



ΕΝΩΣΗ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΥ ΠΡΟΣΩΠΙΚΟΥ
ΝΟΣΟΚΟΜΕΙΟΥ «Ο ΕΥΑΓΓΕΛΙΣΜΟΣ» (Ε.Ε.Π.Ν.Ε.)

24^ο Ετήσιο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης Ιατρικής Εκπαίδευσης Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός»

Αθήνα, 18-22 Φεβρουαρίου 2019



Τετάρτη 20 Φεβρουαρίου 2019

17:45-18:45 ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΣΥΜΠΟΣΙΟ:

Εφαρμογή της Τεχνολογίας NGS
(Next - Generation Sequencing)

στην κλινική πράξη

Συντονιστές: Χ.Ταχούλα-Ταπαστεριάδη, Α.Ταράδη

- * Βασικές Αρχές NGS, Δ. Κουνιάκη
- * Εφαρμογή στην HLA τυποποίηση, Α. Ταράδη
- * Εφαρμογή στη διάγνωση αιματολογικών νοσημάτων, Μ. Γαροφαλάκη
- * Εφαρμογή στη Μικροβιολογία

Ε. Περιβολιώτη

Ιατρός Βιοπαθολόγος, Κλινικός Μικροβιολόγος
Μικροβιολογικό τμήμα, ΓΝΑ "Ευαγγελισμός"



24^ο

Ετήσιο Σεμινάριο Συνεχιζόμενης
Ιατρικής Εκπαίδευσης
Νοσοκομείου «Ο Ευαγγελισμός»



Αθήνα, 18 - 22 Φεβρουαρίου 2019

Δεν υπάρχει σύγκρουση συμφερόντων
με τις παρακάτω χορηγούς εταιρείες:

PFIZER, JANSSEN ONCOLOGY, SOFMEDICA,
NOVARTIS, ABBVIE, MSD, WINMEDICA,
GENESIS, ROCHE, TAKEDA, ASTELLAS,
AMGEN, ANGELINI, ANTISEL, SERVIER,
BRISTOL-MYERS SQUIBB, ABBOTT, GILEAD,
SANDOZ, BIANEΞ, RONTIS, MAVROGENIS,
AENORASIS, SPECIFAR, KARYO

(Next Generation Sequencing)

Τεχνολογίες Αλληλούχισης Νέας Γενιάς
Technologies / NGS technologies

High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity

Nicholas J. Loman¹, Chrystala Constantinidou¹,
Mihail Halachev¹, Martin Sergeant¹, Charles
and Mark J. Pallen¹

νέα της μικροβιακής οικολογίας, δεδομένου
ήγηση των μικροβιακών κοινοτήτων μέσω
λουχιών & προσεγγίζουν το πραγματικό
απλότητας μιας μικροβιακής κοινότητας

REVIEWS

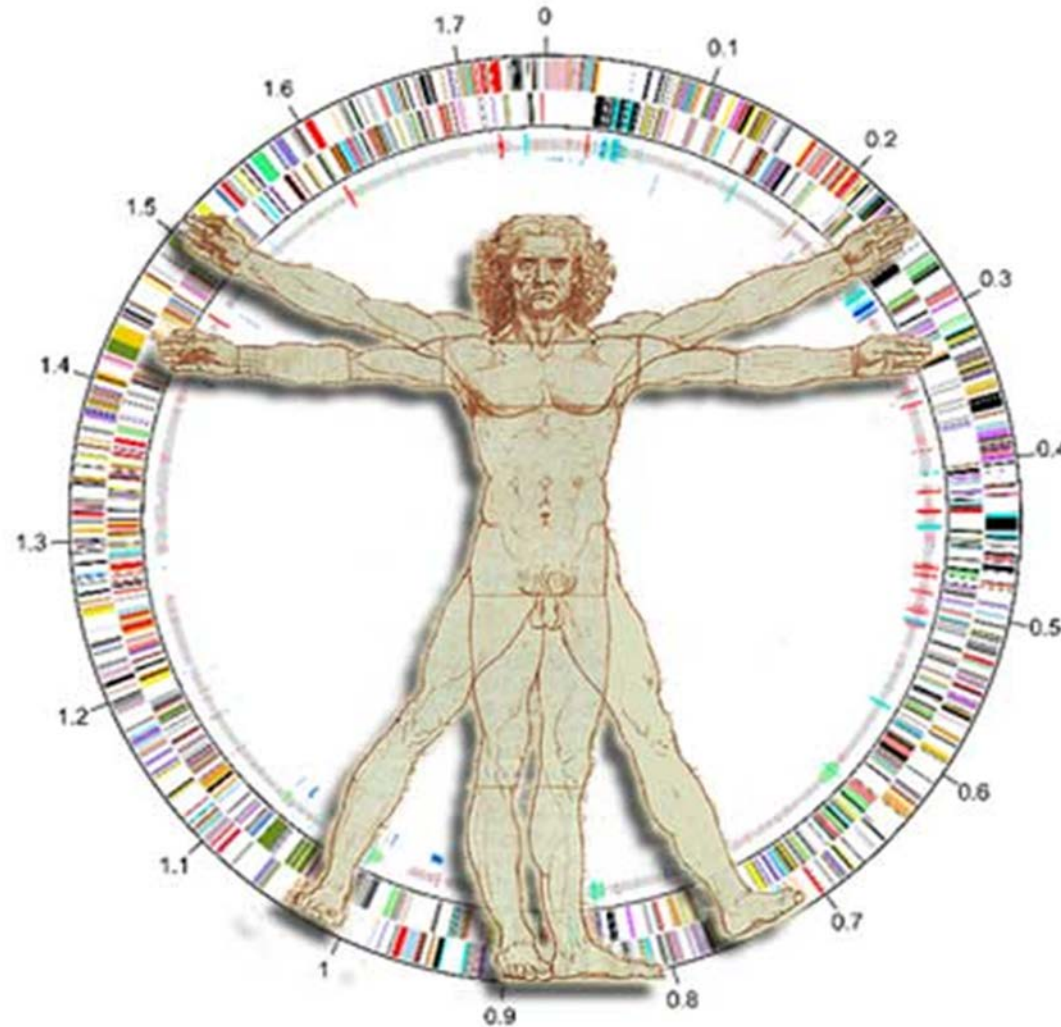
 APPLICATIONS OF NEXT-GENERATION SEQUENCING

Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing

Xavier Didelot¹, Rory Bowden^{1,2,3}, Daniel J. Wilson^{2,4}, Tim E. A. Peto^{3,4} and
Derrick W. Crook^{4,3}

Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.
The sequence of the human genome.
Venter JC, et al.

13 years
2.700.000.000 €



2 - 5 days
<1.000 €

Αλληλούχιση επόμενης γενιάς Next Generation Sequencing (NGS)

Πλεονεκτήματα

Ανάλυση υψηλής απόδοσης

Ταυτόχρονη ανάλυση -πολλών γονιδίων

!! μεγάλων γονιδίων

!! πολλών δειγμάτων

Μειωμένο κόστος ανάλυσης

Δραστική μείωση του κόστους αλληλούχισης του DNA

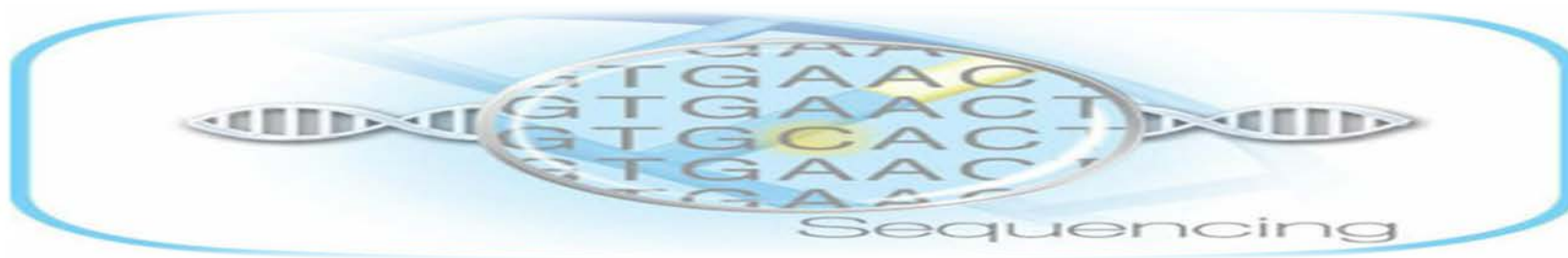
!! NGS – νέα μέθοδος αλληλούχισης

!! High throughput-multiplexing

!! Ανάγκες αυξάνονται ραγδαία στην έρευνα, διάγνωση & άλλες κλινικές εφαρμογές

!! Γρήγορα & οικονομικά αποτελέσματα

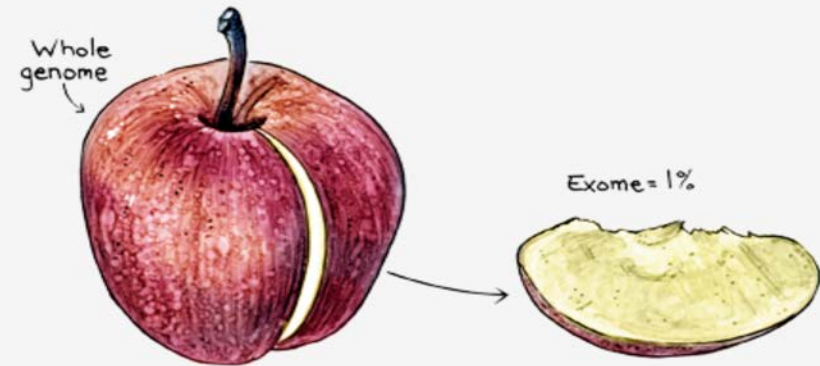
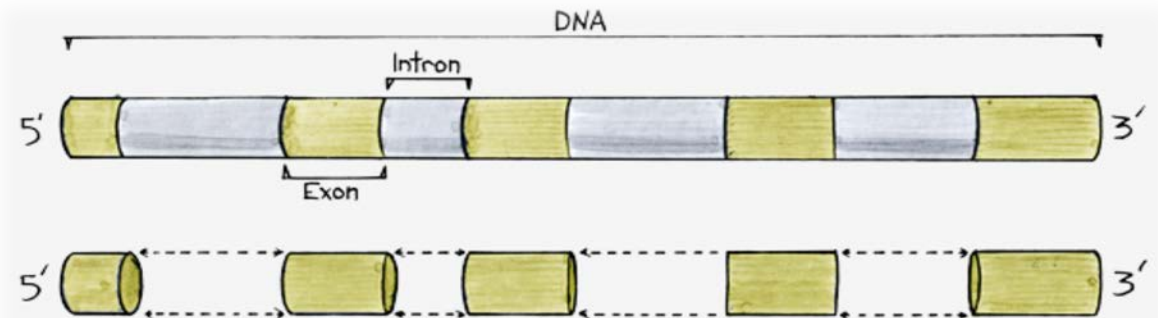
!! Πιο ακριβή αποτελέσματα, deep sequencing



