

2º Simpósio ASGAV  
Atualizações em Sanidade Avícola

UTILIZAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO  
GENÉTICO COMPLETO NA AVICULTURA  
WGS

MINISTÉRIO DA  
AGRICULTURA, PECUÁRIA  
E ABASTECIMENTO



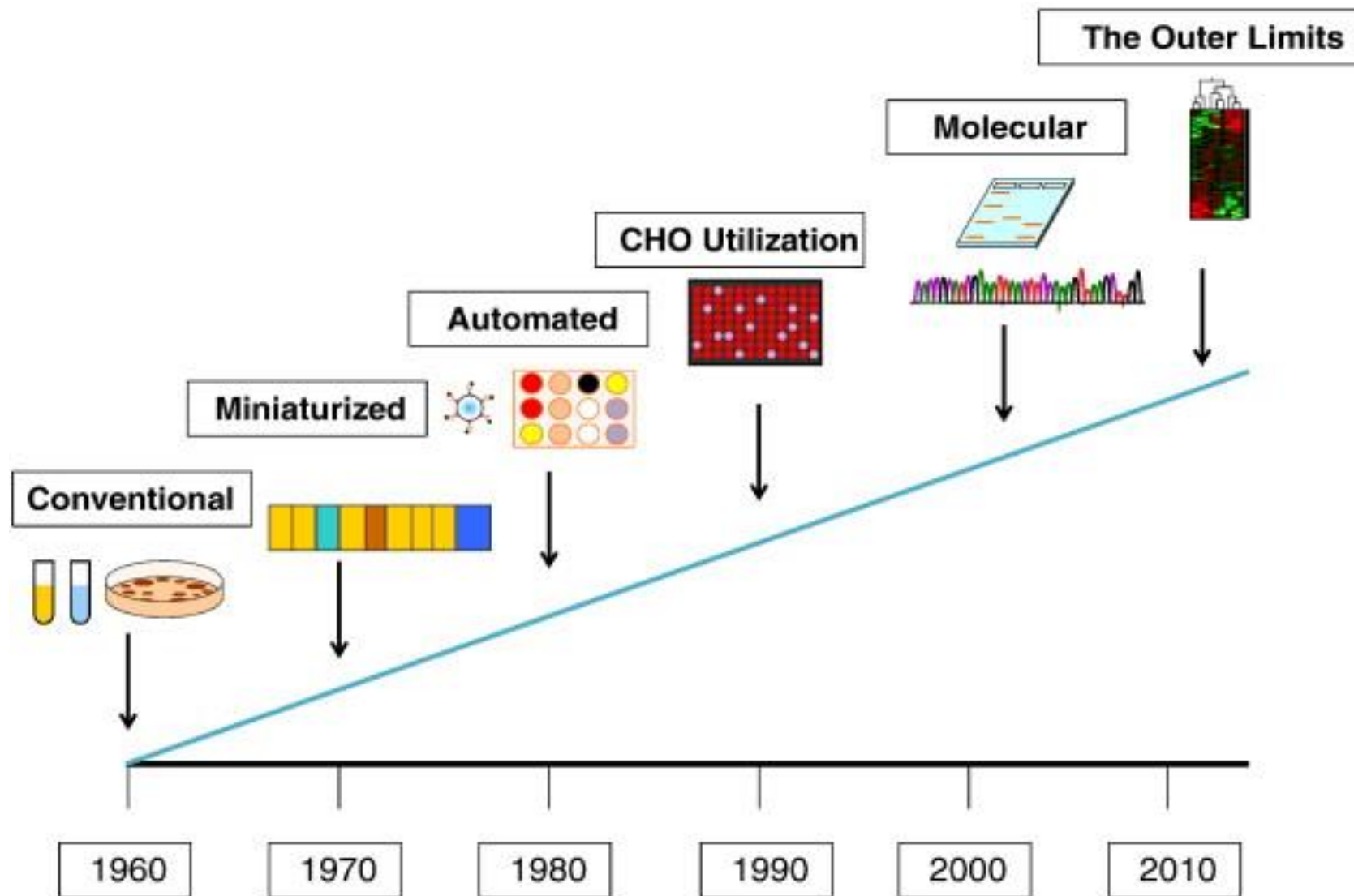
Fábio Marcelo de Lima

Porto Alegre/RS, 26/11/2019

# Roteiro

- Evolução da abordagem do diagnóstico;
- Código genético;
- Evolução do sequenciamento;
- Conceito de sequenciamento
- Plataformas de sequenciamento;
- Custo;
- Aplicações do sequenciamento;
- Artigos;

