Обобщени резултати от Първата в България международна научно-практична конференция за приложението на секвенирането от следващо поколение/NGS/ при идентификация на патогенни микроорганизми в контаминирани храни и техния генотипен анализ чрез т.нар. метагеномно секвениране в Риу Правец 2019

ELTA'90
More than Technology

local South Korea company, BMS, where he held roles as a product manager, application specialist and territory sales. Augustine has also held roles as a Sr. Sales and Application Specialist for Instruments with QIAGEN and as an Integrated Solutions (Instruments) Product Manager and Instrument Application Team Leader. In his free time, Augustine enjoys spending time with his 6 year old fraternal twins.

Success Story

Next-Generation Scientists

Together, Elta90 and Illumina gathered 71 qualified potential customers in Sofia, Bulgaria to participate in the first EMEA Emerging Markets "Next-Generation Scientists" workshop. The full-day event brought together scientists and bioinformaticians focused on microbiology and food safety from a wide range of institutions, including the National Center of Infectious and Parasitic Diseases, Bulgarian Agency of Food Safety, Military Academy of Bulgaria, and many more. Continue reading.

Product Updates & Announcement

Infinium™ HTS Extra Assay for high throughput array processing—available now

The Infinium HTS Extra Assay is a new reagent kit configuration and associated high-throughput workflow for laboratories processing hundreds of thousands to millions of samples per year on 24-sample HTS format arrays.

СЪДЪРЖАНИЕ:

1. ЕЛТА 90 като представител на световният Номер 1 производител на NGS – Illumina Inc. за 10 държави – Активности
2. Първа по рода си научно-практична конференция по безопасност на храни проведена в края на м. Март 2019г. В хотел Риу Правец
3. Въвеждане в технологията – Illumina Inc.
4. Имплементиране на Цяло-геномното микробно секвениране в лаб. мрежа на FDA и CDC. Метагеномно и 16S рибозомално секвениране.

ELTA'90

More than Technology

NextSeq™ 550
Thank you

NGS Апарати през 2018 в Сърбия

Institut za nuklearne nauke Vinča

KLINIČKI CENTAR SRBIJE

Катедра Неврология

ELTA'90
More than Technology

Над 70 участника от България, Румъния, Сърбия, Македония и САЩ. Представители на следните институции – НЦЗПБ, ВМА, НСО, БАБХ, НДНИВМИ и др. За първи път в източна и централна Европа. Приветствени думи и пожелания за водеща роля на страната ни от Проф. Д-р Т. Кантарджиев – Директор на НЦЗПБ.

ELTA'90
More than Technology

ELTA'90

More than Technology

Видове Секвенционни апарати – Illumina NGS

SEQUENCING SYSTEMS | Sequencing by Synthesis (SBS)

POPULATION POWER

HiSeq X™ Ten

HiSeq X Five

NovaSeq™ 6000

PRODUCTION POWER

HiSeq® Series

FLEXIBLE POWER

NextSeq™ 550

NextSeq™ 550Dx

FOCUSED POWER

MiSeq®

MiSeqDx™
For *in vitro* diagnostic use

MiniSeq™

iSeq™ 100

ARRAY SCANNERS | BeadArray, Infinium

ARRAY SCANNER

iScan

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Next Generation Sequencing vs. Sanger Sequencing