Μαζικά παράλληλη αλληλούχιση

NGS-Επιλογές Γενετικής Διάγνωσης

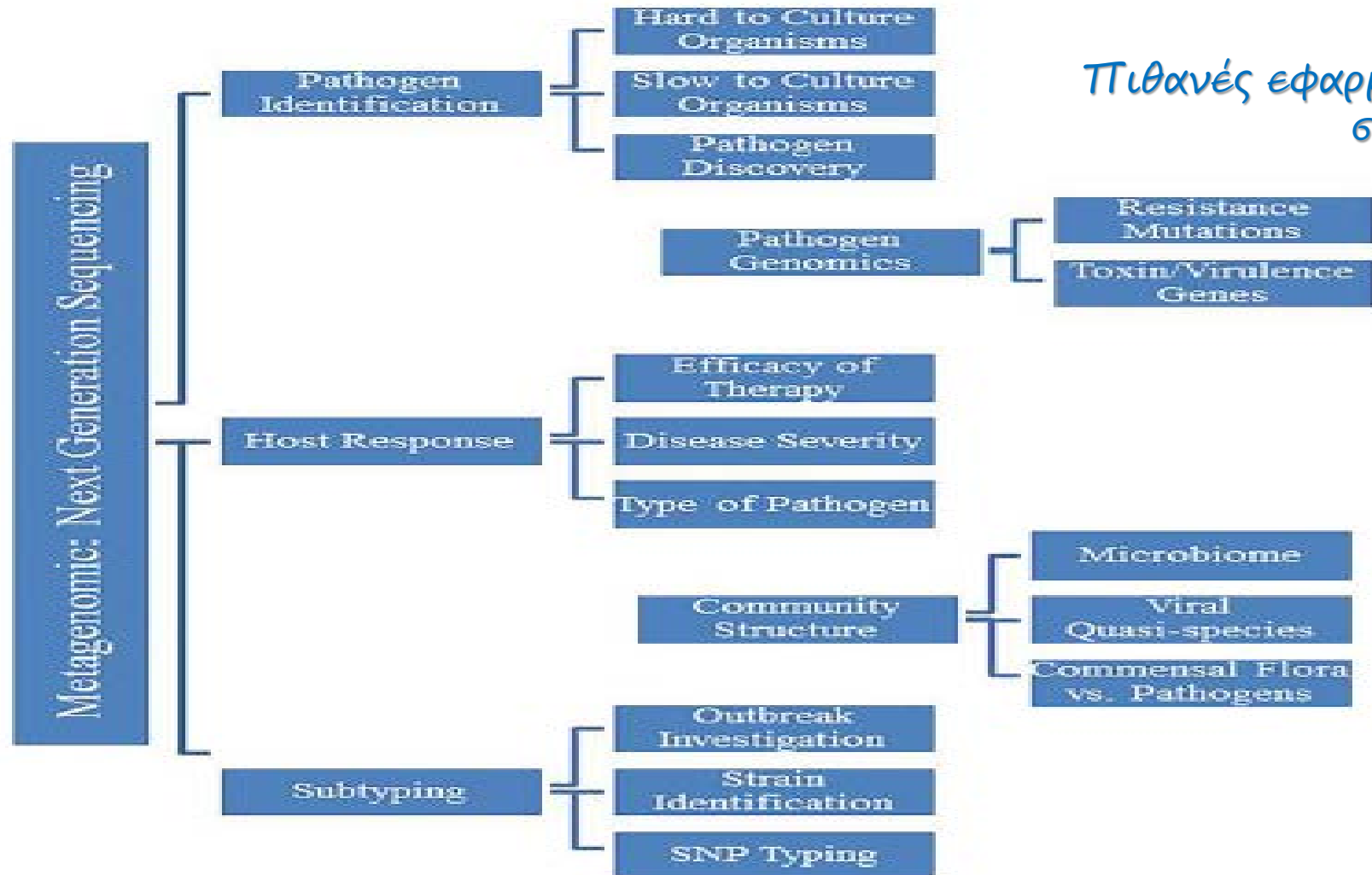
- ? Στοχευμένη αλληλούχιση ενός ή περισσότερων γονιδίων (Targeted sequencing-gene panels)
- ? Whole Exome Sequencing & ανάλυση ομάδας γονιδίων
- ? Whole Exome Sequencing & πλήρης ανάλυση
- ? Whole Genome Sequencing & στοχευμένη ανάλυση συγκεκριμένης ομάδας γονιδίων ή ολόκληρου του γονιδιώματος



Whole Genome vs. Whole Exome Sequencing

Making the leap from research laboratory to clinic: challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics.

Goldberg B, et al. mBio, 2015;6:1888-15

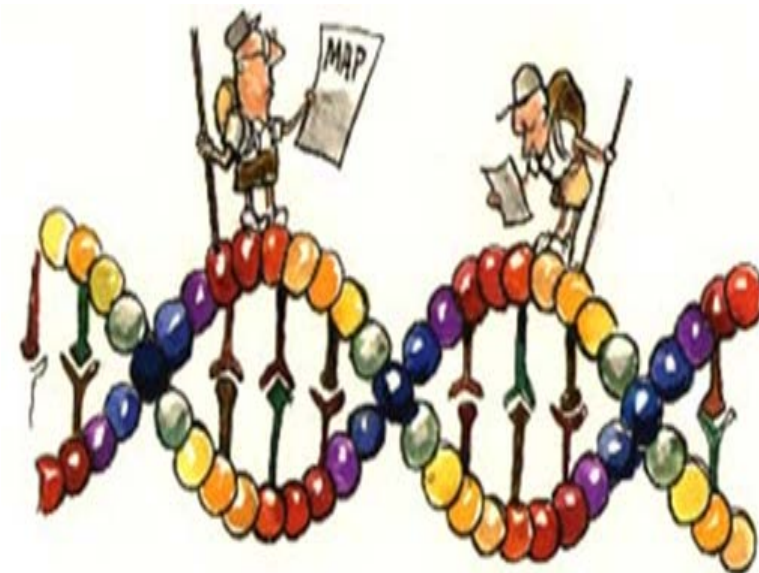


Πιθανές εφαρμογές της τεχνολογίας NGS στην κλινική μικροβιολογία



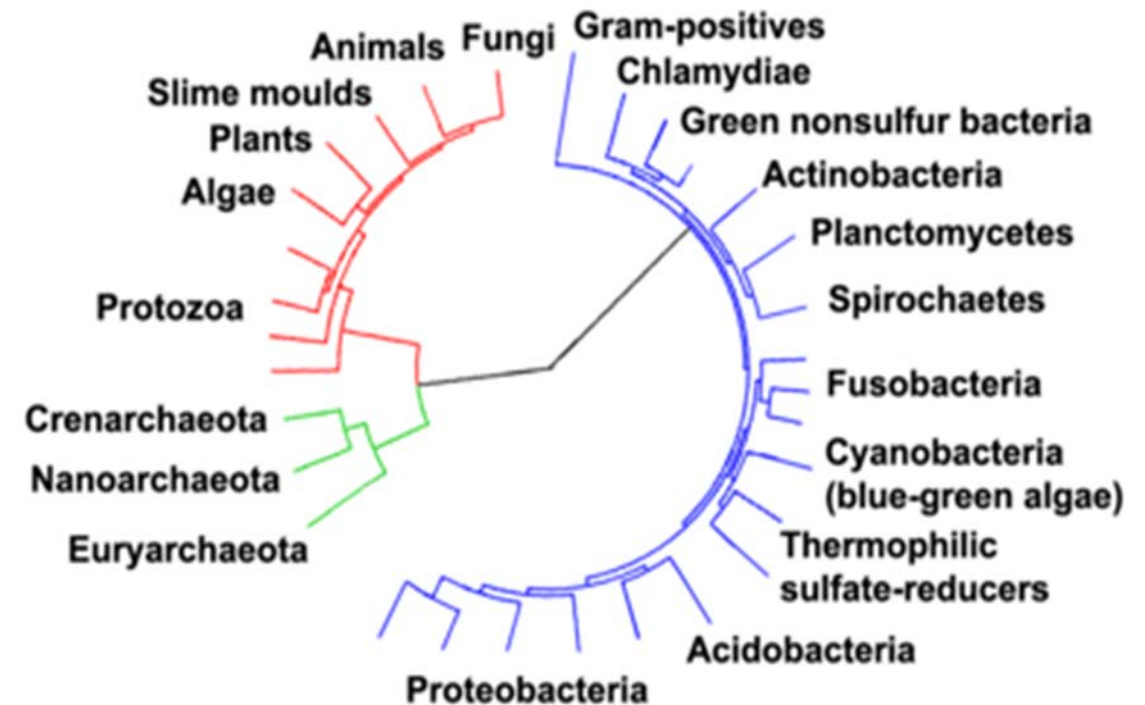
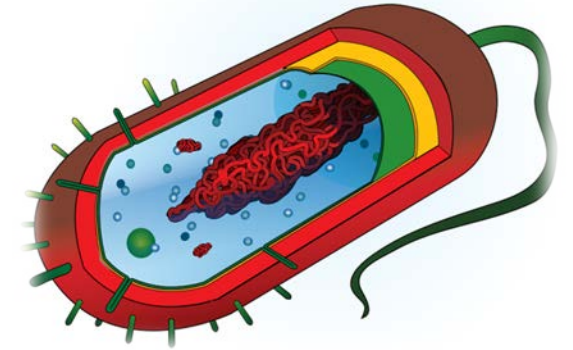
NGS: Εφαρμοχές στη Μικροβιολογία

- ? Διάγνωση γνωστών παθογόνων σε κλινικά δείγματα
(τυποποίηση, ταυτοποίηση ιών & βακτηρίων)
- ? Ανίχνευση νέων παθογόνων μικροοργανισμών (de novo αλληλούχηση)
- ? Ανίχνευση μεταλλάξεων (ανθεκτικότητας, που αυξάνουν παθογένεια/λοιμογόνο δράση)
- ? Ανίχνευση πολυμορφισμών – εξέλιξη ιών & βακτηρίων
- ? Αλληλούχηση γονιδίων – κατάθεση αλληλουχιών σε Genbank
- ? Αλληλούχηση μεγάλων & μικρών γονιδιωμάτων
- ? Επιδημιολογική διερεύνηση στελεχών σε επιδημίες
- ? Επιλογή κυκλοφορούντων στελεχών για εμβόλια (π.χ. γρίπης)