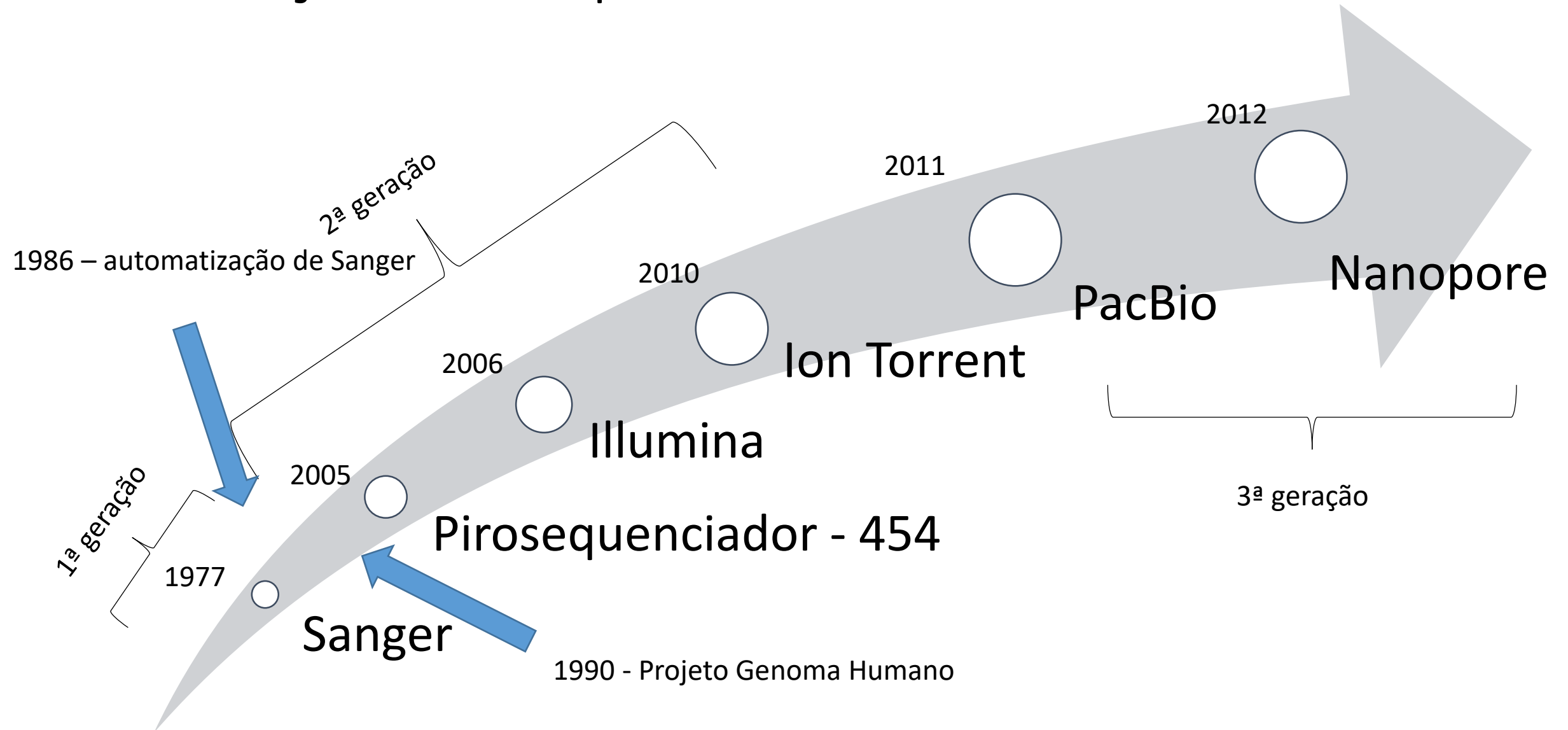
# Evolução da abordagem do diagnóstico



# Código genético



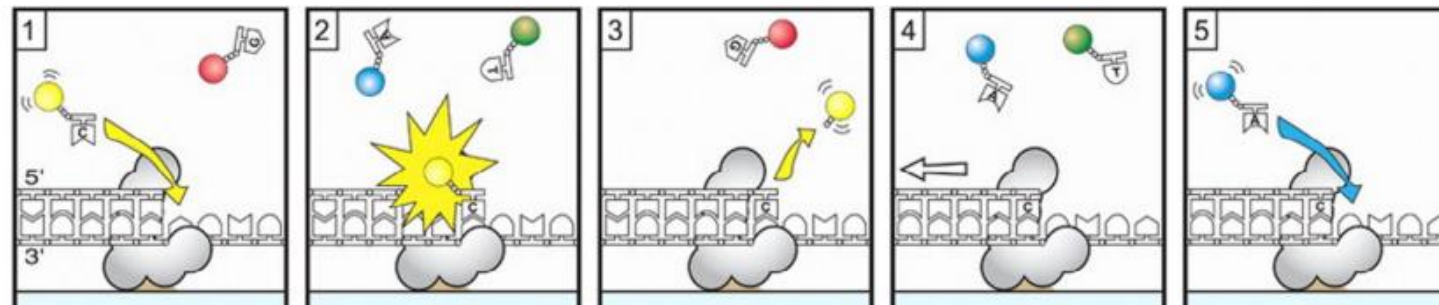
# Evolução do sequenciamento



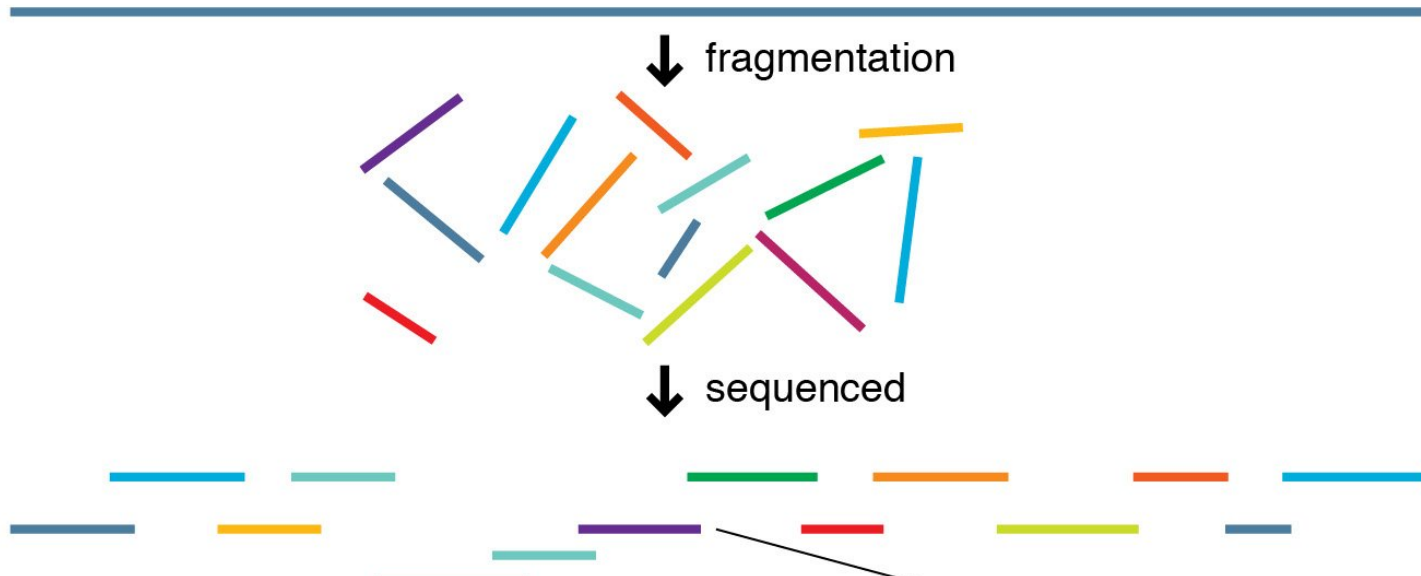
# Sequenciamento

- Conceito

Ciclos alternados de bioquímica induzidos por enzima com obtenção de dados através de imagens (SHENDURE; JI, 2008), que determina a sequência de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA.