Data Output Comparison

Еволюцията на NGS апаратите

2007

Illumina Genome Analyzer

1 Gbp in 2-4 days, 2x35bp, US$400K, 187kg

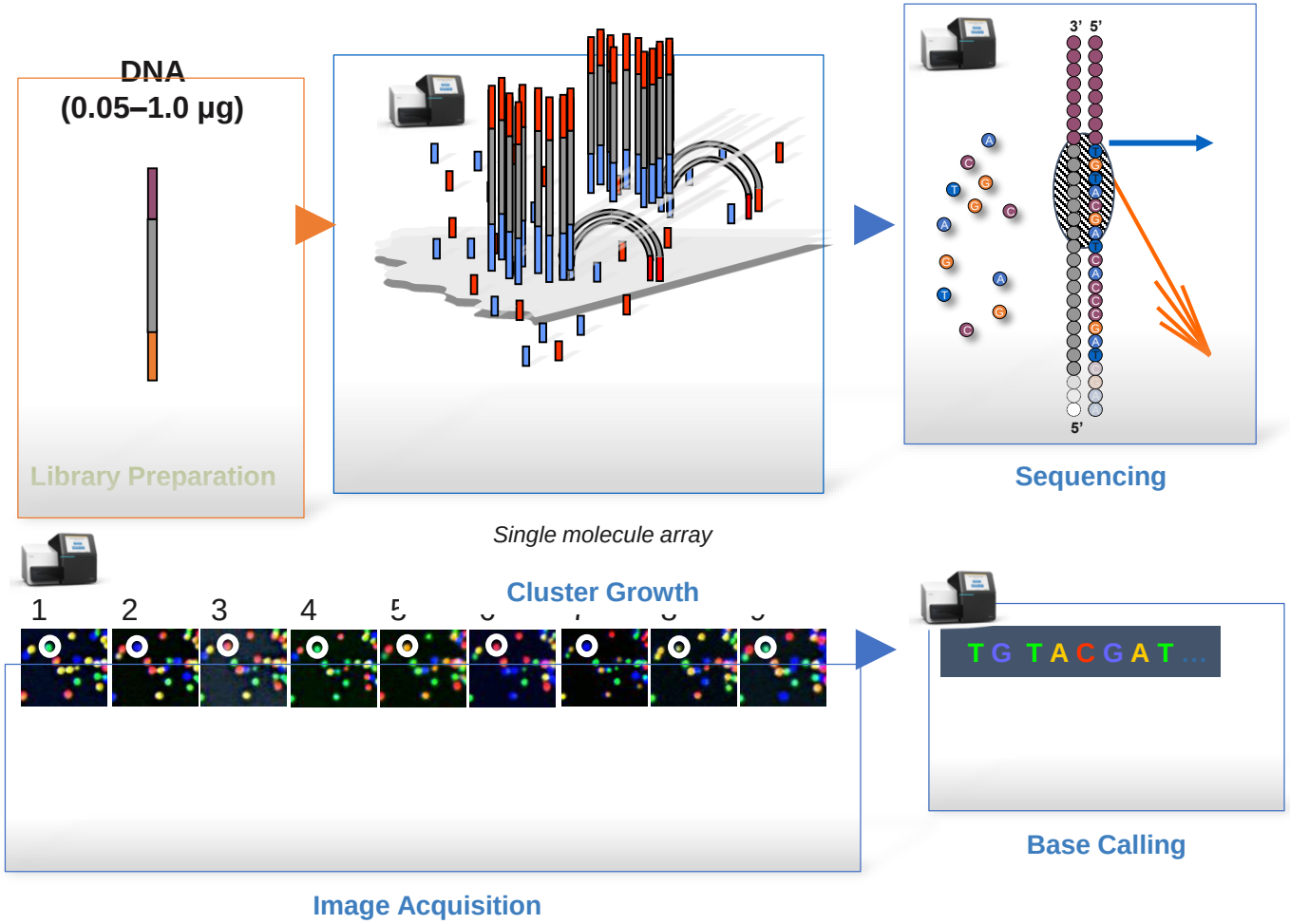
(+ cluster station!)

2019

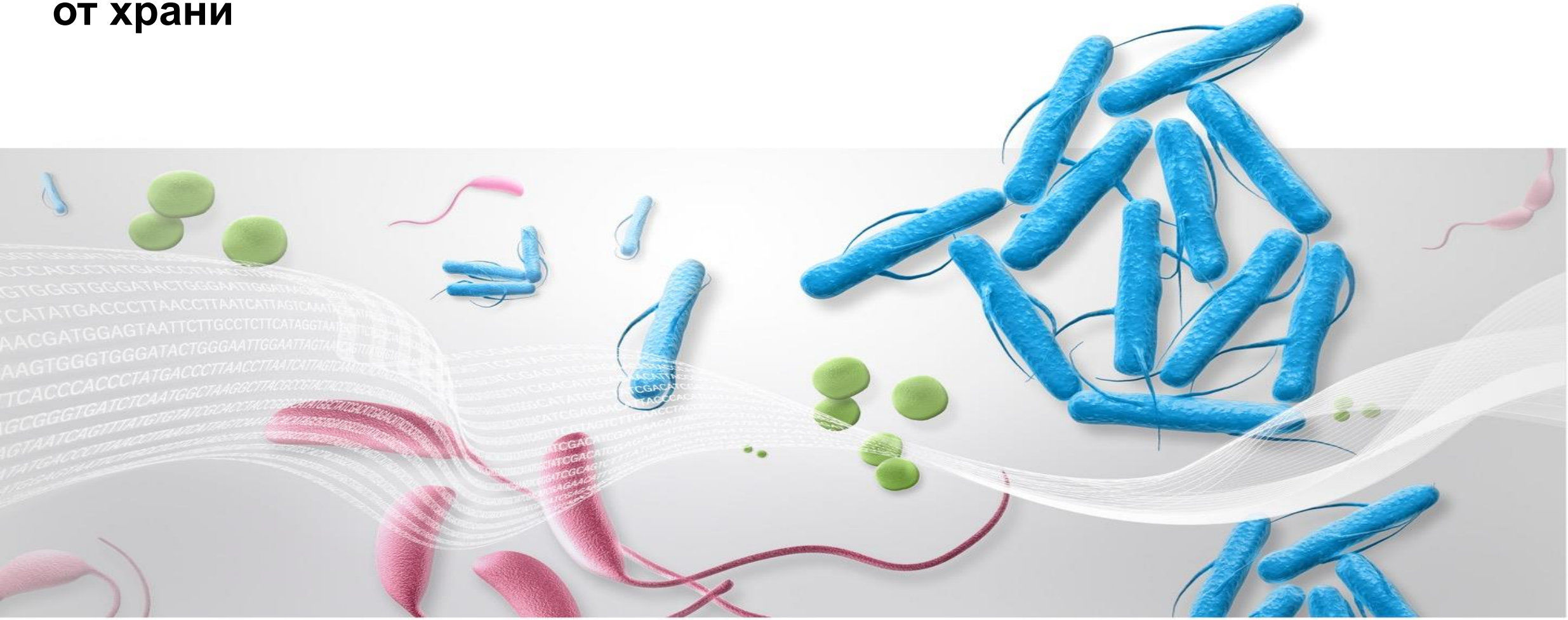
Illumina iSeq 100

1.2 Gbp in 17 hours, 2X150bp, 16kg

Секвениране чрез синтеза



NGS за идентифициране на патогени от храни



© 2017 Illumina, Inc. All rights reserved.