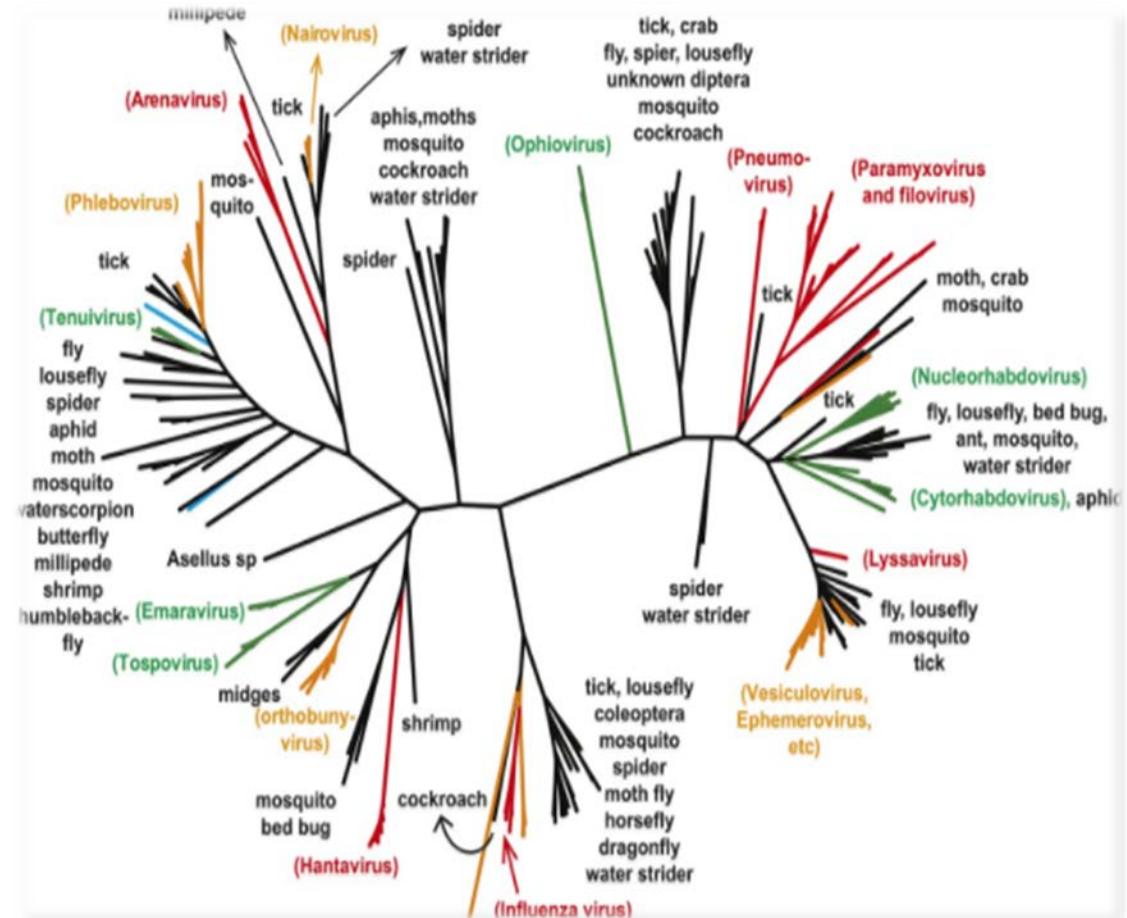
NGS βακτηρίων – ιατρική & έρευνα

- * Διάγνωση βακτηριακών λοιμώξεων
- * Ανάλυση γονιδιώματος – βάση δεδομένων
- * Τυποποίηση στελεχών
- * Παθογένεια
- * Ανθεκτικότητα
- * Άλλες σημαντικές μεταλλάξεις
- * Μελέτες εξέλιξης
- * Επιτήρηση - επιδημιολογία
- * Μελέτες μικροβιώματος (*Bacterial metagenomics*)



NGS ιών – ιατρική & έρευνα

- * Διάγνωση ιογενών λοιμώξεων
- * *Viral metagenomics*
- * Ανάλυση γονιδιώματος
- * Παθογένεια
- * Ανθεκτικότητα
- * Πορεία θεραπείας
- * Γεγονότα ανασυνδυασμού
- * Επιλογή εμβολίων
- * Επιτήρηση
- * Μελέτες επιδημιολογίας
- * Μελέτες εξέλιξης ιών



Τυποποίηση βακτηρίων για τη μοριακή μελέτη της επιδημιολογίας των λοιμωδών νοσημάτων

Οικογένεια

Γένος

Είδος

(Υποείδος)

Οροτυπία

Λυσιτυπία

Ριβοτυπία

Φαινότυπος αντοχής

PFGE type

Ταυτοποίηση

Στόχος της τυποποίησης είναι να δείξει εάν τα επιδημιολογικώς σχετιζόμενα καλλιεργήματα (isolates) που εμπλέκονται σε μια συρροή είναι & γενετικώς σχετιζόμενα & άρα αποτελούν το ίδιο στέλεχος που μεταδόθηκε είτε από κοινή πηγή είτε από ασθενή σε ασθενή

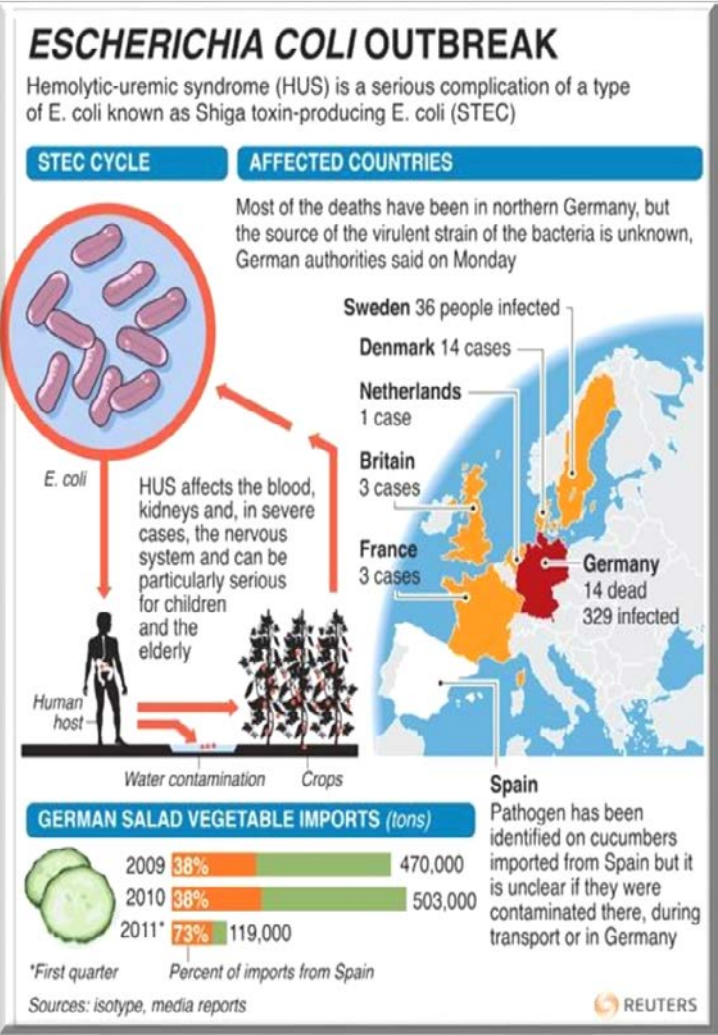
Τυποποίηση

Διερεύνηση επιδημικών εξάρσεων κρουσμάτων, αναγνώριση της επιδημίας, ορισμός κρούσματος, αναγνώριση του τρόπου μετάδοσης, επιβεβαιώνοντας την πηγή, το όχημα ή & την αλυσίδα της μετάδοσης με σκοπό τη λήψη των ενδεικνυόμενων μέτρων ελέγχου

Επιτήρηση νοσημάτων, αναγνώριση των κυκλοφορούντων κλώνων, ανίχνευση νέων παθογόνων κλώνων



“Next generation sequencing of E. Coli outbreak in Germany in May 2011



Rasko et al., NEJM 2011

5 hours per isolate

Origins of the E. coli Strain Causing an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome in Germany

David A. Rasko, Ph.D., Dale R. Webster, Ph.D., Jason W. Sahl, Ph.D., Ali Bashir, Ph.D., Nadia Boisen, Ph.D., Flemming Scheutz, Ph.D., Ellen E. Paxinos, Ph.D., Robert Sebra, Ph.D., Chen-Shan Chin, Ph.D., Dimitris Iliopoulos, Ph.D., Aaron Klammer, Ph.D., Paul Peluso, Ph.D., Lawrence Lee, Ph.D., Andrey O. Kislyuk, Ph.D., James Bullard, Ph.D., Andrew Kasarskis, Ph.D., Susanna Wang, B.S., John Eid, Ph.D., David Rank, Ph.D., Julia C. Redman, B.S., Susan R. Steyert, Ph.D., Jakob Frimodt-Møller, M.Sc.Eng., Carsten Struve, Ph.D., Andreas M. Petersen, Ph.D., Karen A. Krogfelt, Ph.D., James P. Nataro, M.D., Ph.D., M.B.A., Eric E. Schadt, Ph.D., and Matthew K. Waldor, M.D., Ph.D.

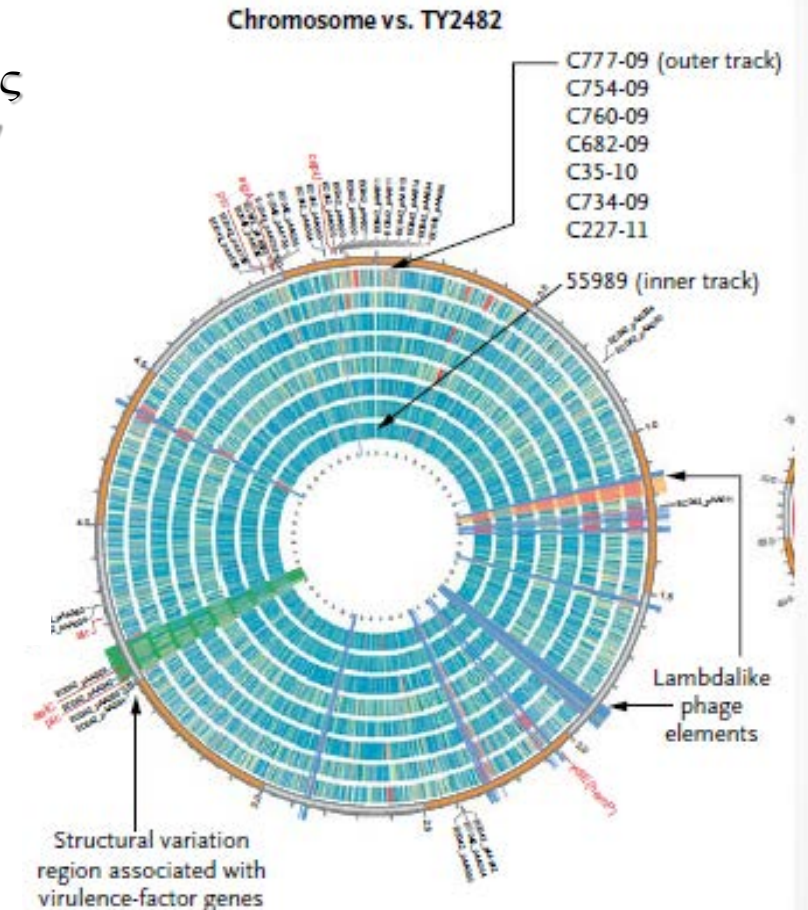
Table 1. Isolates of Enterohemorrhagic Escherichia coli Sequenced or Analyzed in This Study.*				
	Isolate†	Serotype	Location of Isolate	Source of Isolate
Representatives of best studied strains of E. coli	O42	O44:H18	Peru	Stool sample from child with diarrhea
	17-2	O3:H2	Chile	Stool sample from child with diarrhea
	JM221	O92:H33	Mexico	Stool sample from adult with diarrhea
	C1010-00	Orough:H-	Denmark	Stool sample from child with diarrhea
	55989	O104:H4	Central African Republic	Stool sample from adult with diarrhea
Six enterohemorrhagic E. coli clinical isolates	C35-10‡	O104:H4	Africa	Stool sample from child with diarrhea
	C682-09‡	O104:H4	Africa	Stool sample from child with diarrhea
	C734-09‡	O104:H4	Africa	Stool sample from child without diarrhea
	C754-09‡	O104:H4	Africa	Stool sample from child without diarrhea
	C760-09‡	O104:H4	Africa	Stool sample from child without diarrhea
	C777-09‡	O104:H4	Africa	Stool sample from child with diarrhea
Germany Samples	TY2482	O104:H4	Germany	Stool sample from adult with diarrhea
	LB226692	O104:H4	Germany	Diarrhea in adult
	H112180280	O104:H4	Germany	Diarrhea in adult
	C227-11	O104:H4	Denmark	Diarrhea in adult