Large DNA molecule



Assembly of overlapping DNA sequencing



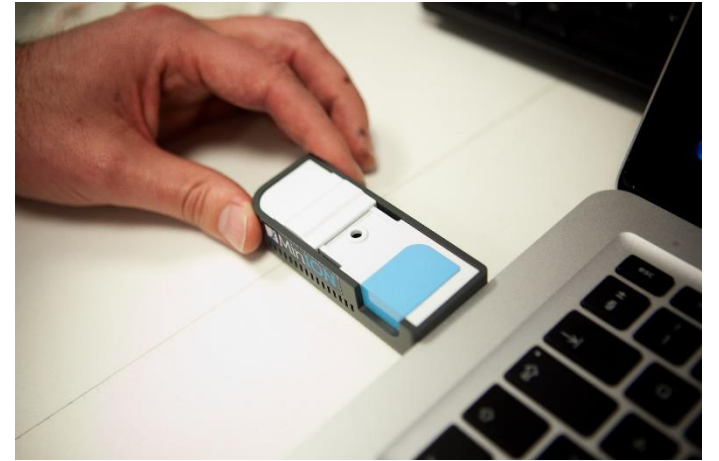
Assembled sequence





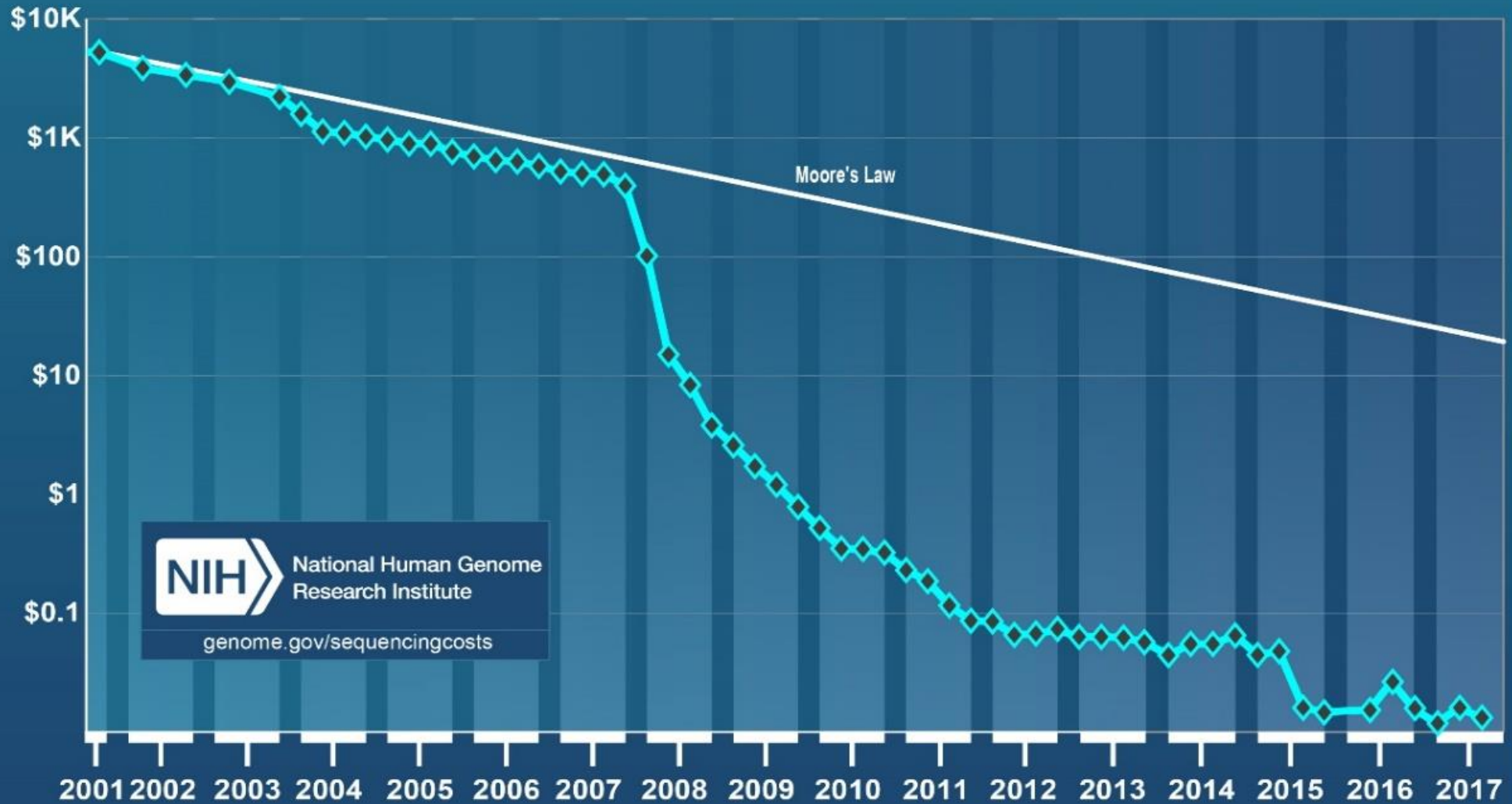
# Plataformas de sequenciamento

 PACIFIC  
BIOSCIENCES™





# Cost per Raw Megabase of DNA Sequence



# Aplicações do sequenciamento

- Caracterização, tipificação e comparação de isolados;
- Vigilância de patógenos causadores de DTA;
- Identificação de micro-organismos deterioradores de alimentos;
- Pesquisa de surtos em saúde animal;
- Informação relacionada a virulência das cepas;
- Genes de resistência antimicrobiana em bactérias;
- Diferenciação entre cepas persistentes e repetidamente inseridas de fontes externas em um estabelecimento industrial;
- Realização de pesquisa retroativa com base na geração e armazenamento de dados de identificação de espécies;

RESEARCH

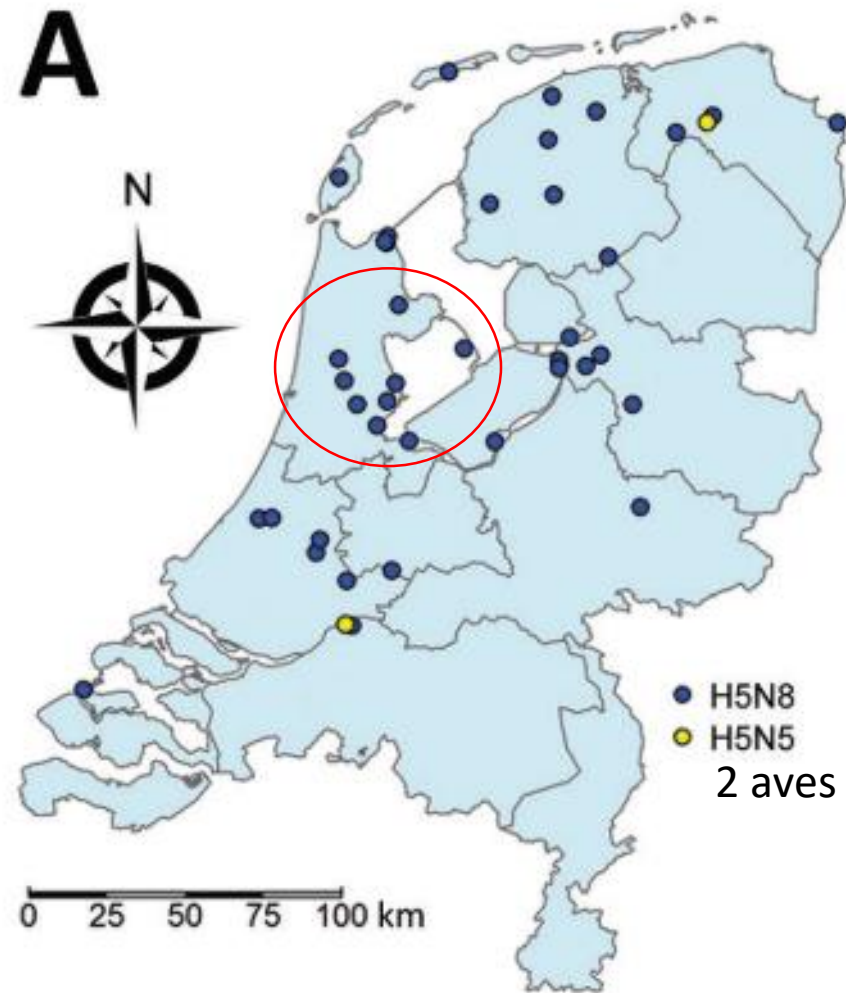
# **Multiple Reassorted Viruses as Cause of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Epidemic, the Netherlands, 2016**

Nancy Beerens, Rene Heutink, Saskia A. Bergervoet, Frank Harders, Alex Bossers, Guus Koch

