa, które potencjalnie mogłyby okazać się bardziej zjadliwe, łatwiejsze w transmisji czy zmienione na tyle, że wymykają się spod kontroli/nadzoru układu immunologicznego, dlatego takie przypadki muszą być dokładnie badane. Zastosowanie HTS pozwoliło na określenie wariantu B.1.1.279, pokrewieństwa filogenetycznego i zmian w genomach SARS-CoV-2 izolowanych od norek. Ponadto wykluczono ich przynależność do tzw. wariantów potencjalnie niebezpiecznych (8).

Transkryptomika w badaniach ekspresji genów

Obecnie coraz większe zainteresowanie wzbudzają badania transkryptomiczne, polegające na analizie sekwencji kodującego RNA – mRNA. Są one nośnikiem, który pozawala na selektywne ujawnienie informacji zapisanej w genomie i jej przepisanie na sekwencję białkową. Na proces ten mogą wpływać sygnały wewnętrzne, pochodzące z komórki lub ze-

wewnętrzne – z otoczenia. Badanie całego lub części takiego transkryptomu pozwala na określenie, które geny w danych warunkach, np. w przypadku infekcji czy choroby ulegają ekspresji, czyli ujawnieniu w postaci fenotypu. Metoda ta stanowi przydatne narzędzie m.in. do badań nad przebiegiem infekcji wirusowych lub opracowywania strategii selekcji pod kątem określonych cech genetycznych zwierząt.

Jedną z metod HTS, dzięki której można badać kodujący RNA, jest tzw. RNA-seq. Technika ta pozwala na ilościowe i jakościowe badanie ekspresji genów. Selektywną odmianą tej techniki jest targeted RNA-seq, polegający na celowanym sekwencjonowaniu określonych regionów RNA, przy użyciu komplementarnych dla nich sond. RNAseq został zastosowany w badaniu mechanizmów oddziaływania wirusa biegunki bydła (*Bovine viral diarrhoea virus*, BVDV) na wrodzoną odporność gospodarza. Ustalono, że zakażenie BVDV osłabia układ immunologiczny gospodarza, poprzez hamowanie ekspresji białek i genów przeciwwirusowych w obrębie układu dopełniacza, przyczyniając się do proliferacji wirusa. Dokonane przy pomocy HTS odkrycia interakcji wirus-gospodarz mogą zostać wykorzystane w zapobieganiu i leczeniu BVD (18).

Nowoczesne technologie dają możliwość badania skorelowanej ekspresji genów zarówno wirusa, jak i gospodarza (tzw. dual RNA-Seq), a co za tym idzie – identyfikacji aktywowanych szlaków sygnalizacji, metabolizmu i/lub regulacji. W ciągu 5 lat od wprowadzenia tej metody wykonano wiele modeli infekcji, wskazując m.in. na rolę mikro RNA (miRNA) jako czynnika regulującego przebieg wzajemnych interakcji w procesie infekcji (37).

RNA-Seq stanowi także użyteczne narzędzie wykorzystywane w genomice zwierząt w celu identyfikacji nowych mutacji oraz transkryptów mogących mieć wpływ na wykształcenie pożądanych cech. Wykrycie potencjalnych wariantów genetycznych może odgrywać istotną rolę w programach selekcji genomowej zwierząt domowych oraz ich hodowli (29). Dzięki analizie RNAseq wykryto specyficzne dla rasy profile transkryptomiczne polskich rodzimych ras bydła (rasy czerwonej – mleczno-mięsnej oraz holsztyno-fryzyskiej – mlecznej) oraz bydła mięsnego Hereford. Zidentyfikowane w trakcie badań markery genetyczne DEG (differentially expressed genes) mogą stanowić przydatne narzędzie do opracowania testów wykorzystywanych do celów polepszenia zasobów genomowych dostępnych dla bydła, w szczególności dla ras mięsnych (28).