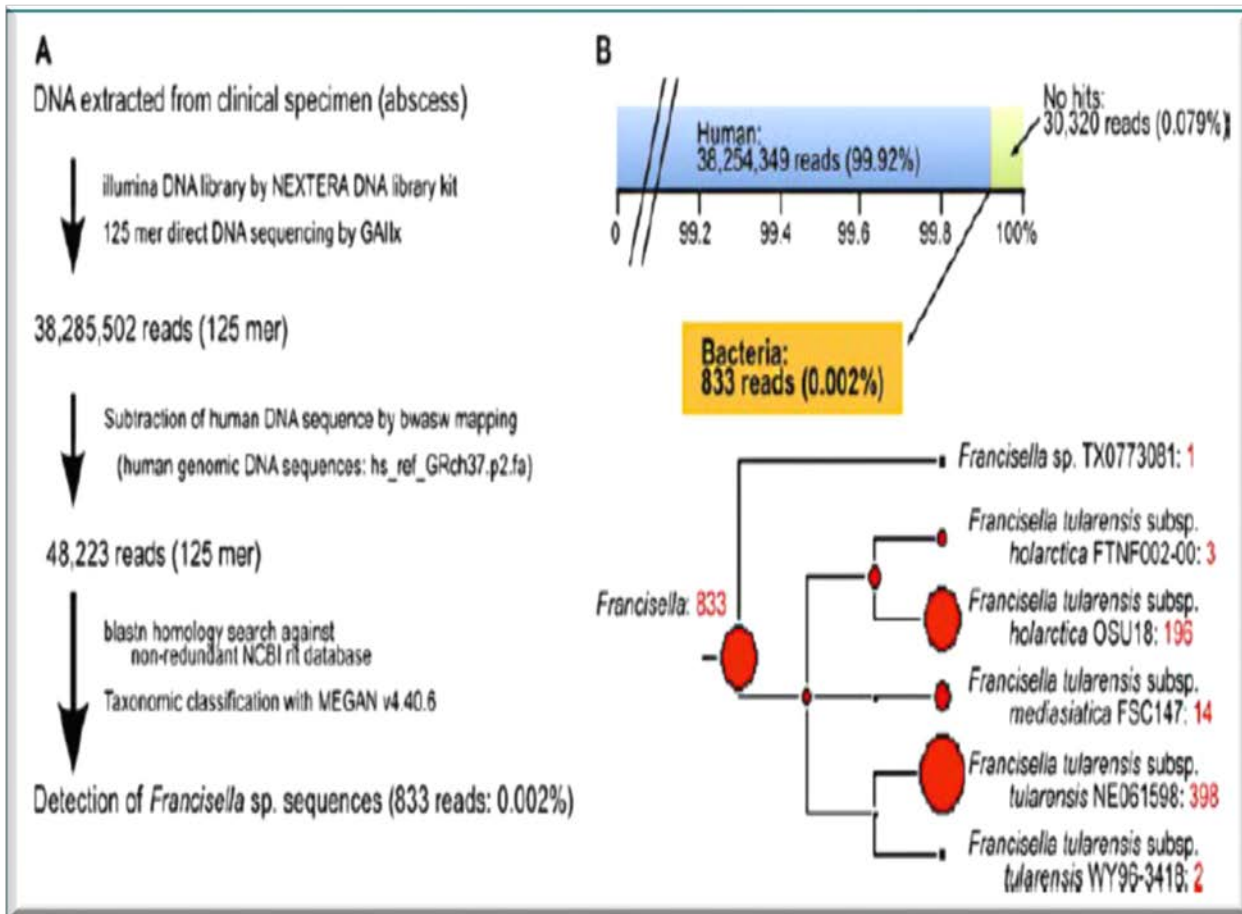
Compared the sequences with other previously sequenced E. Coli isolates

“NGS of *E. Coli* outbreak in Germany in May 2011

- !! Εντεροπροσκολλητικά στελέχη *E. Coli* O104 : H4
- !! Το γονιδίωμα του στελέχους από τη Γερμανία διακρίνεται από άλλα O104 : H4 γιατί περιέχει ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την παραγωγή της τοξίνης Shiga 2 & ένα σύνολο επιπρόσθετων λοιμογόνων παραγόντων & παραγόντων αντίστασης σε αντιβιοτικά
- !! Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η οριζόντια ανταλλαγή γονιδίων επέτρεψε την εμφάνιση του εξαιρετικά λοιμογόνου Shiga τοξίνη παραγόμενου εντεροπροσκολλητικού στελέχους *E.coli* O104 : H4
- !! Γενικότερα, αυτά τα ευρήματα τονίζουν τον τρόπο με τον οποίο η πλαστικότητα των βακτηριακών γονιδιωμάτων διευκολύνει την εμφάνιση νέων παθογόνων

☞ Οι οκτώ κυκλικές ζώνες αντιπροσωπεύουν τα διαφορετικά isolates των εντεροπροσκολλητικών *E. Coli* (EAEC) O104: έναντι του γονιδιώματος αναφοράς TY2482.





♂ 57 ετών από τη Φουκουσίμα, Ιαπωνία, παρουσιάστηκε με έλκος δεξιού αντίχειρα, διογκωμένο σύστοιχο μασχαλιαίο λεμφαδένα & πόνο στον δεξιό καρπό.

- * Ελήφθησαν εργαστηριακές εξετάσεις, διαγνώστηκε στον ασθενή κυτταρίτιδα & λεμφαδενοπάθεια & δόθηκε θεραπεία.
- * Ωστόσο, ένα μήνα αργότερα, επέστρεψε με οίδημα, ερυθρότητα & εκροή πύου από την δεξιά μασχαλιαία περιοχή.
- * Το πύον καλλιεργήθηκε σε κατάλληλα υλικά αλλά δεν αποκαλύφθηκε παθογόνο
- * Παράλληλα, έγινε αλληλούχιση που έδωσε θετικό αποτέλεσμα για *Francisella* (σχήμα A)
- * Χρησιμοποιήθηκαν παραλλαγές ενός νουκλεοτιδίου του γονιδιώματος (SNV) για τον προσδιορισμό του υποείδους *Francisella*.
- * Η ανάλυση αλληλουχίας 16S rRNA δεν έχει αυτή τη διακριτική ισχύ.
- * Η αλληλούχιση & η SNV ανίχνευσαν ***F. tularensis* subsp. *holarctica*** & όχι τον πιθανό παράγοντα βιοτρομοκρατίας *F. tularensis* subsp. *tularensis* (σχήμα B)



Identification of hemorrhagic fever-associated arenavirus from South Africa (Lujo virus)

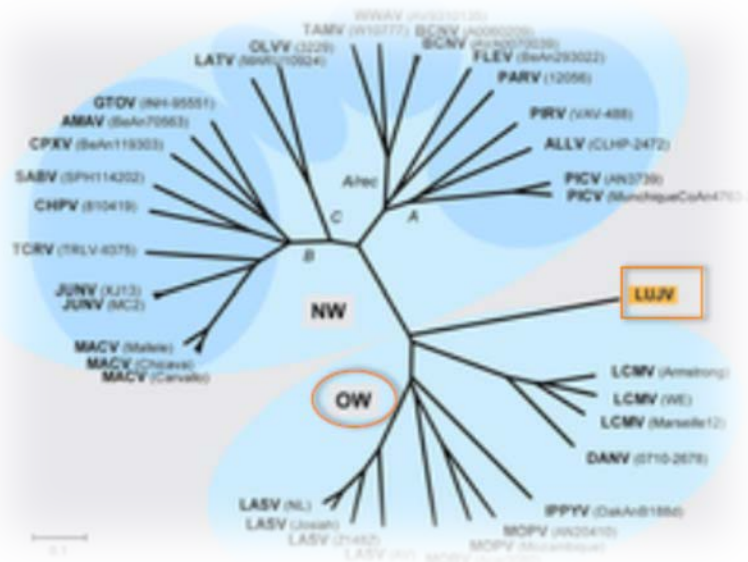
- 5 cases of undiagnosed hemorrhagic fever, 4 fatal, after air transfer of a critically ill index case from Zambia to South Africa

* Ο ιός Lujo (LUJV), νέο μέλος της οικογένειας *Arenaviridae*, σχετίζεται με αιμορραγικό πυρετό, απομονώθηκε στη Νότια Αφρική & χαρακτηρίζεται από υψηλό ποσοστό θνητότητας, 80%

* Σεπτέμβριο & Οκτώβριο 2008, 5 περιπτώσεις μη διαγνωσμένου αιμορραγικού πυρετού, 4 θανατηφόρες, αναγνωρίστηκαν στην Νότια Αφρική μετά από αερομεταφορά ασθενούς σε κρίσιμη κατάσταση από τη Ζάμπια

* Η εφαρμογή NGS επέτρεψε την ταυτοποίηση & τον λεπτομερή φυλογενετικό χαρακτηρισμό εντός 72 ωρών από την παραλαβή δείγματος ορού & ιστών από τα θύματα

* Φυλογενετικές αναλύσεις επιβεβαίωσαν την παρουσία νέου μέλους της οικογένειας *Arenaviridae*, που ονομάστηκε ιός Lujo (LUJV) σε αναγνώριση της γεωγραφικής του προέλευσης (Lusaka, Ζάμπια & Γιοχάνεσμπουργκ, Νότια Αφρική)



Genetic Detection and Characterization of Lujo Virus, a New Hemorrhagic Fever-Associated Arenavirus from Southern Africa

Thomas Brieseman^{1,2}, Janusz T. Paweska^{2,3}, Laura K. McMullan³, Stephen K. Hutchison⁴, Craig Street¹, Gustavo Palacios¹, Marina L. Khristova⁵, Jacqueline Weyer², Robert Swanepoel², Michael Egholm⁴, Stuart T. Nichol³, W. Ian Lipkin^{1*}

Ιός της Λεμφοκυτταρικής Χοριομηνιγίτιδας

Εκδηλώνεται ως άσηπτη μηνιγγίτιδα, εγκεφαλίτιδα ή μηνιγγοεγκεφαλίτιδα

☞ Διφασική πορεία : στην αρχή μη ειδικά συμπτώματα (3-5 ημέρες) από το ανώτερο αναπνευστικό & μυαλγίες, εξαφανίζεται & επανεμφανίζεται με την έναρξη των μηνιγγικών συμπτωμάτων.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

MARCH 6, 2008

VOL. 358 NO. 10

A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases

Gustavo Palacios, Ph.D., Julian Druce, Ph.D., Lei Du, Ph.D., Thomas Tran, Ph.D., Chris Birch, Ph.D., Thomas Brieseman, Ph.D., Sean Conlan, Ph.D., Phenix-Lan Quan, Ph.D., Jeffrey Hui, B.Sc., John Marshall, Ph.D., Jan Fredrik Simons, Ph.D., Michael Egholm, Ph.D., Christopher D. Paddock, M.D., M.P.H.T.M., Wun-Ju Shieh, M.D., Ph.D., M.P.H., Cynthia S. Goldsmith, M.G.S., Sherif R. Zaki, M.D., Ph.D., Mike Catton, M.D., and W. Ian Lipkin, M.D.