illumina®

Традиционни методи срещу NGS

Ново-Генерационното секвениране (NGS)
дава възможност за откриване и анализ на патогени без хипотези

Предизвикателства пред традиционните методи

- Необходими са предварителни хипотези за бактериални или вирусни таргети
- Липса на чувствителност за откриване на много ниска концентрация на бактерии / вирусна ДНК или РНК на фона на гостоприемника
- При вируси, PCR тестовете стават неефективни с течение на времето поради дрейфа на антигена
- Малкък капацитет на проби за изследване

Предимства на NGS

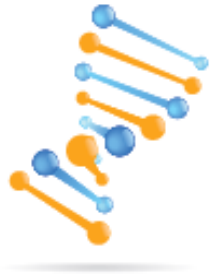
- Без хипотезно детектиране на патогени
- **Висока чувствителност,** способност да предоставят информация за ко-инфекция, квази видове и нови бактерии или вируси
- **Данни с висока резолюция** за геномно сравнение и характеризиране
- **Мултиплексиране** на много проби
- Осигурява метагеномно изучаването на връзките между **патоген-гостоприемник**

Каква е важността да бъдеш прав?
Социални и търговски усложнения

- 2011 Немската Shiga Toxin *Escherichia coli* епидемия -пример
- Традиционните културелни, но и PCR методи погрешно обвиниха Испанските краставици като източник за развитие на фаталната епидемия от *Escherichia coli*
- Тези краставици наистина съдържаха патогенната Shiga toxin *E. coli* бактерия но не от същият вирулентен щам причинил епидемията
- EU заплати компенсации от €227M на производителите на краставици

4 ключови метода в Микробиологията

Цяло-Геномно Секвениране



Генерира точни референтни геноми за прецизна микробна идентификация

Шотгън Метагеномика

Без-хипотезна детекция на много малко количество членове на колонии представени в едно микробно съобщество

16S rRNA метагеномика

Идентифицира и сравнява бактерии налични в дадена проба

Вириомика

Определя източника на инфекция, пътя на трансмисия и молекулни пътеки

FDA избра MiSeq® на Illumina Inc. Като основни платформи за Секвениране от Следващо Поколение с оглед идентифициране на патогени в хранителната верига – Безопасност на храни

Food Safety News

Breaking news for everyone's consumption

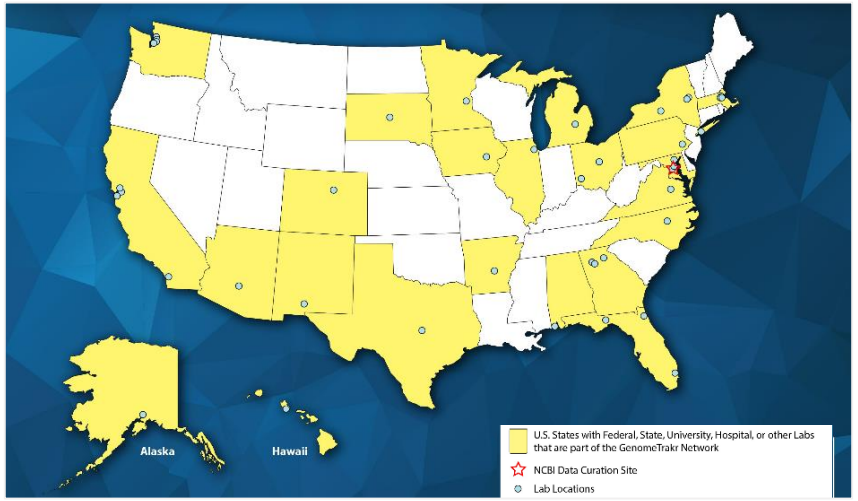
Home | Foodborne Illness Outbreaks | Food Recalls | Food Politics | Events | Subscribe | About

FDA Spends $17 Million to Go After Pathogens Faster

BY NEWS DESK | SEPTEMBER 19, 2012

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) is spending $17 million on technology it hopes will be fast enough to catch fresh produce with pathogen contamination.

FDA has awarded a five-year contract to Illumina Inc, a San Diego-based technology company involved in accelerating genetic research. Illumina will provide FDA with its MiSeq sequencing systems and reagents for conducting whole genome analysis on produce and produce-related environmental Salmonella and shigatoxigenic E. coli.



Genome Trakr Network[1]

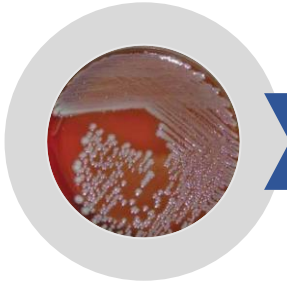
- Първа по рода си мрежа от лаборатории за WGS между щатско, федерално и университетско ниво за идентификация на патогенни микроорганизми
- Секвениране на патогени събрани от епидемични взривове , контаминирани хранителни продукти, както и от околната среда
- Информацията се събира в публично достъпна база от данни към NCBI където се и архивира

http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/WholeGenomeSequencingProgramWGS/ucm363134.htm