Przy użyciu technik HTS istnieje także możliwość badania małego, niekodującego RNA. Są to krótkie fragmenty kwasu rybonukleinowego, które odgrywają istotną rolę w regulacji ekspresji genów, działając zazwyczaj jako represory (biorą udział w wyciszeniu ekspresji). W celu sprawdzenia odpowiedzi kurczą brojlerów na zakażenie wirusem grypy ptaków (AIV)

wykonano głębokie sekwencjonowanie mikro RNA (miRNA – jeden z typów małego RNA) gospodarza. Dzięki temu wygenerowano listę miRNA oraz genów, które są zaangażowane w regulację odpowiedzi gospodarza na infekcję płuc wywołaną AIV u brojlerów (36). MiRNA może potencjalnie stanowić narzędzie diagnostyczne i prognostyczne niektórych chorób. Wiedzę tę można też wykorzystać do stworzenia leków, które poprzez wpływ na regulację procesu represji, mogą hamować rozwój infekcji wirusowej.

Podsumowanie

Nowoczesne techniki sekwencjonowania znajdują zastosowanie w wielu obszarach medycyny, weterynarii, przemysłu i rolnictwa. W szczególności WGS jest coraz częściej wykorzystywane w bakteriologii i higienie żywności, gdzie powoli staje się metodą rutynowo stosowaną w dochodzeniach epidemiologicznych. Analiza metataksonomiczna przedstawia szeroki obraz składu populacji bakteryjnej w badanej próbce, chociaż tradycyjne metody mikrobiologiczne, oparte na hodowli i izolacji poszczególnych mikroorganizmów są nadal kluczowe. Metagenomika i metody tradycyjne mają pewne ograniczenia, przy czym również uzupełniają się wzajemnie. Stwarza to nowy potencjał diagnostyczny dla badań nad bezpieczeństwem żywności oraz w weterynarii.

Metagenomika i transkryptomika są również wykorzystywane w wirusologii do analizy zmienności wirusów, ich ewolucji oraz badania wzajemnych relacji pomiędzy patogenem a gospodarzem w przypadku infekcji.

Duża aplikacyjność techniki HTS wymaga doboru stosownego podejścia analitycznego, zależnego od celu badań, rodzaju próbek oraz możliwości finansowych. Należy również mieć na uwadze, iż obecność badanego genu nie zawsze musi oznaczać jego ekspresję fenotypową. Właściwe wyznaczenie ram eksperymentu oraz wybór odpowiedniego podejścia analitycznego są kluczowe dla uzyskania oczekiwanych rezultatów badań HTS.

Piśmiennictwo

1. Aerts M., Battisti A., Hendriksen R., Kempf I., Teale C., Tenhagen B. A., Veldman K., Wasyl D., Guerra B., Liébana E., Thomas-López D., Belœil P. A.: Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. EFSA J. 2019, 17, 5709.
2. Banerji S., Simon S., Tille A., Fruth A., Fliieger A.: Genome-based Salmonella serotyping as the new gold standard. Sci. Rep. 2020, 10, 4333.
3. Centers for Disease Control and Prevention: Outbreak of E. coli Infections Linked to Romaine Lettuce. 2020, 24.
4. Cheng T., Xu C., Lei L., Li C., Zhang Y., Zhou S.: Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. Mol. Ecol. Resour. 2016, 16, 138-149.
5. Croville G., Soubies S. M., Barbieri J., Klopp C., Mariette J., Bouchez O., Camus-Bouclainville C., Guérin J. L.: Field Monitoring of Avian Influenza Viruses: Whole-Genome Sequencing and Tracking of Neuraminidase Evolution Using 454 Pyrosequencing. J. Clin. Microbiol. 2012, 50, 2881-2887.
6. Devanga Ragupathi N. K., Muthairulandi Sethuvel D. P., Inbanathan F. Y., Veeraraghavan B.: Accurate differentiation of Escherichia coli and Shigella serogroups: challenges and strategies. New Microbes New Infect. 2018, 21, 58-62.