Palacios et al. NEJM, 2008

EMERGING INFECTIOUS DISEASES®



August 2012

Transplantation and Transfusion



**Solid Organ Transplant-associated
Lymphocytic Choriomeningitis,
United States, 2011. A. MacNeil et al.
Early detection & treatment improve outcomes for
patients with transplant-transmitted disease**

Sequencing of Bacterial Genomes: Principles and Insights into Pathogenesis and Development of Antibiotics

Eric S. Donkor, *Genes* 2013, 4, 556–572

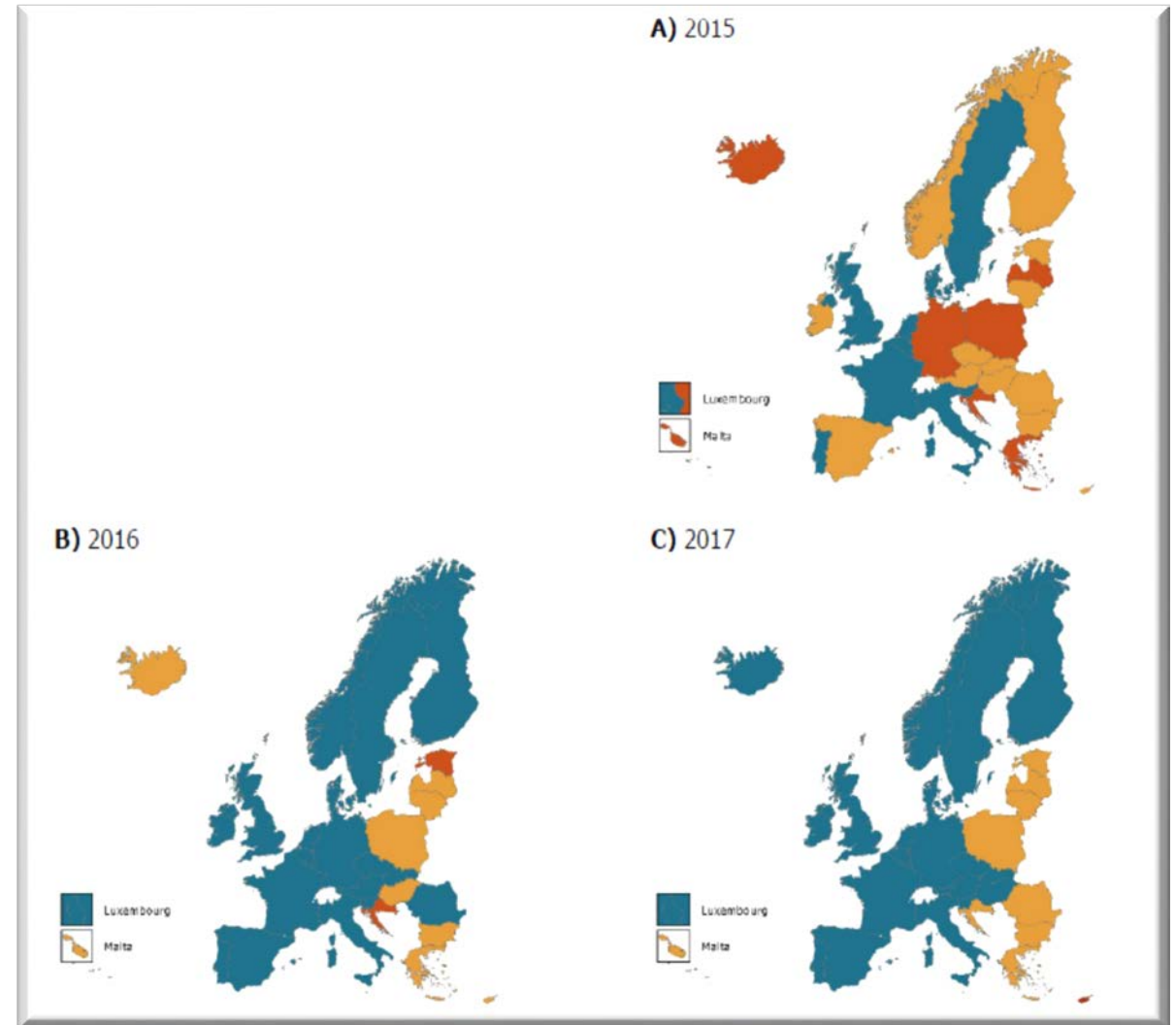
- ? Η αλληλούχιση του βακτηριακού γονιδιώματος έχει βελτιώσει την κατανόησή μας σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους τα βακτήρια προκαλούν νόσο.
- ? Από την εμφάνιση της, πριν από δύο δεκαετίες, περίπου 1.800 βακτηριακά γονιδιώματα έχουν πλήρως αλληλουχηθεί & αυτά περιλαμβάνουν σημαντικούς αιτιολογικούς παράγοντες, όπως *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* O157: H7, *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile* & *Staphylococcus aureus*
- ? Η αλληλούχιση του βακτηριακού γονιδιώματος βοήθησε επίσης στον εντοπισμό **νέων στόχων**, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν **στο σχεδιασμό νέων αντιβιοτικών**



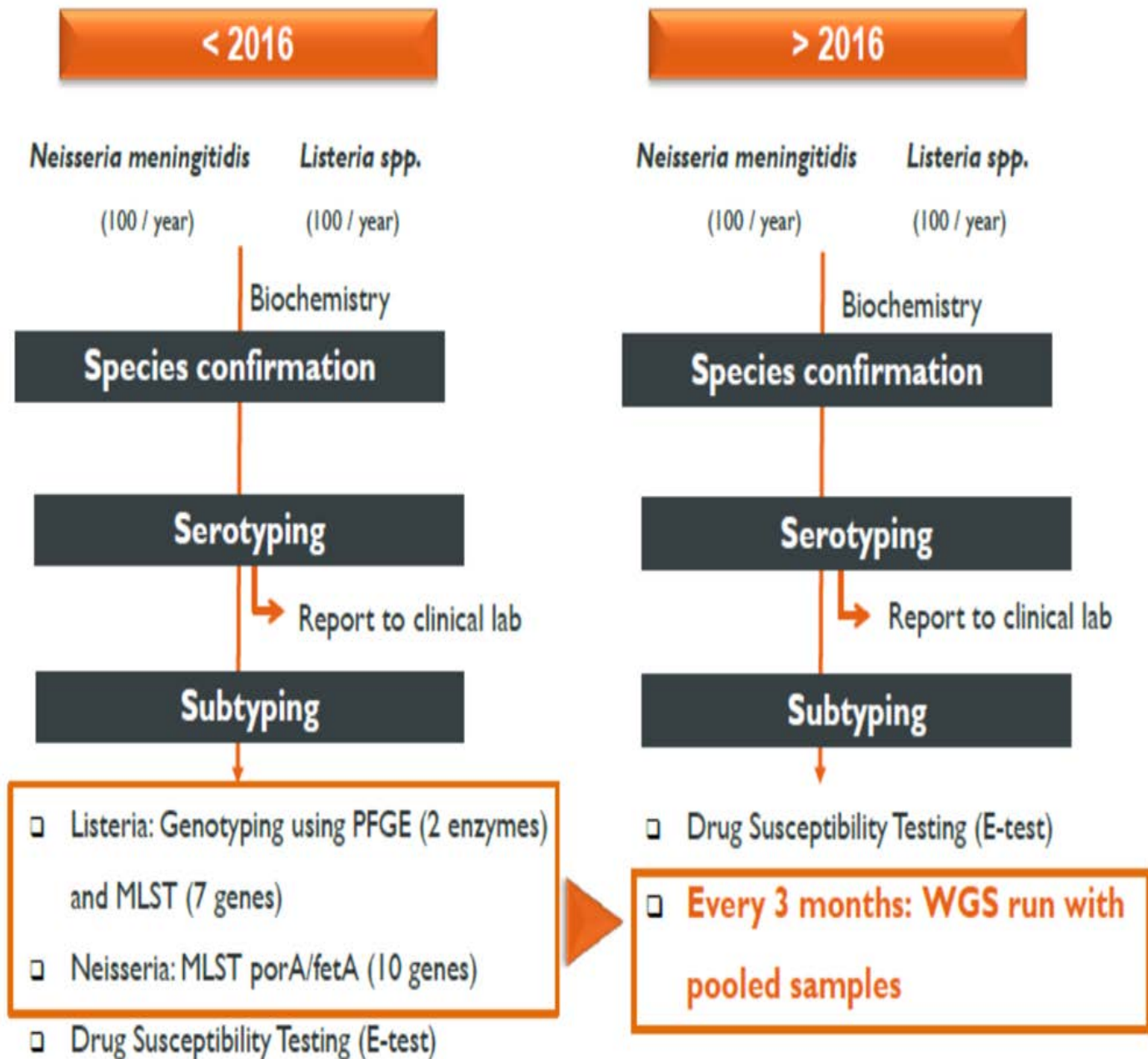
- * *Foodborne pathogens*
- * *Listeria monocytogenes*
- * *Salmonella enterica*
- * Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC)
- * *Antimicrobial-resistant pathogens*
- * Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE)
- * Antibiotic resistant *Neisseria gonorrhoeae*
- * Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*
- * *Vaccine-preventable pathogens*
- * Invasive *Neisseria meningitidis*
- * Human Influenza virus

Πρωταρχικός στόχος: η διευκόλυνση της διαλειτουργικότητας με τα προγράμματα επιτήρησης & αντιμετώπισης επιδημικών κρίσεων στην ΕΕ & σε εθνικό επίπεδο.

blue: in use; light orange: a plan in place/in progress within three years; dark orange: no use or national plan in place within three years. EU/EEA countries, 2015–2017