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

FDA Протокол

Приложение: Бактериално WGS от култура



Растеж на култура посявка

Подготовка на пробата

Лизиране на бактериалните клетки от културата

Екстрахиране на геномно ДНК

Nextera® подготовка на библиотеките

Nextera Flex DNA

MiSeq® and primary analysis

MiSeq® workflow

2 x 250 рамка на четене

Генериране на FASTQ

BaseSpace®

Информацията се изпраща към FDA или BaseSpace® за съхранение и споделяне в FDA и качване в NCBI SRA информационна база данни и анализи

Надзор на заболяванията с хранителен произход

~48m Заболявания с хранителен произход в U.S. Всяка година

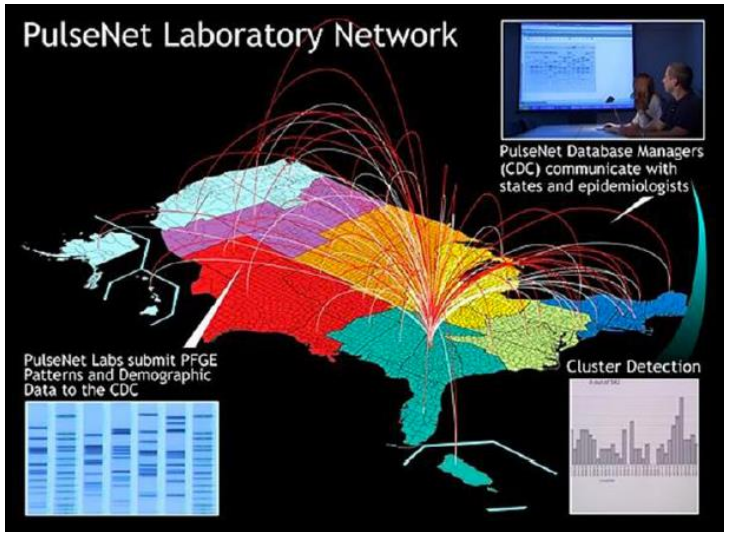
Results: **~128,000** hospital admissions **3,000** deaths

случаи свързани с неразпознати огнища на зараза **>1,000** Епидемии рапортувани годишно

PulseNet, е национална мрежа лаборатории от общественото здравеопазване към регулаторните органи по храните, които играят ключова роля при идентифицирането на **огнища на зараза с хранителен произход**

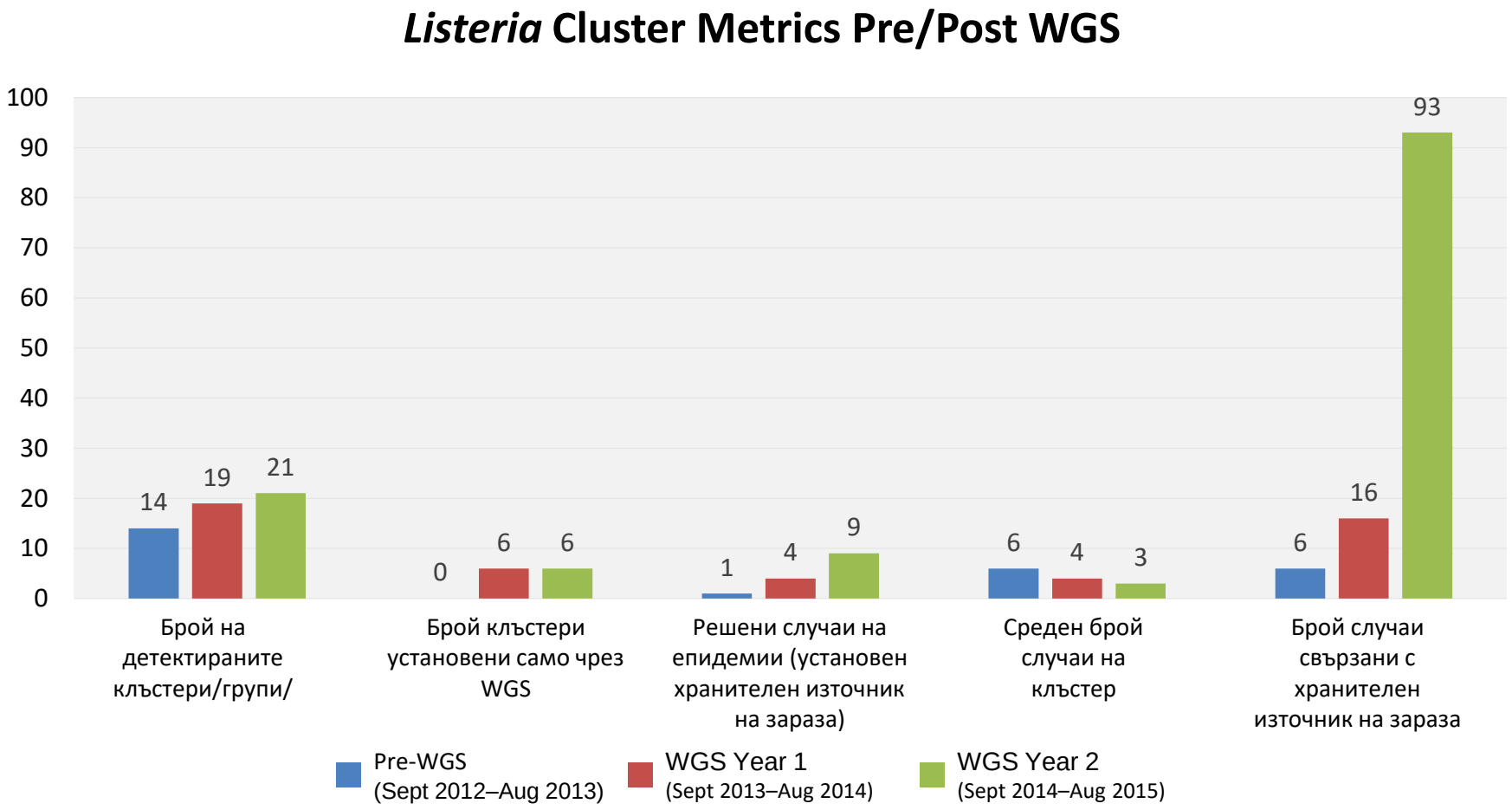
Поатогени/Храни свързани към повечето болести с хранителен произход