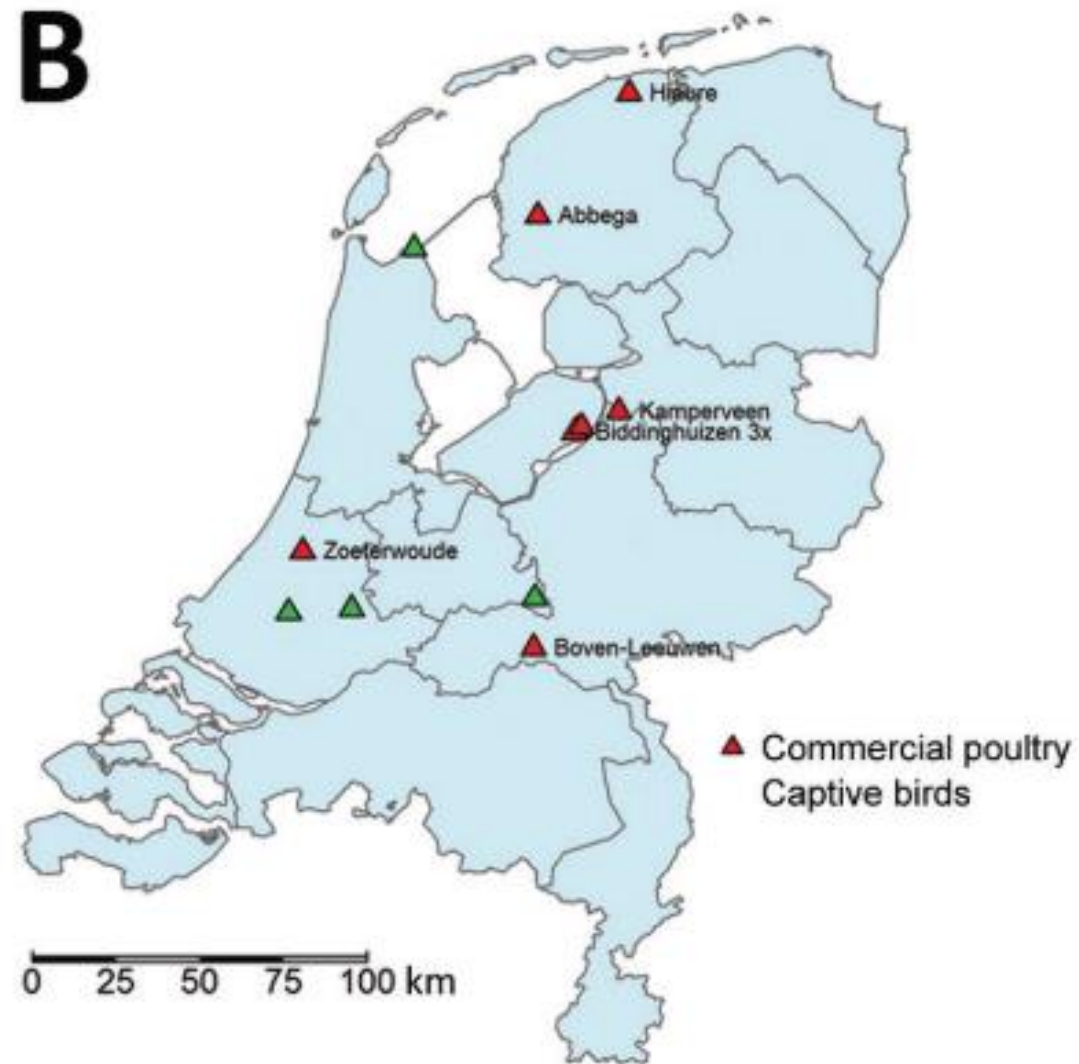
# Introdução

- Maio/16 -Foco de H5N8 HPAI (Rússia e Mongólia) -> alerta;
- Nov/16 – epidemia de H5N8 HPAI na Holanda;
  - Morte em massa de aves silvestres;
  - Várias instalações avícolas comerciais e aves de cativeiro;
  - Pos para H5N8 HPAI;
  - 1ª instalação comercial – próx. Lago com detecção em silvestres (sintomatologia clínica);

# Distribuição geográfica



# Distribuição geográfica



# Amostras

- SC e ST de aves silvestres mortas;
- Aves comerciais – *pools* 5 amostras;
- PCR gene matrix – detecta influenza aviária;
- PCR H5 específico;
- Sequenciamento:
  - Filogenética individual para cada um dos 8 segmentos;