Η πλειοψηφία των εθνικών εργαστηρίων αναφοράς για τη δημόσια υγεία στις χώρες της ΕΕ έχει πρόσβαση σε WGS για τυποποίηση μικροβιακών παθογόνων, διερεύνηση μετάδοσης της λοίμωξης & αντοχής στα φάρμακα



☞ Η WGS παρέχει υψηλότερη ανάλυση & ακρίβεια από τις παραδοσιακές μεθόδους μοριακής τυποποίησης, όπως PFGE ή MLVA

☞ Αυτό συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των προτύπων μετάδοσης της νόσου & των αντιμικροβιακών φαρμάκων, βελτιώνοντας στη συνέχεια την αποτελεσματικότητα των παρεμβάσεων για τον έλεγχο τους

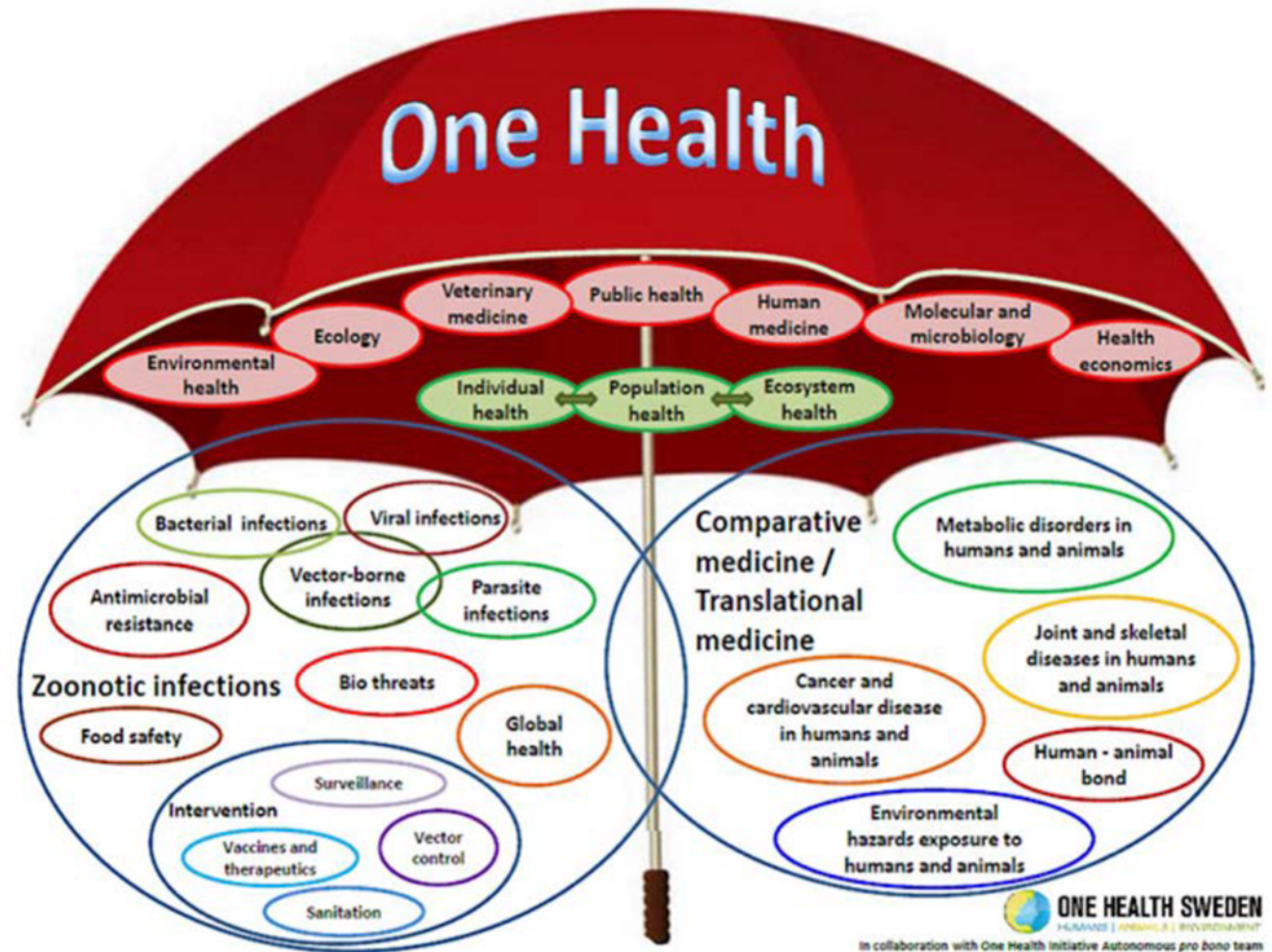
!! Λαμβάνοντας υπόψη τους τρέχοντες περιορισμούς στο κόστος, τα εργαστήρια αναφοράς θα είναι τα πρώτα που θα το εφαρμόσουν στη ρουτίνα



Ενιαία υγεία

- η διεπιστημονική παγκόσμια συνεργασία στον τομέα της υγείας
- οι NGS τεχνολογίες μπορούν να υποστηρίξουν την One Health Initiative ή την διασύνδεση των ανθρώπων, των ζώων & του περιβάλλοντος.

“one test fits all”



επιτρέπει τον λεπτομερή χαρακτηρισμό των παθογόνων παραγόντων σε όλα τα δείγματα που προέρχονται από ανθρώπους, ζώα, τρόφιμα & το περιβάλλον, χρησιμοποιώντας τυποποιημένα εργαστηριακά πρωτόκολλα

Ανίχνευση μεταλλάξεων αντίστασης σε ασθενείς

Characterization of Quasispecies of Pandemic 2009 Influenza A Virus (A/H1N1/2009) by *De Novo* Sequencing Using a Next-Generation DNA Sequencer

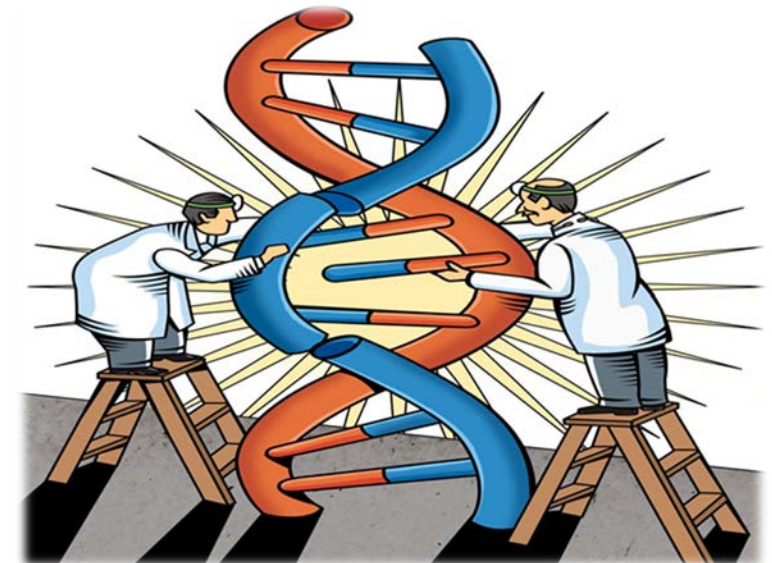
Makoto Kuroda^{1*}, Harutaka Katano², Noriko Nakajima², Minoru Tobiume², Akira Ainal², Tsuyoshi Sekizuka¹, Hideki Hasegawa³, Masato Tashiro³, Yuko Sasaki⁴, Yoshichika Arakawa⁴, Satoru Hata⁵, Masahide Watanabe⁶, Tetsutaro Sata²

Deep Sequencing Reveals Highly Complex Dynamics of Human Cytomegalovirus Genotypes in Transplant Patients over Time^V

Irene Görzer,¹ Christian Guelly,² Slave Trajanoski,² and Elisabeth Puchhammer-Stöckl^{1*}

Use of Massive Parallel Pyrosequencing for Near Full-Length Characterization of a Unique HIV Type 1 BF Recombinant Associated with a Fatal Primary Infection

Alessandro Bruselles, Gabriella Rozera, Barbara Bartolini, Mattia Prosperi, Franca Del Nonno, Pasquale Narciso, Maria R. Capobianchi, and Isabella Abbate





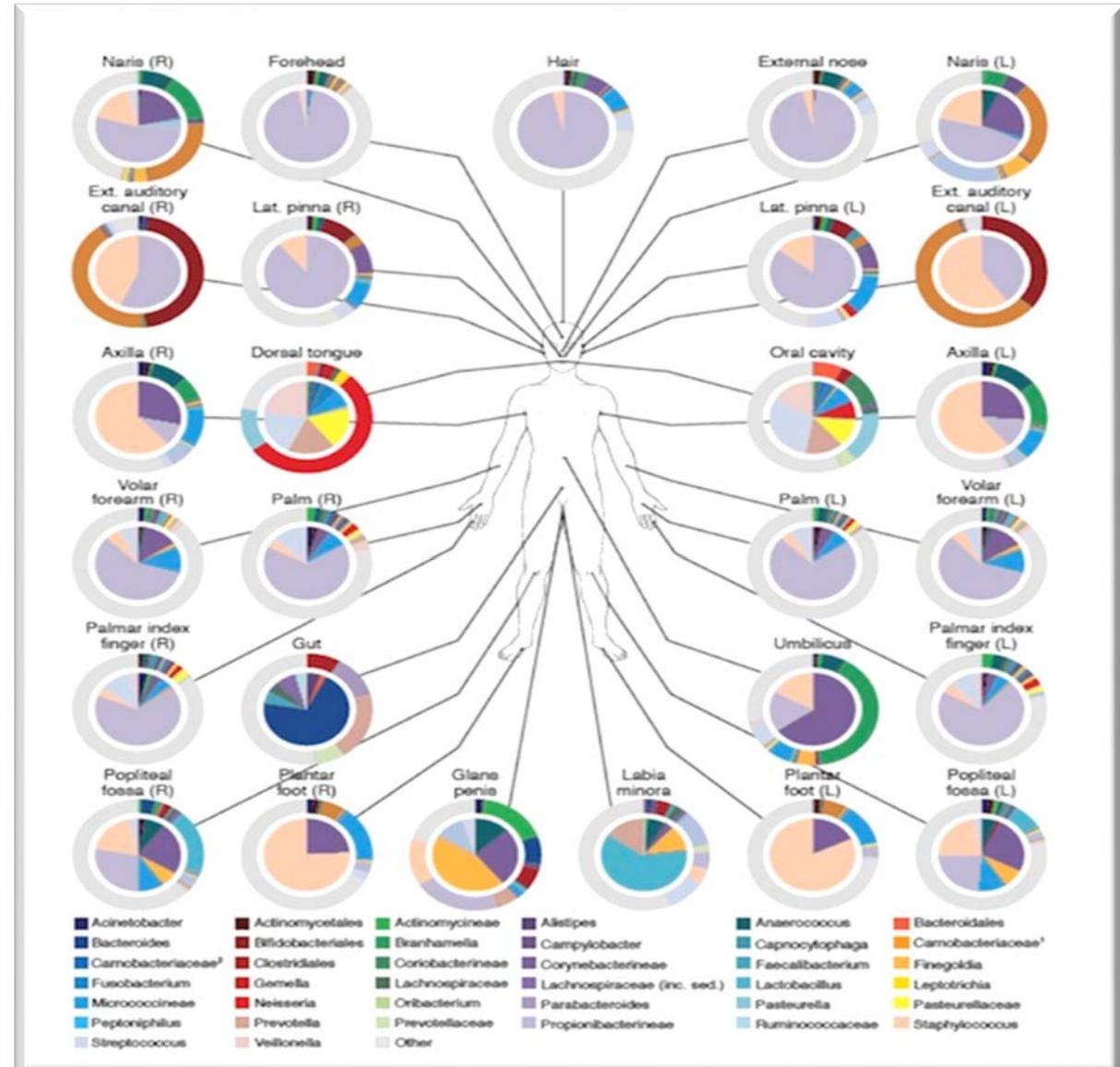
Costello et al. Science 2009 Dec. 18; 326(5960): 1694-1697