- *Campylobacter* (птици)
- *E. coli* O157 (зеленчуци, сурово мляко)
- *Listeria* (не пастьоризирани мека сирена)
- *Salmonella* (яйца, птици, месо, produce)
- *Vibrio* (сурови стриди)
- Norovirus (често срещани в много видове храни)
- *Toxoplasma* (меса)



Adapted From: Slide courtesy of Duncan MacCannell, CDC

Как Illumina прави разликата в безопасността на храните



Adapted From: Jackson et al. 2016

WGS променя науката за безопасност на храните

WGS има потенциала да бъде единствен тест за микробиален сървейлънс / детекция на епидемии замествайки множество методи	• Класическо серотипиране • PFGE и други видово типизиращи методи • In vivo антимикробна чувствителност • PCR генна детекция и плазмидно типизиране

И да осигури:

- Геномен нуклеотиден сървейланс
- Профил на вирулентност
- Молекулно типизиране
- Маркери за източника на епидемията
- По-добро разбиране за развитието на епидемията
- Спестяващо средства

Adapted From: Slide courtesy of D. White, FDA

Мониторинг на епидемиите

NGS SOP & GenomeTrakr База данни → **Дистрибуция в US, Партниране със CDC** → **Глобална дистрибуция**

Food Safety News

Breaking news for everyone's consumption

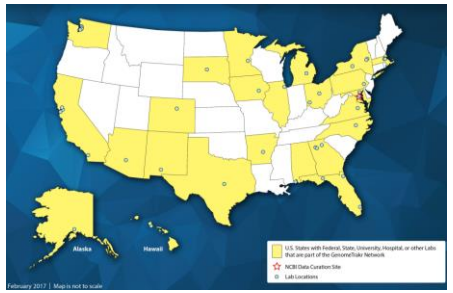
Home | Foodborne Illness Outbreaks | Food Recalls | Food Politics | Events | Subscribe | About

FDA Spends $17 Million to Go After Pathogens Faster

BY NEWS DESK | SEPTEMBER 19, 2012

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) is spending $17 million on technology it hopes will be fast enough to catch fresh produce with pathogen contamination.

FDA has awarded a five-year contract to Illumina Inc, a San Diego-based technology company involved in accelerating genetic research. Illumina will provide FDA with its MiSeq sequencing systems and reagents for conducting whole genome analysis on produce and produce-related environmental Salmonella and shigatoxigenic E. coli.



PulseNet International

Connects the Dots for FOOD SAFETY

Метод

Цяло-Геномно Секвениране

Приложения

Безопасност на храни

Епидемиология на инфекциозните болести

Проследяване на патогени в храни

Идентичност

USFoodandDrugAdmin. (2017, January 18). FDA's GenomeTrakr. [Video file]. Retrieved from https://www.youtube.com/watch?v=4zMms2C6YUk

WHO ESTIMATES OF THE GLOBAL BURDEN OF FOODBORNE DISEASES

Foodborne diseases in the WHO European Region

Every year

23 million people fall **ill**

5 000 people **die**

Diarrhoeal diseases are responsible for most foodborne illnesses

- **Norovirus infection = almost 15 million cases**
- ***Campylobacter* = nearly 5 million cases**

FOODBORNE DISEASES ARE PREVENTABLE.
EVERYONE HAS A ROLE TO PLAY.

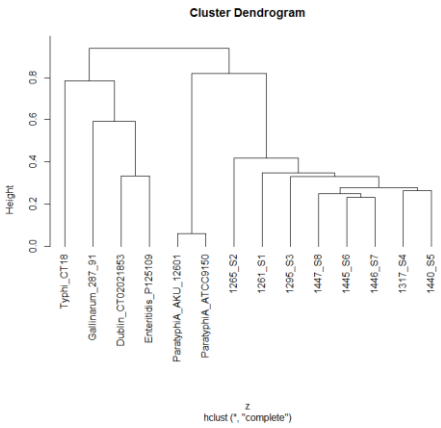
For more information: **www.who.int/foodsafety**

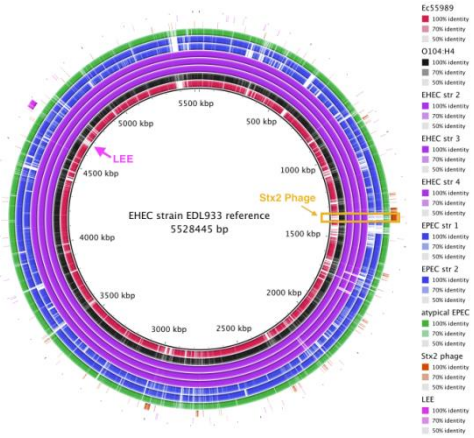
#SafeFood

Source: WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases. 2015.