Aves Silvestre	Aves comerciais	Aves de cativeiro	TOTAL
44	8	4	56

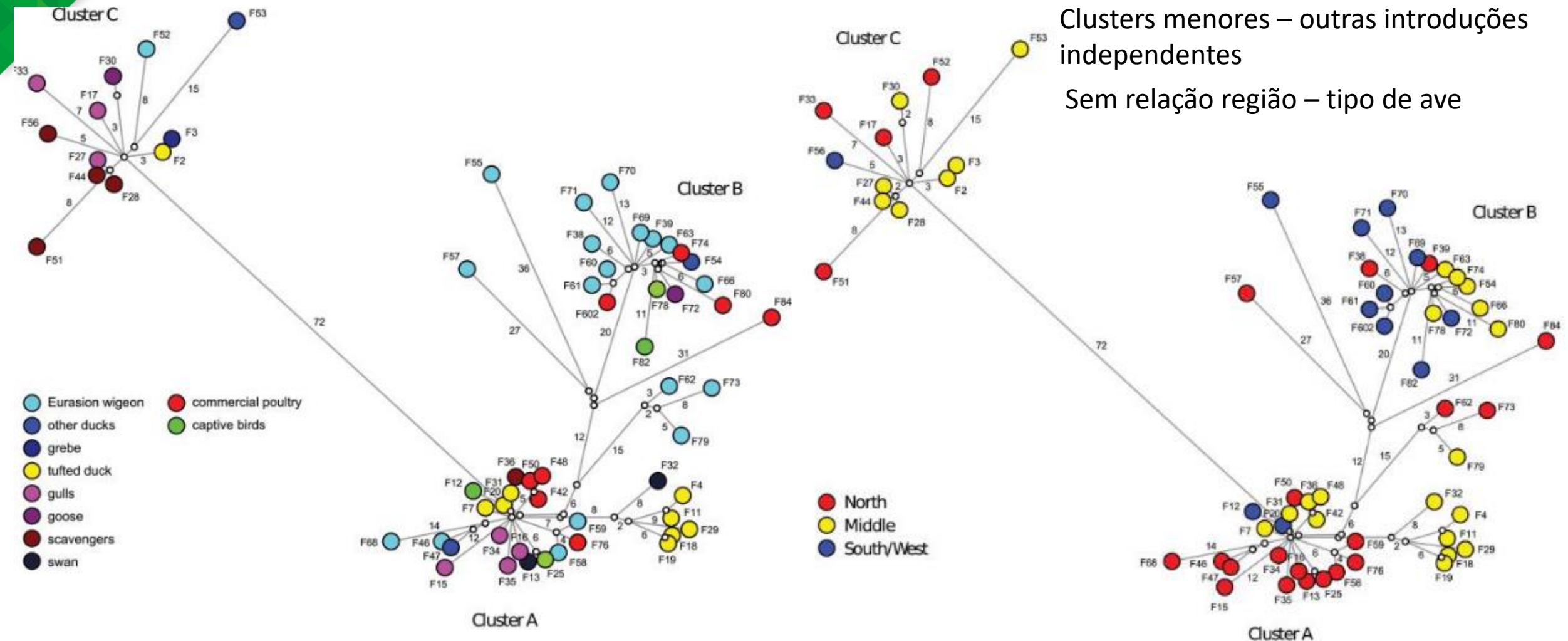


# Distribuição geográfica

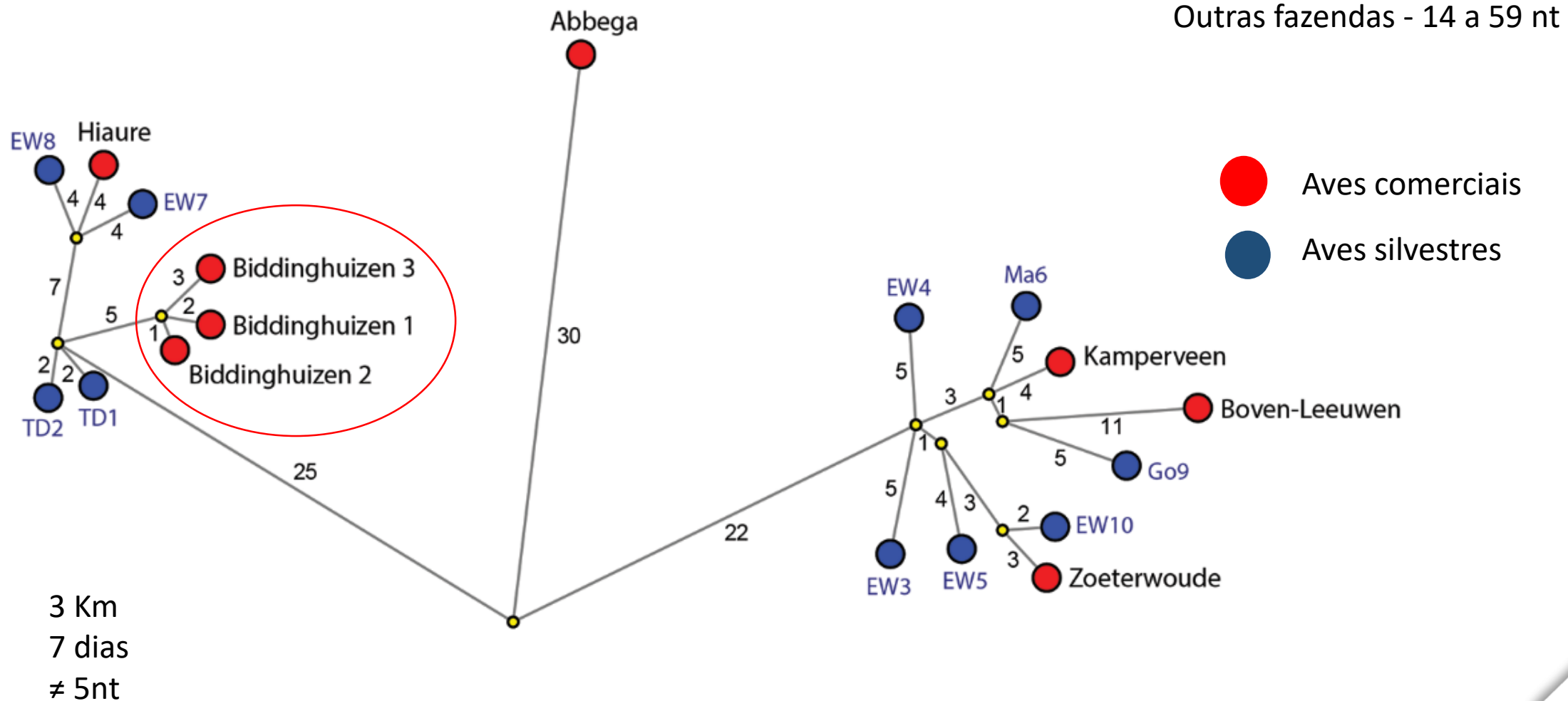
3 introduções distintas - dispersão

Clusters menores – outras introduções independentes

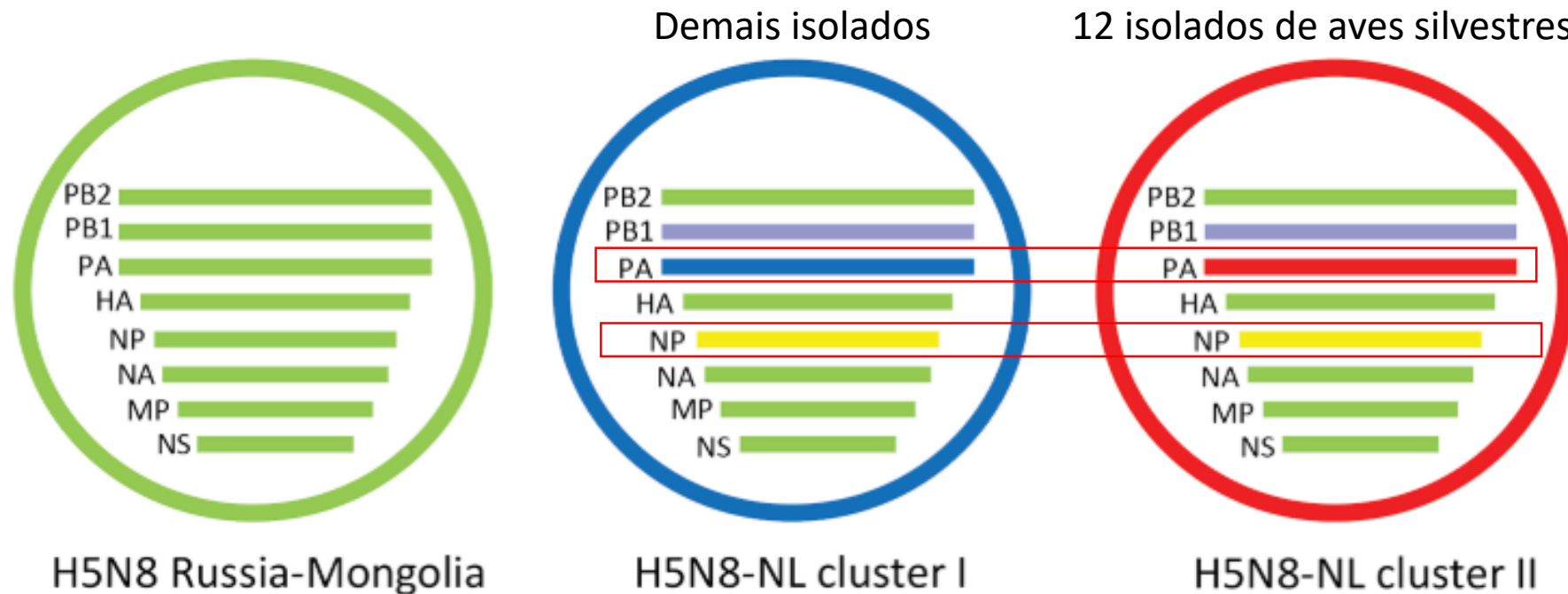
Sem relação região – tipo de ave



# Vírus de aves comerciais e aves silvestres mais próximos

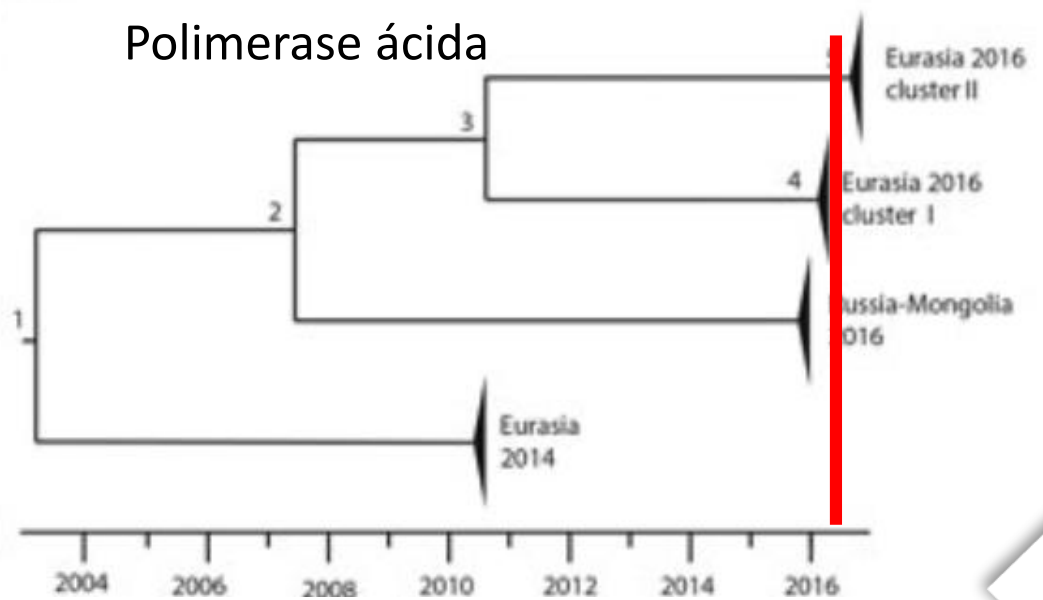