7. Dietze K., Graaf A., Homeier-Bachmann T., Grund C., Forth L., Pohlmann A., Jeske C., Wintermann M., Beer M., Conraths F. J., Harder T.: From low to high pathogenicity – Characterization of H7N7 avian influenza viruses in two epidemiologically linked outbreaks. *Transbound. Emerg. Dis.* 2018, 65, 1576-1587.
8. Domańska-Blicharz K., Orłowska A., Smreczak M., Niemczuk K., Iwan E., Bomba A., Lisowska A., Opolska J., Trębas P., Potyrało P., Kawiak-Sadurska M., Rola J.: Mink SARS-CoV-2 Infection in Poland – Short Communication. *J. Vet. Res.* 2021, 65, 1-5.
9. EFSA Panel on Biological Hazards (EFSA BIOHAZ Panel), Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A., Bolton D., Bover-Cid S., Chemały M., Davies R., De Cesare A., Hilbert F., Lindqvist R., Nauta M., Peixe L., Ru G., Simmons M., Skandamis P., Suffredini E., Jenkins C., Malorny B., Ribeiro Duarte A. S., Torpdahl M., da Silva Felício M. T., Guerra B., Rossi M., Herman L.: Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *EFSA J.* 2019, 17.
10. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control: Multi-country outbreak of Salmonella Agona infections possibly linked to ready-to-eat food. *EFSA Supporting Publications*, 31.07.2018.
11. Grenda A., Iwan E., Krawczyk P., Chmielewska I., Jarosz B., Reszka K., Kucharczyk T., Wojas-Krawczyk K., Gil M., Słomiany-Szwarc M., Bomba A., Wasyl D., Milanowski J.: The search for causes of resistance to pembrolizumab in lung adenocarcinoma with PD-L1 expression – focus on intestinal microbiome. *Oncol. Clin. Pract.* 2020, 16, 1-5.
12. Heather J. M., Chain B.: The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 2016, 107, 1-8.
13. Hendriksen R. S., Karlsmose Pedersen S., Leekitcharoenphon P., Malorny B., Borowiak M., Battisti A., Franco A., Alba P., Carfora V., Ricci A., Mastroilli E., Losasso C., Longo A., Petrin S., Barco L., Wolkowicz T., Gierczyński R., Zacharczuk K., Wolaniuk N., Wasyl D., Zajac M., Wieczorek K., Póltorak K., Petrovska-Holmes L., Davies R., Tang Y., Grant K., Underwood A., Dallman T., Painset A., Hartman H., Al-Shabib A., Cowley L.: Final report of ENGAGE – Establishing Next Generation sequencing Ability for Genomic analysis in Europe. *EFSA Supporting Publications*, 29.06.2018.
14. International Human Genome Sequencing Consortium: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001, 409, 860-921.
15. Johnston D., Earley B., Cormican P., Murray G., Kenny D. A., Waters S. M., McGee M., Kelly A. K., McCabe M. S.: Illumina MiSeq 16S amplicon sequence analysis of bovine respiratory disease associated bacteria in lung and mediastinal lymph node tissue. *BMC Vet. Res.* 2017, 13, 118.
16. Kürekcü C., Sahin S., Iwan E., Kwit R., Bomba A., Wasyl D.: Whole-genome sequence analysis of Salmonella Infantis isolated from raw chicken meat samples and insights into pESI-like megaplasmid. *Int. J. Food Microbiol.* 2021, 337, 108956.
17. Lachta B., Osek J., Wieczorek K.: Molecular Typing of Listeria monocytogenes Ivb Serogroup Isolated from Food and Food Production Environments in Poland. *Pathogens* 2021, 10, 482.
18. Liu C., Liu Y., Liang L., Cui S., Zhang Y.: RNA-Seq based transcriptome analysis during bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection. *BMC Genomics* 2019, 20, 774.