World Health Organization

Приемуществата на WGS в тестването за безопасност на храните





Детекция на епидемия

- Прецизна детекция на щамово и серотипно ниво
- Дали щамът е известен или принадлежи към непознат или е нов ?
- Придобиване на информация за MLST

Менажиране на епидемии

- Нуклеотидна резолюция за свързване на инфектирана храна с дадените инфектирани пациенти
- Стигане до източника на епидемията
- Превантивни действия

Допълнителен анализ

- Идентификация на гени свързани с токсичност и вирулентност
- Патогенност
- Съществуват ли мутации в гени кодиращи резистентност към антибиотици
- И др.

16S rRNA Sequencing

Анализ на инфекция при неизяснена причина

Работен процес

Sample prep	Library prep	Sequencing	Analysis
Extraction of RNA or DNA	16S protocol Nextera DNA Flex Library Prep Kit	MiSeq® System	Cloud-BaseSpace®, Local MiSeq® Reporter 16S Metagenomics

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

MiSeq® Резултати – пример при проучване чрез 16s метагеномика във вакуумирани храни

Table 2.
16S metagenomic analysis of bacterial community of vacuum-packed ham during refrigerated storage: sequencing statistics and classification results

	Time of Storage (Days)			
Item	3	7	20	30
Total Reads	139,469	137,271	163,861	168,266
Reads Passing Quality Filtering	134,247	132,814	158,658	153,593
Percentage of Reads Passing Quality Filtering	96.3	96.8	96.8	96.0
Classified at Species Level (Total Reads)	48,335	62,897	47,788	49,087
Kingdom Classification Results	1	1	1	1
Phylum Classification Results	10	10	12	11
Class Classification Results	20	18	21	19
Order Classification Results	54	55	52	53
Family Classification Results	86	79	88	106
Genus Classification Results	199	153	167	157
Species Classification Results	404	351	381	290

Adapted from: Piotrowski-Cyplik et al. J Sci Food Agric (2016), DOI 10.1002/jsfa.7785

- Културелен метод е използван паралелно за изброяване на видовете бактерии при т.нар. културелна фракция на микробиома
- Метода с посявка и непълен
- MiSeq® бе използван като т.нар културелно независим метод – Чувствителност 10 бактериални клетки на 1 мл.
- MiSeq® показа тотална детекция на микроорганизмите причиняваща развала на продукта включващи и такива които са трудни за култивиране, латентни и дори некултивируеми микроорганизми.

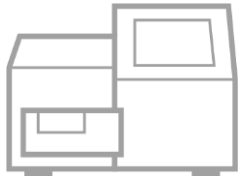
Easy on-instrument analysis of reads to the species level

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Metagenomics Shotgun Sequencing

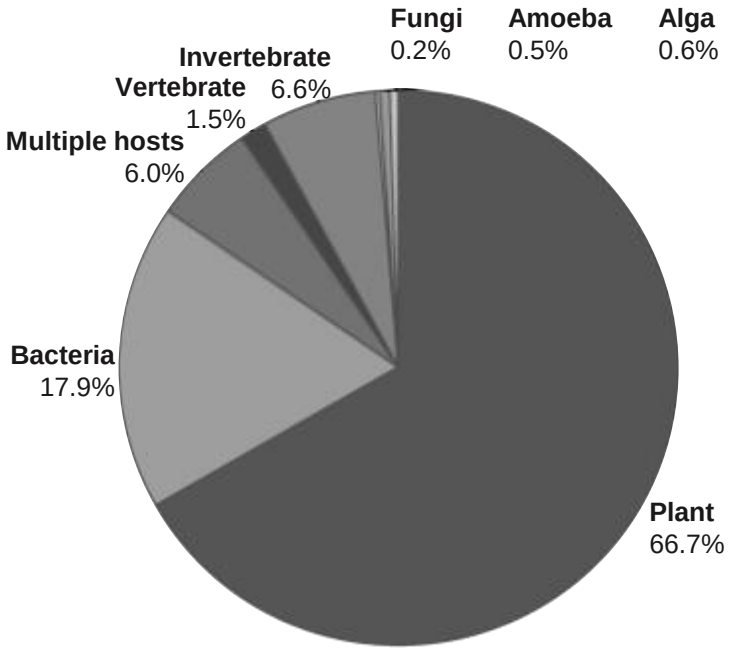
Analysis of the virome associated with fresh produce