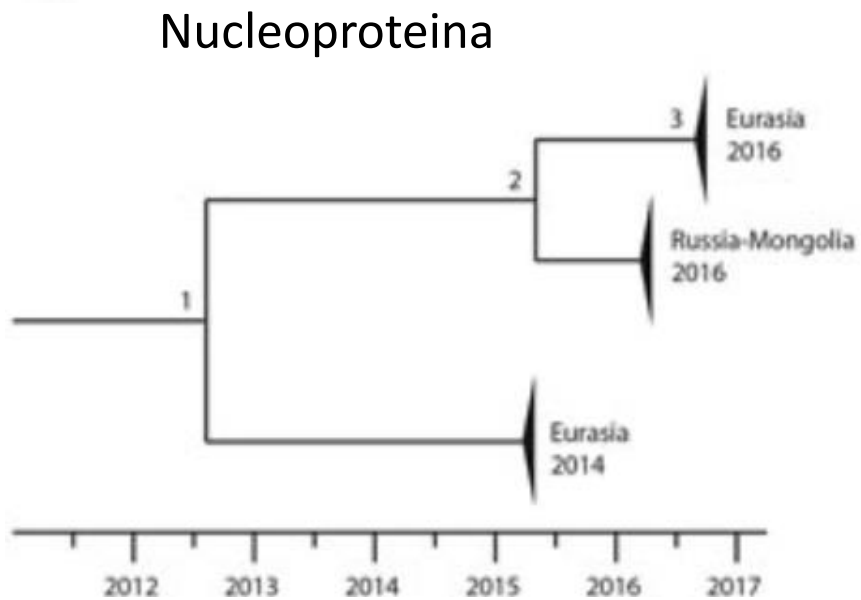
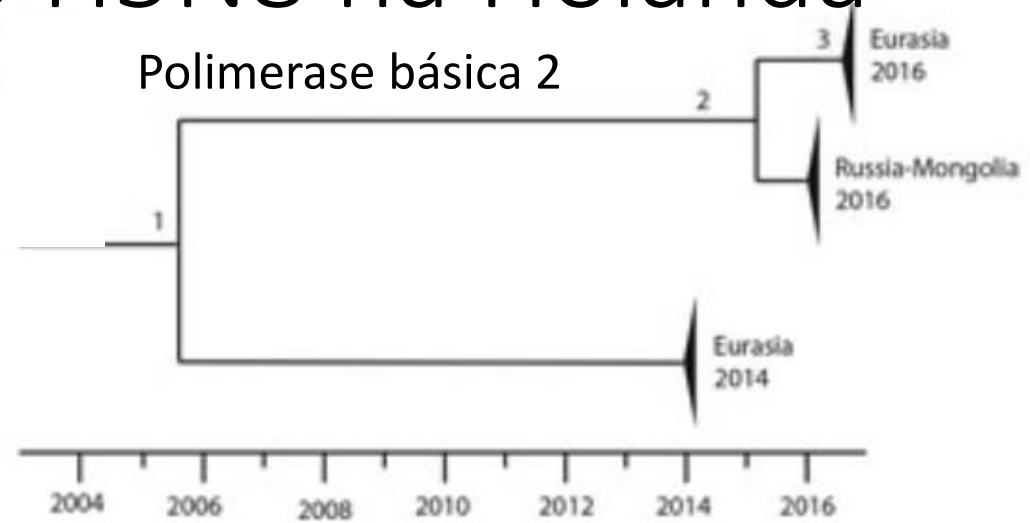
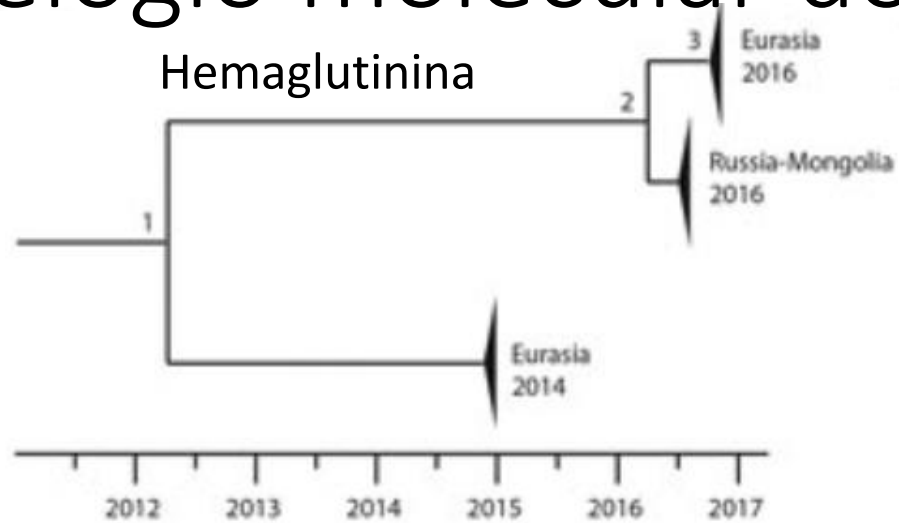


# Análise filogenética do gene PA



HA, hemagglutinin; MP, matrix protein; NA, neuraminidase; NL, Netherlands; NP, nucleoprotein; NS, nonstructural protein; PA, polymerase acidic; PB1, polymerase basic 1; PB2, polymerase basic 2.