* 40 τρεις ανθρώπινα κύτταρα

Επιπλέον στον ανθρώπινο οργανισμό υπάρχουν:

? 2 εκατ. μικροβιακά γονίδια (*metagenome*)

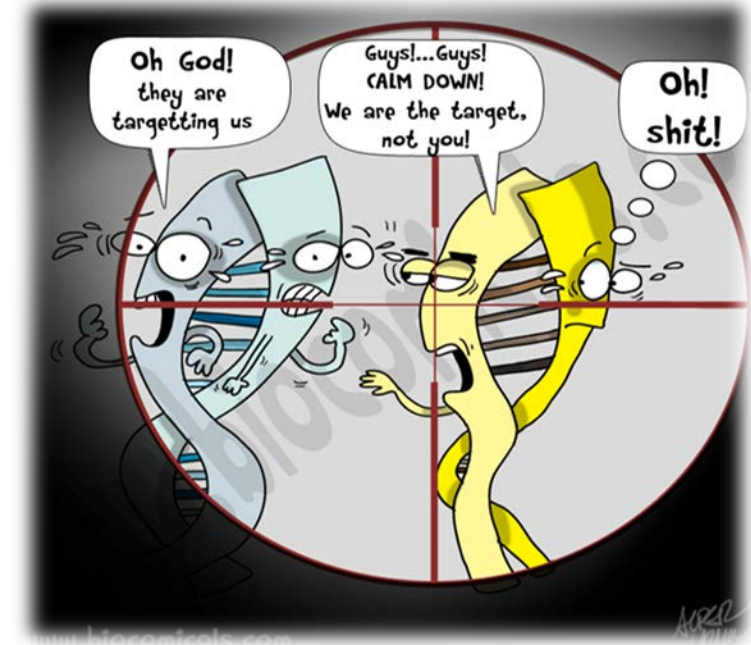
Η πλειοψηφία των μικροβιακών “συνοδοιπόρων”
δεν μπορεί να προσδιοριστεί με τις κλασσικές
εργαστηριακές μεθόδους (20–40% μπορούν να
καλλιεργηθούν)



Εξατομικευμένη Ιατρική

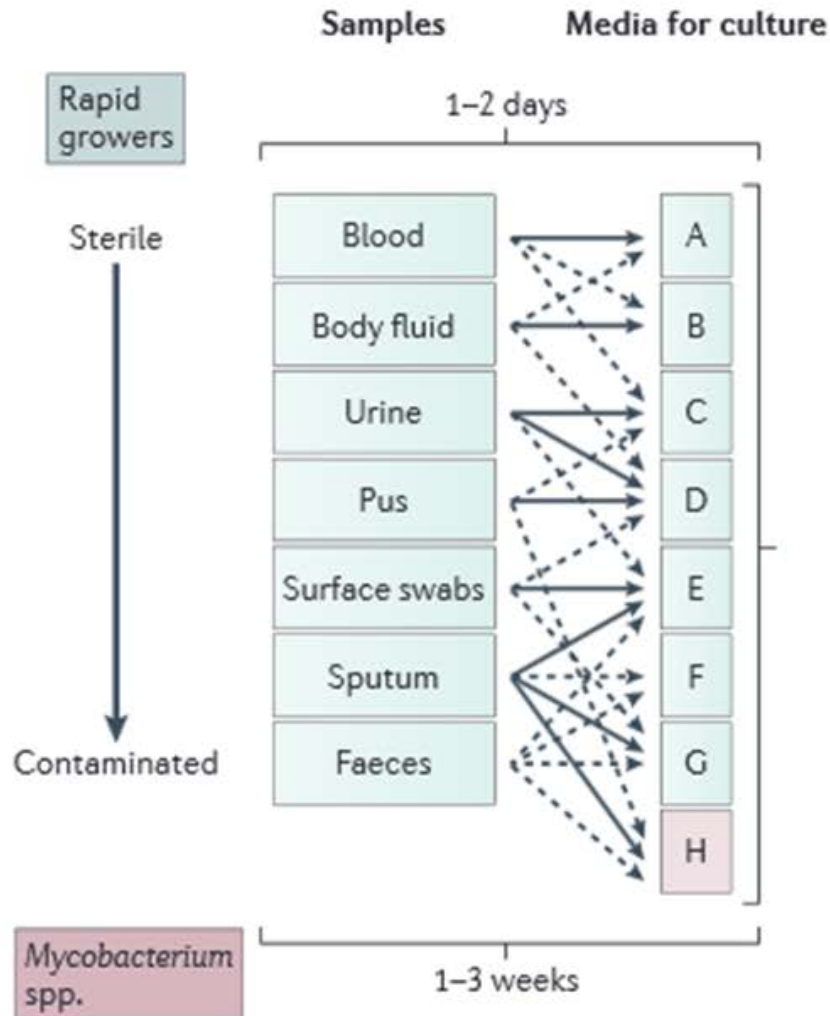
Personalised, stratified, precision medicine

- !! Για την πρόληψη & θεραπεία νοσημάτων
- !! Στη μικροβιολογία: στοχεύει σε επιλογή θεραπείας ανά περίπτωση
- !! Αύξηση των γενετικών δεδομένων (σε ιούς, βακτήρια, άνθρωπο)
- !! Γνώση σχέσης ξενιστή-παθογόνου-θεραπείας
- !! Χρησιμοποίηση γενομικών δεδομένων ξενιστή, παθογόνου σε συνδυασμό με κλινικά δεδομένα