Workflow

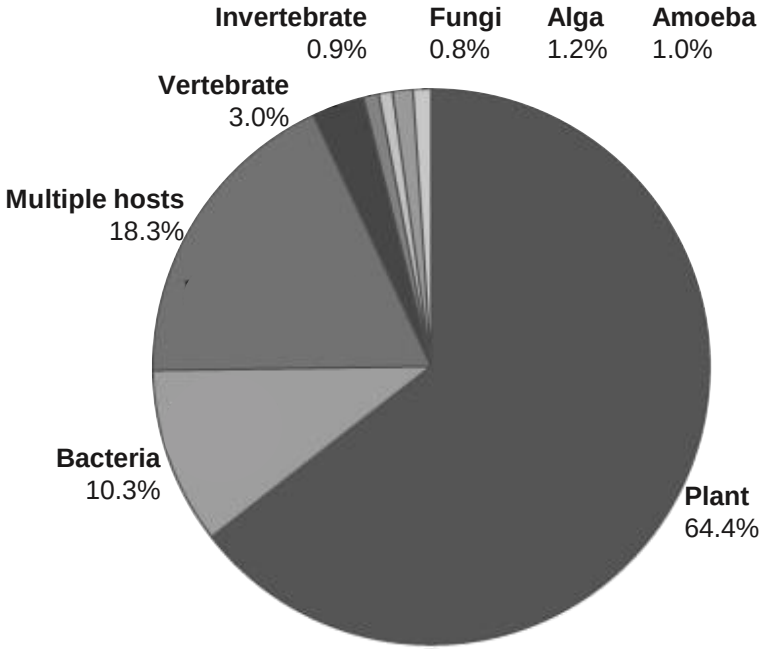
Sample prep	Library prep	Sequencing	Analysis
			
Extraction of RNA (convert to cDNA) or DNA	Nextera DNA Flex Nextera® XT DNA TruSeq® DNA Library Kit	NextSeq® 550 System HiSeq® System NovaSeq® Systems	Cloud-BaseSpace® MetaPhLan

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Romaine Lettuce



Iceberg Lettuce



Човешки и животински вируси от фамилиите **Reoviridae** и ***Picobirnaviridae*** са **установени във всички категории проби** но най-вече от проби взети при марули от дистрибуторските центрове

- Част от Reoviruses са Rotavirus причиняващи гастроентерити
- *Picobirnaviridae* има човешкия picbirnavirus ,който също се асоциира с гастроентерити при животните и човека.

Tiong Gim Aw, et al., https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.008.

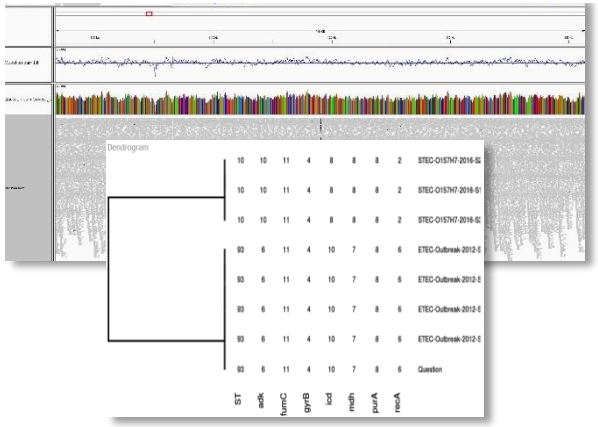
Заключение

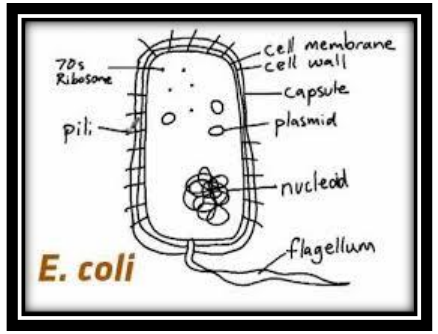
Характаризирането на вириома от маруля и идентификацията на некултивируеми вируси чрез използването на метагеномно секвениране, демонстрира наличието на човешки и животински вируси в марули култивирани на полето.

Идентифицирането на вирусни патогени директно от проби в марули използвайки метода на метагеномното секвениране демонстрира възможността за използването на метода при мониториране на безопасност на храните без предварителна подготовка и очаквания кои именно вируси са налични в пробите. Определя и риска от възникване на трансмисия от контаминирани храни.