# Relógio molecular do H5N8 na Holanda



# Conclusão

H5N8 teve origem no reassortimento múltiplo com vírus LPAI de aves silvestres na Rússia-Mongólia e foi introduzido na Holanda por aves silvestres através áreas de reprodução.

## SURVEILLANCE AND OUTBREAK REPORTS

# A multi-country *Salmonella* Enteritidis phage type 14b outbreak associated with eggs from a German producer: 'near real-time' application of whole genome sequencing and food chain investigations, United Kingdom, May to September 2014

T Inns (thomas.inns@phe.gov.uk)<sup>1</sup>, C Lane<sup>2</sup>, T Peters<sup>2</sup>, T Dallman<sup>2</sup>, C Chatt<sup>3</sup>, N McFarland<sup>4</sup>, P Crook<sup>5</sup>, T Bishop<sup>6</sup>, J Edge<sup>6</sup>, J Hawker<sup>3</sup>, R Elson<sup>2</sup>, K Neal<sup>3</sup>, G K Adak<sup>2</sup>, P Cleary<sup>1</sup>, on behalf of the Outbreak Control Team<sup>7</sup>

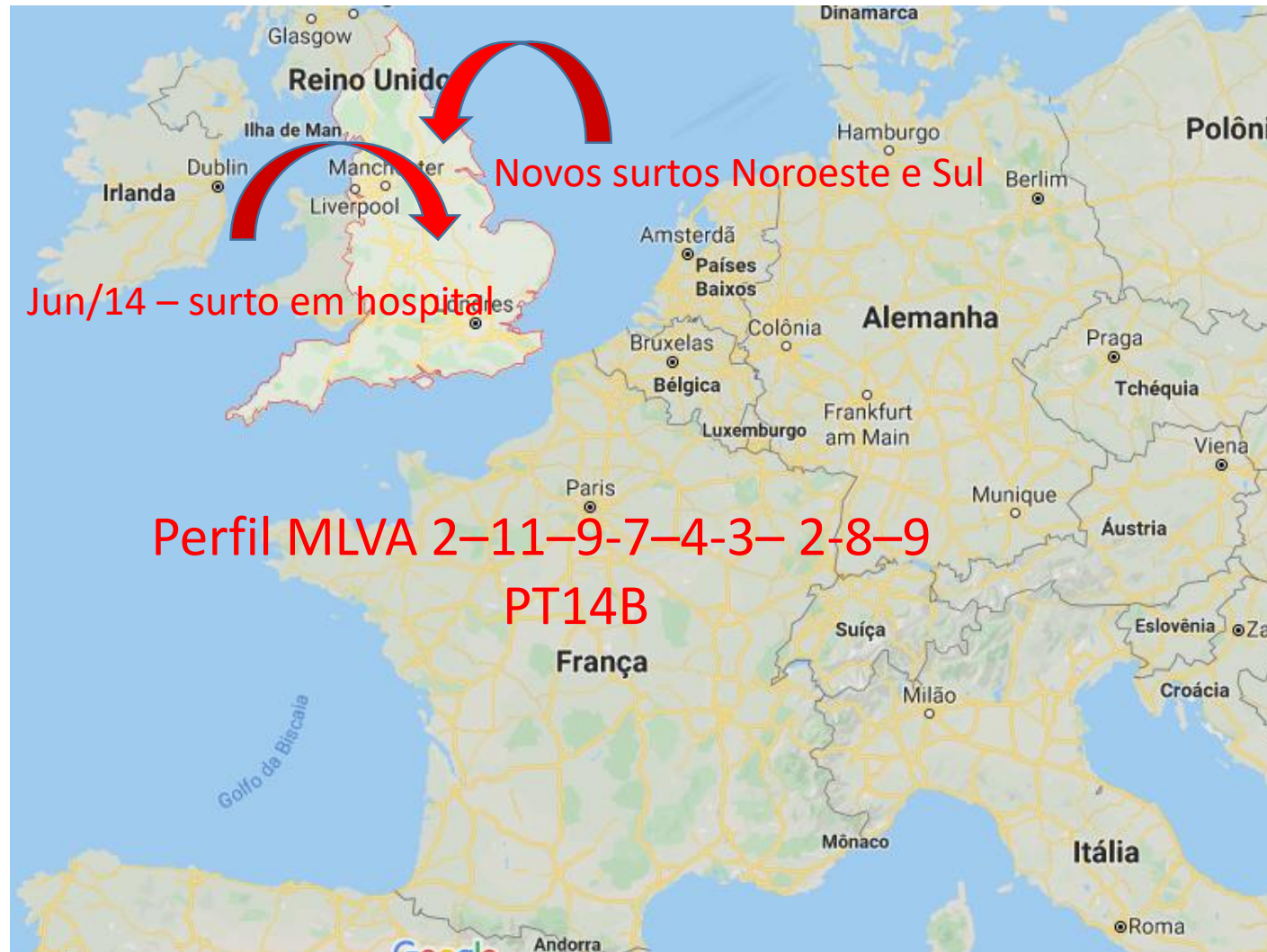
1. Field Epidemiology Services Liverpool, Public Health England, United Kingdom
2. Centre for Infectious Disease Surveillance and Control, Public Health England, United Kingdom
3. Field Epidemiology Services Birmingham, Public Health England, United Kingdom
4. Wessex Public Health England Centre, Public Health England, United Kingdom
5. Field Epidemiology Services Victoria, Public Health England, United Kingdom
6. Food Standards Agency, United Kingdom
7. Members of the team are listed at the end of the article

### Citation style for this article:

Inns T, Lane C, Peters T, Dallman T, Chatt C, McFarland N, Crook P, Bishop T, Edge J, Hawker J, Elson R, Neal K, Adak GK, Cleary P, on behalf of the Outbreak Control Team. A multi-country *Salmonella* Enteritidis phage type 14b outbreak associated with eggs from a German producer: 'near real-time' application of whole genome sequencing and food chain investigations, United Kingdom, May to September 2014. *Euro Surveill.* 2015;20(16):pii=21098. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=21098>