19. Llarena A. K., Ribeiro-Gonçalves B. F., Silva D. N., Halkilahti J., Machado M. P., Santos Da Silva M., Jaakkonen A., Isidro J., Hämäläinen C., Joenperä J., Borges V., Viera L., Gomes J. P., Correia C., Lunden J., Laukkanen-Ninios R., Fredriksson-Ahomaa M., Bikandi J., San Millan R., Martínez-Ballesteros I., Laorden L., Mäesaar M., Grantina-Ievina L., Hilbert F., Garaizar J., Oleastro M., Nevas M., Salmenlinna S., Hakkinen M., Carriço J. A., Rossi M.: INNUENDO: A cross-sectoral platform for the integration of genomics in the surveillance of food-borne pathogens. *EFSA Supporting Publications*, 26.11.2018.
20. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juszkiewicz M., Woźniakowski G.: The Spillover of African Swine Fever in Western Poland Revealed Its Estimated Origin on the Basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L Genomic Sequences. *Viruses* 2020, 12, 1094.
21. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G.: The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019, 164, 1667-1672.
22. Monne I., Fusaro A., Nelson M. I., Bonfanti L., Mulatti P., Hughes J., Murcia P. R., Schivo A., Valastro V., Moreno A., Holmes E. C., Cattolia G.: Emergence of a Highly Pathogenic Avian Influenza Virus from a Low-Pathogenic Progenitor. *J. Virol.* 2014, 88, 4375.
23. Møller Nielsen E., Björkman J. T., Kiil K., Grant K., Dallman T., Painset A., Amar C., Roussel S., Guillier L., Félix B., Rotariu O., Perez-Reche F., Forbes K., Strachan N.: Closing gaps for performing a risk assessment on Listeria monocytogenes in ready-to-eat (RTE) foods: activity 3, the comparison of isolates from different compartments along the food chain, and from humans using whole genome sequencing (WGS) analysis. *EFSA Supporting Publications*, 23.02.2017.
24. Mulatti P., Fusaro A., Scolamacchia F., Zecchin B., Azzolini A., Zamperin G., Terregino C., Cunial G., Monne I., Marangon S.: Integration of genetic and epidemiological data to infer H5N8 HPAI virus transmission dynamics during the 2016-2017 epidemic in Italy. *Sci. Rep.* 2018, 8, 18037.
25. Munk P., Knudsen B. E., Lukjancenka O., Ribeiro Duarte A. S., Van Gompel L., Luiken R. E., Smit L. A., Schmitt H., Garcia A. D., Hansen R. B., Petersen T. N., Bossers A., Ruppé E., EFFORT Group, Lund O., Hald T., Pamp S. J., Vigre H., Heederik D., Wagenaar J. A., Mevius D., Aarestrup F. M.: Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nat. Microbiol.* 2018, 3, 898-908.
26. Nieuwenhuijs D. F., Oude Munnink B. B., Phan M. V. T., the Global Sewage Surveillance project consortium, Munk P., Venkatakrishnan S., Aarestrup F. M., Cotton M., Koopmans M. P. G.: Setting a baseline for global urban virome surveillance in sewage. *Sci. Rep.* 2020, 10, 13748.
27. Olesen A. S., Lohse L., Dalgaard M. D., Woźniakowski G., Belsham G. J., Botner A., Rasmussen T. B.: Complete genome sequence of an African swine fever virus (ASFV POL/2015/Polaskie) determined directly from pig erythrocyte-associated nucleic acid. *J. Virol. Methods* 2018, 261, 14-16.
28. Pareek C. S., Sachajko M., Jaskowski J. M., Herudzińska M., Skowronski M., Domagalski K., Szczepanek J., Czarnik U., Sobiech P., Wýsocka D., Pierzchała M., Polawska E., Stepanow K., Ogluszka M., Juszczyk-Kubiak E., Feng Y., Kumar D.: Comparative Analysis of the Liver Transcriptome among Cattle Breeds Using RNA-seq. *Vet. Sci.* 2019, 6, 36.
29. Pareek C. S., Smoczyński R., Kadarmideen H. N., Dziuba P., Błaszczak P., Sikora M., Walendzik P., Grzybowski T., Pierzchała M., Horbańczuk J., Szostak A., Ogluszka M., Zwierzchowski L., Czarnik U., Fraser L., Sobiech P., Wąsowicz K., Gelfand B., Feng Y., Kumar D.: Single Nucleotide Polymorphism Discovery in Bovine Pituitary Gland Using RNA-Seq Technology. *PLoS One* 2016, 11.