Работен процес от началото до края

BaseSpace SEQUENCE HUB

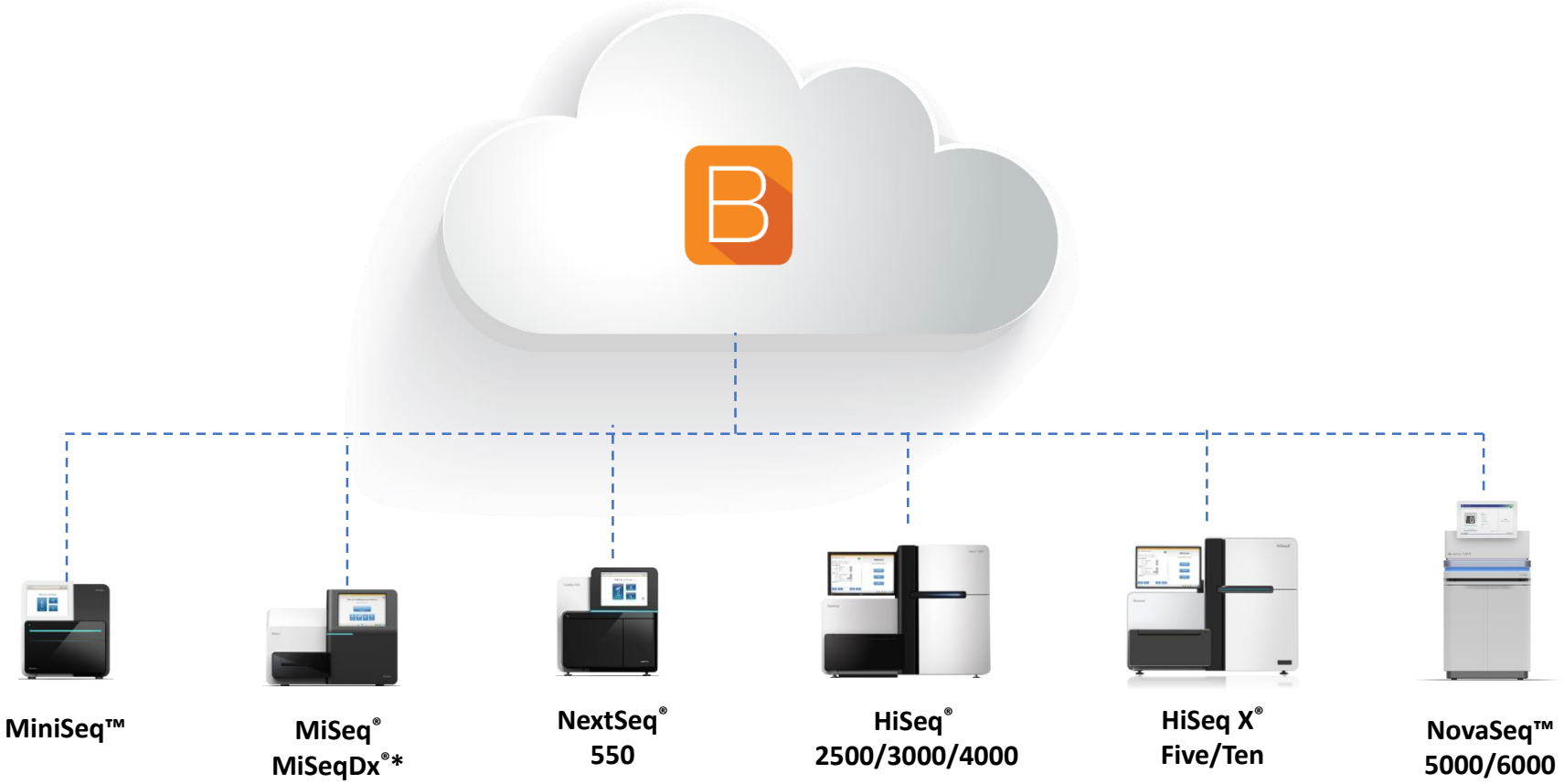




For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

BaseSpace Sequence Hub (BSSH)

Seamless integration with Illumina Sequencing Systems

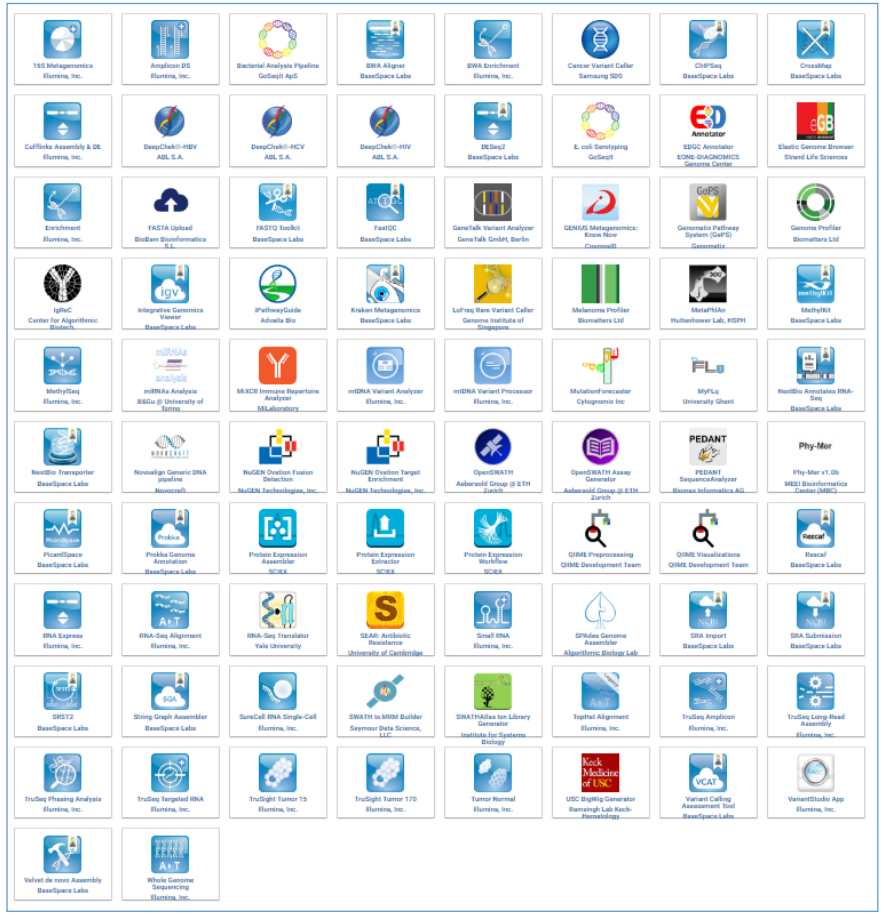


For use only in Research mode of the MISeqDx

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

BaseSpace Apps

>80 Apps covering all the most common NGS applications



Illumina Core, BaseSpace Labs, 3rd party, and private/custom apps

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

BaseSpace Apps For Microbial Characterization

Въпроси….