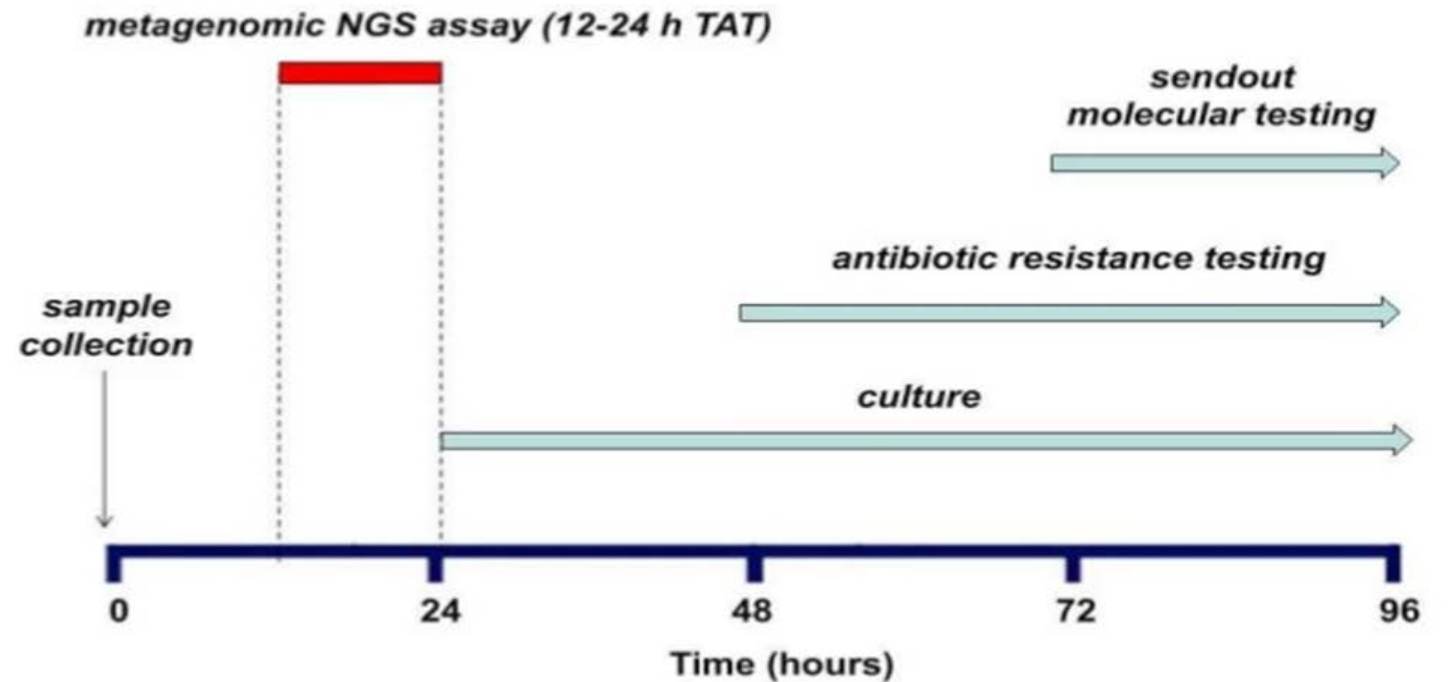


Η ροή εργασίας σήμερα στο κλινικό εργαστήριο

Υποθετική ροή εργασίας με NGS



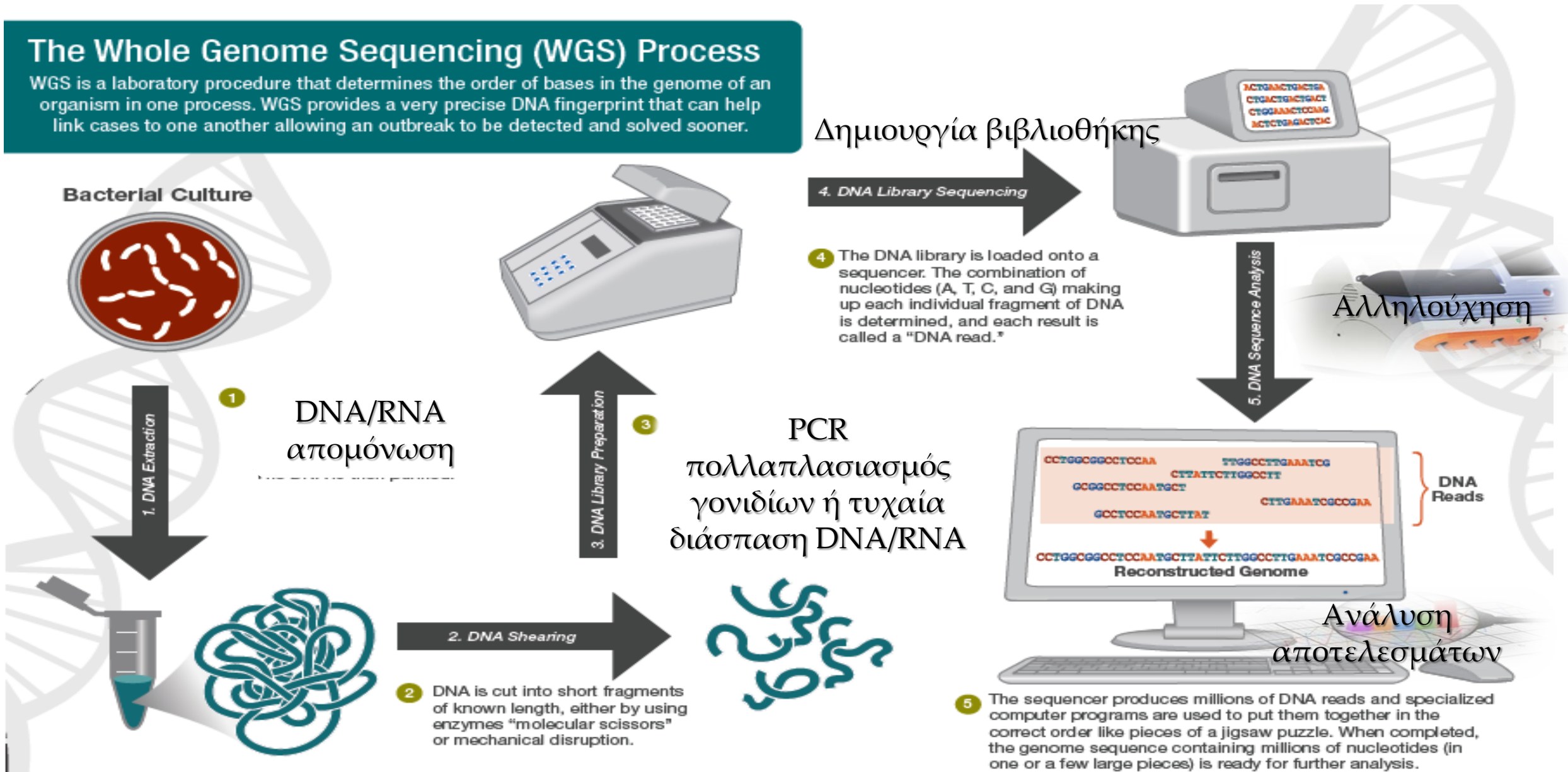
More Timely Diagnosis = Improved Clinical Outcomes



Typical whole genome sequencing workflow in a clinical or public health laboratory

The Whole Genome Sequencing (WGS) Process

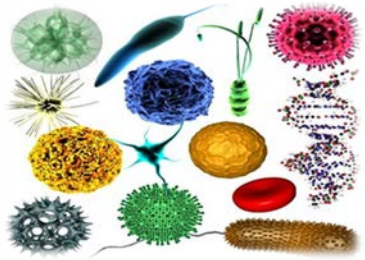
WGS is a laboratory procedure that determines the order of bases in the genome of an organism in one process. WGS provides a very precise DNA fingerprint that can help link cases to one another allowing an outbreak to be detected and solved sooner.



The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee

M.J. Ellington et al.

Clinical Microbiology and Infection 23 (2017) 2–22



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com



- ? Ο έλεγχος ευαισθησίας (AST) είναι θεμελιώδης δραστηριότητα στο μικροβιολογικό εργαστήριο, αλλά είναι σημαντικό να εκτιμήσουμε ότι μια τιμή MIC / διάμετρος ζώνης αναστολής, αντανακλά περισσότερα από την παρουσία / απουσία γονιδίων αντοχής
- ? Αυτές οι τιμές αντικατοπτρίζουν πολλαπλές & σύνθετες αλληλεπιδράσεις, όπως της κυτταρικής διαπερατότητας, αντλιών εκροής, διαθεσιμότητας στόχου & δέσμευσης, καθώς & επίπεδα ενζυματικής έκφρασης & δραστικότητας
- ? Επομένως, υπάρχουν πολλές προκλήσεις όσον αφορά τη συγκέντρωση & την αξιολόγηση των στοιχείων για να εξεταστεί εάν το AST μπορεί να αντικατασταθεί από μια μέθοδο όπως η WGS, η οποία δεν αξιολογεί την ανάπτυξη των βακτηρίων παρουσία αντιμικροβιακών παραγόντων

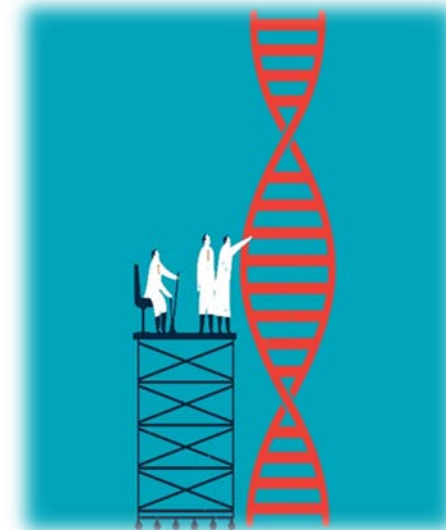
Προς το παρόν, η πιθανή συνεισφορά του WGS στην προσέγγιση για το AST είναι στο επίπεδο ανίχνευσης γονιδιακής παρουσίας ή απουσίας



J.W.A. Rossen et al. "Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology"

- ? Δυσχέρειες στην εφαρμογή του ως διαδικασία ρουτίνας για τη διάγνωση & τον χαρακτηρισμό των μικροβιακών λοιμώξεων
- ? Έλλειψη κατάρτισης
- ? Έλλειψη της απαραίτητης υπολογιστικής υποδομής στα περισσότερα νοσοκομεία
- ? Ανεπάρκεια των υφιστάμενων βάσεων δεδομένων μικροβιακής γονιδιωματικής αναφοράς που είναι απαραίτητες για την αξιόπιστη ανάλυση της AMR & των λοιμογόνων παραγόντων
- ? Δυσκολία δημιουργίας αποτελεσματικών, τυποποιημένων & διαπιστευμένων πρωτοκόλλων βιοπληροφορικής
- ? Κίνδυνος να χαθούν πολύτιμες γνώσεις στη βασική μικροβιολογία μετά τη μετάβαση στο NGS

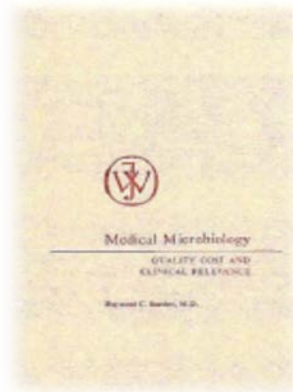
Next - Generation Sequencing



"Οι τεχνικές μας δυνατότητές υπερβαίνουν την ικανότητά μας να τις εφαρμόζουμε αποτελεσματικά & οικονομικά στα ανθρώπινα προβλήματα"

Το εργαστήριο μικροβιολογίας "αντιμετωπίζει μια υπερπροσφορά ακαδημαϊκών πληροφοριών & πιέσεων για να εκτελέσει εξαντλητικές, ακριβές, κλινικά άσχετες δοκιμασίες", οι οποίες, "παραπλανούν τους ιατρούς σε λανθασμένη διάγνωση και ακατάλληλη θεραπεία".

Never forget that "good [microbiology] is clinically relevant [microbiology]."



*Dr. Raymond C. Bartlett
clinical pathologist
- 1975 (!) -*



!! Μικροβιακή ταυτοποίηση (Microbial identification & tracking)
ως μέθοδος ακριβείας στην ταυτοποίηση ενός άγνωστου μικροβιακού είδους

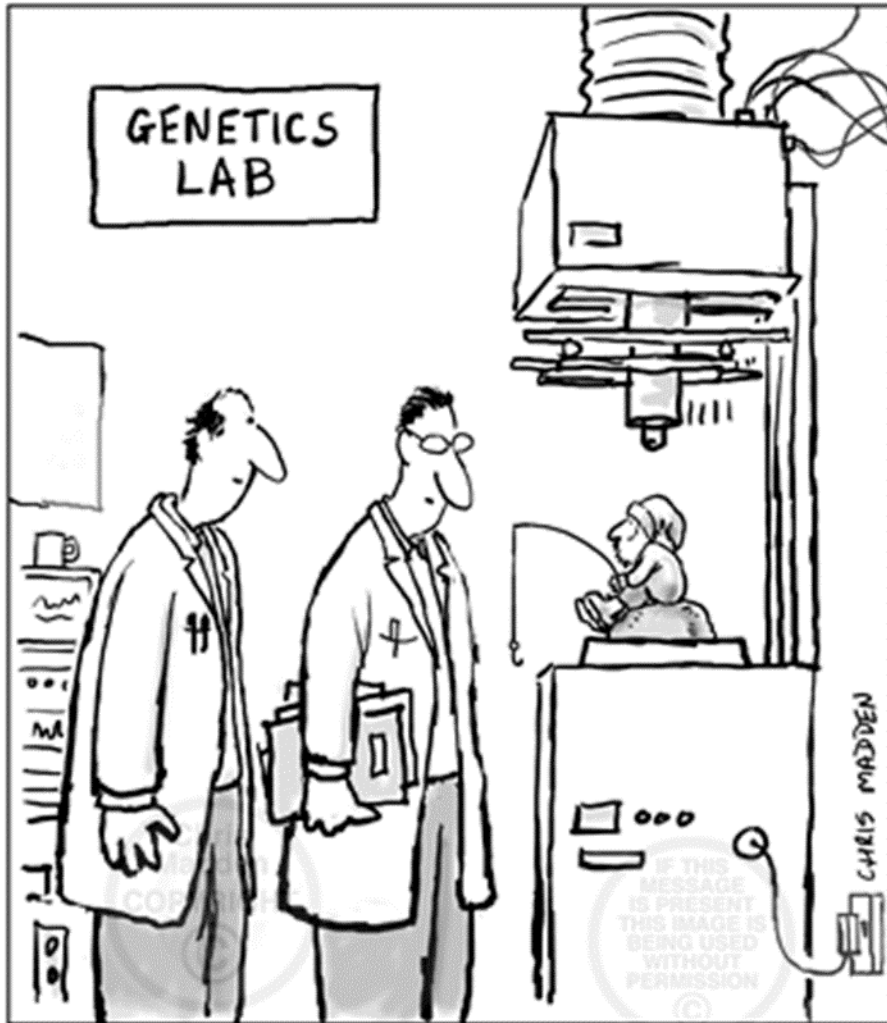
!! Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα
(Interlab reproducibility in bacterial genotyping by NGS)

!! Point-of-care diagnostics via molecular tests

!! Νέα εργαλεία για την ανίχνευση νέων ιών

Next - Generation Sequencing

ευχαριστώ για την προσοχή σας



THE G-NOME PROJECT