30. Seekings A. H., Slomka M. J., Russell C., Howard W. A., Choudhury B., Nuñez A., Löndt B. Z., Cox W., Ceeraz V., Thorén P., Irvine R. M., Manvell R. J., Banks J., Brown I. H.: Direct evidence of H7N7 avian influenza virus mutation from low to high virulence on a single poultry premises during an outbreak in free range chickens in the UK, 2008. *Infect. Genet. Evol.* 2018, 64, 13-31.
31. Skarżyńska M., Leekitcharoenphon P., Hendriksen R. S., Aarestrup F. M., Wasyl D.: A metagenomic glimpse into the gut of wild and domestic animals: Quantification of antimicrobial resistance and more. *Plos One* 2020, 15.
32. Skarżyńska M., Zajac M., Bomba A., Bocian L., Kozdrub W., Polak M., Wiącek J., Wasyl D.: Antimicrobial Resistance Glides in the Sky – Free-Living Birds as a Reservoir of Resistant Escherichia coli With Zoonotic Potential. *Front Microbiol.* 2021, 12, 656223.
33. Stielow J. B., Lévesque C. A., Seifert K. A., Meyer W., Iriny L., Smits D., Renfurm R., Verkley G. J. M., Groenewald M., Chaduli D., Lomascolo A., Welti S., Lesage-Meessen L., Favel A., Al-Hatmi A. M. S., Damm U., Yılmaz N., Houbraken J., Lombard L., Quaedvlieg W., Binder M., Vaas L. A. I., Vu D., Yurkov A., Begerow D., Roehl O., Guerreiro M., Fonseca A., Samerpitak K., van Diepeningen A. D., Dolatabadi S., Moreno L. F., Casaregola S., Mallet S., Jacques N., Roscini L., Egidi E., Bizet C., Garcia-Hermoso D., Martín M. P., Deng S., Groenewald J. Z., Boekhout T., de Beer Z. W., Barnes I., Duong T. A., Wingfield M. J., de Hoog G. S., Crous P. W., Lewis C. T., Hambleton S., Moussa T. A. A., Al-Zahrani H. S., Almaghrabi O. A., Louis-Seize G., Assabgui R., McCormick W., Omer G., Dukik K., Cardinali G., Eberhardt U., de Vries M., Robert V.: One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia* 2015, 35, 242-263.
34. Sturgeon A., Stull J. W., Costa J. M. C., Weese J. S.: Metagenomic analysis of the canine oral cavity as revealed by high-throughput pyrosequencing of the 16S rRNA gene. *Vet. Microbiol.* 2013, 162, 891-898.
35. Świętoń E., Olszewska-Tomczyk M., Giza A., Śmietanka K.: Evolution of H9N2 low pathogenic avian influenza virus during passages in chickens. *Infect. Genet. Evol.* 2019, 75, 103979.
36. Wang Y., Brahmakshatriya V., Lupiani B., Reddy S. M., Soibam B., Benham A. L., Gunaratne P., Liu H.-C., Trakooljul N., Ing N., Okimoto R., Zhou H.: Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers. *BMC Genomics* 2012, 13, 278.
37. Westermann A. J., Barquist L., Vogel J.: Resolving host-pathogen interactions by dual RNA-seq. *PLoS Pathog.* 2017, 13.
38. Zajac M., Sztromwasser P., Bortolaia V., Leekitcharoenphon P., Cavaco L. M., Ziętek-Barszcz A., Hendriksen R. S., Wasyl D.: Occurrence and characterization of mer-1-positive Escherichia coli isolated from food-producing animals in Poland, 2011-2016. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1753.
39. Zaraket H., Baranovich T., Kaplan B. S., Carter R., Song M. S., Paulson J. C., Rehg J. E., Bahl J., Crumpton J. C., Seiler J., Edmonson M., Wu G., Karlsson E., Fabrizio T., Zhu H., Guan Y., Husain M., Schultz-Cherry S., Krauss S., McBride R., Webster R. G., Govorkova E. A., Zhang J., Russell C. J., Webby R. J.: Mammalian adaptation of influenza A(H7N9) virus is limited by a narrow genetic bottleneck. *Nat. Commun.* 2015, 6, 6553.