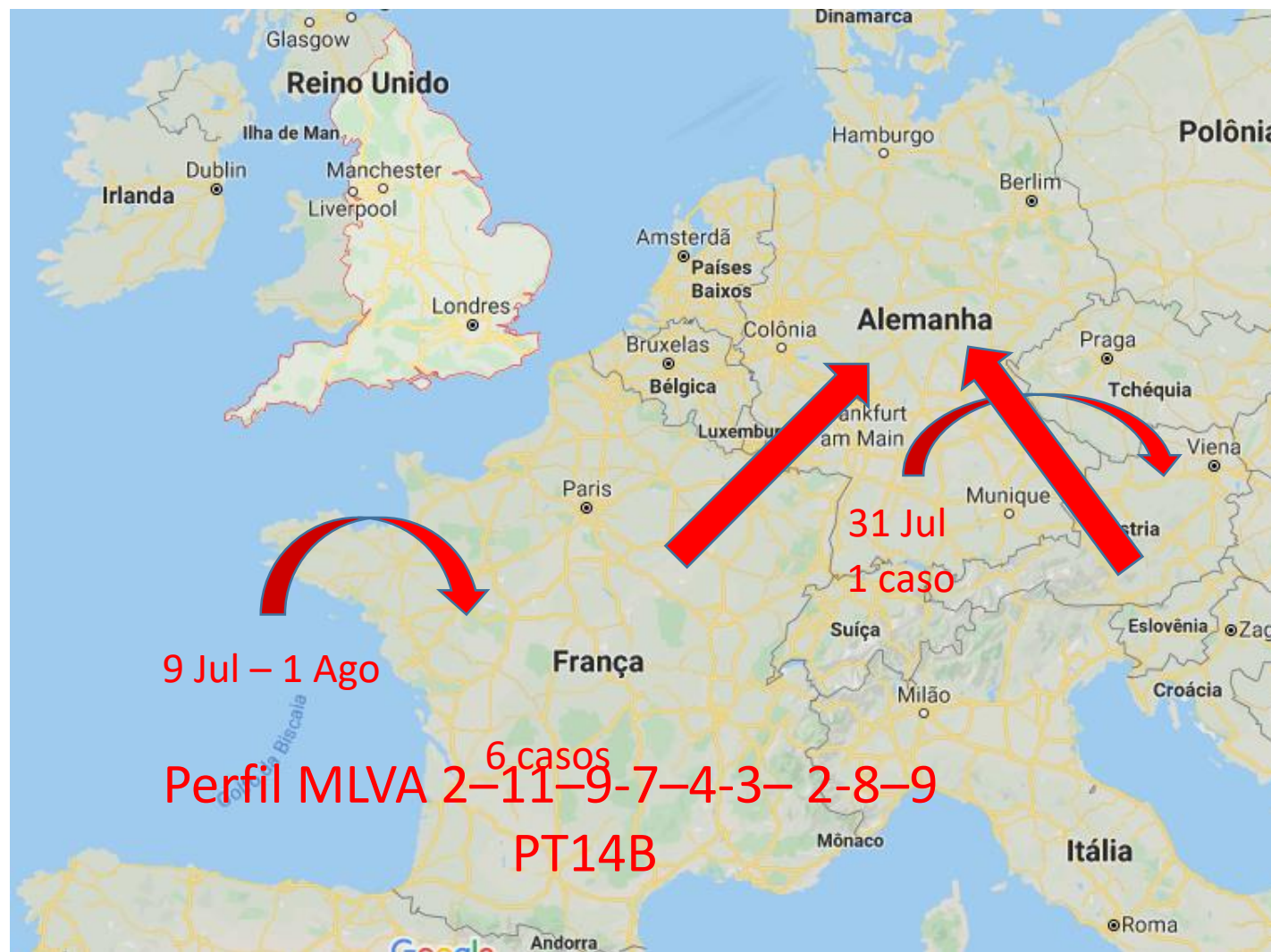


# Eventos





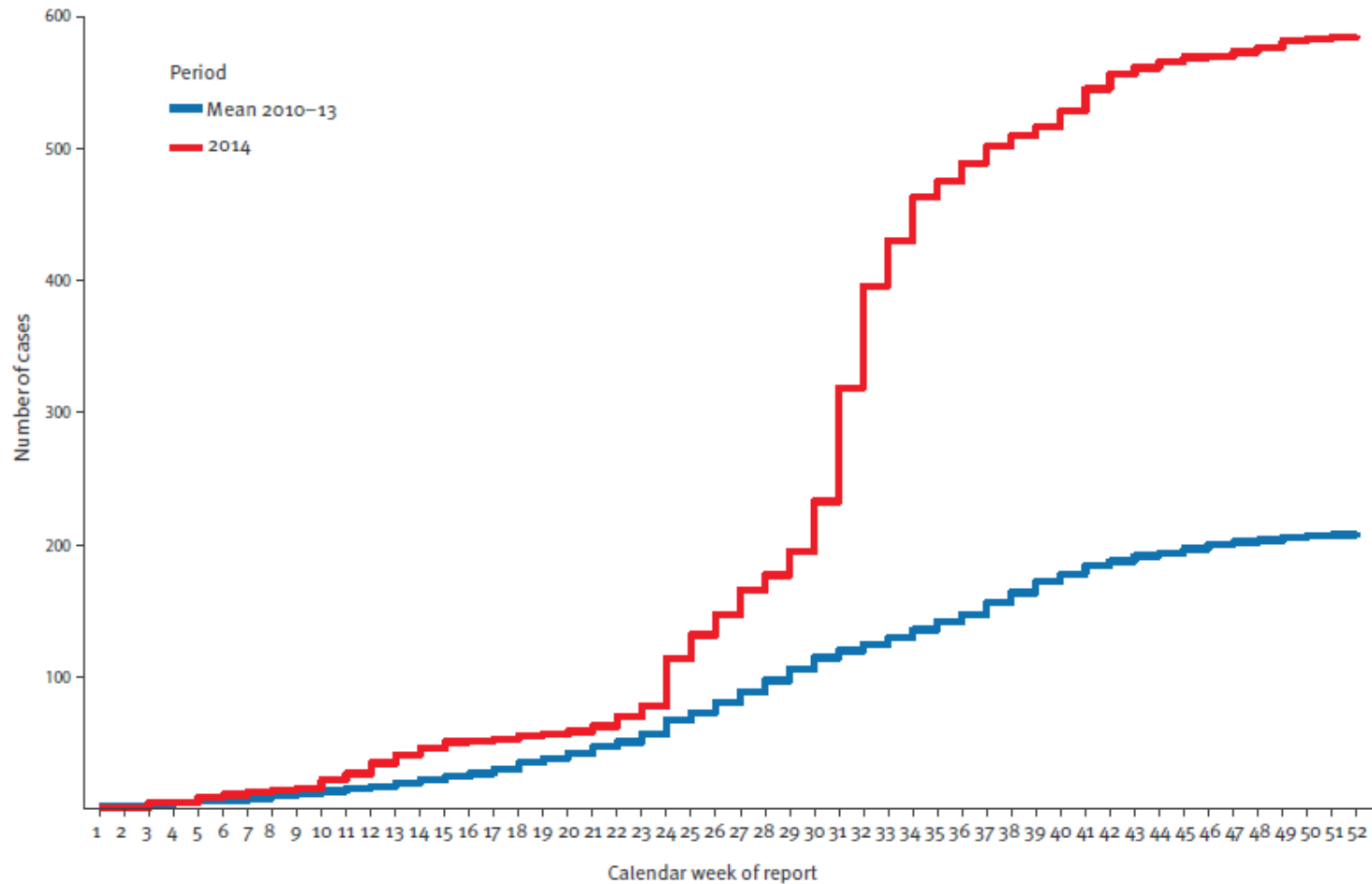
# Eventos



# Eventos

**FIGURE 1**

Cumulative count by calendar week, of *Salmonella* Enteritidis PT14b cases in England and Wales, 2014 compared with the 2010–2013 mean



# Investigação

## Caso:

qualquer pessoa infectada por S. Enteritidis PT14B residente na Inglaterra ou País de Gales, sem histórico de viagem 72 horas anteriores aos sintomas, reportado em ou após 1º jun/14, com perfil MLVA 2-11-9-7-4- 3-2-8-9;

# Investigação

- Aplicação de questionário – identificação de locais de alimentação;
- Estabelecimentos relacionados a vários casos – coleta de amostras ambientais e de alimentos;
- Investigação da distribuição de ovos pela Empresa X para intermediários na Inglaterra;

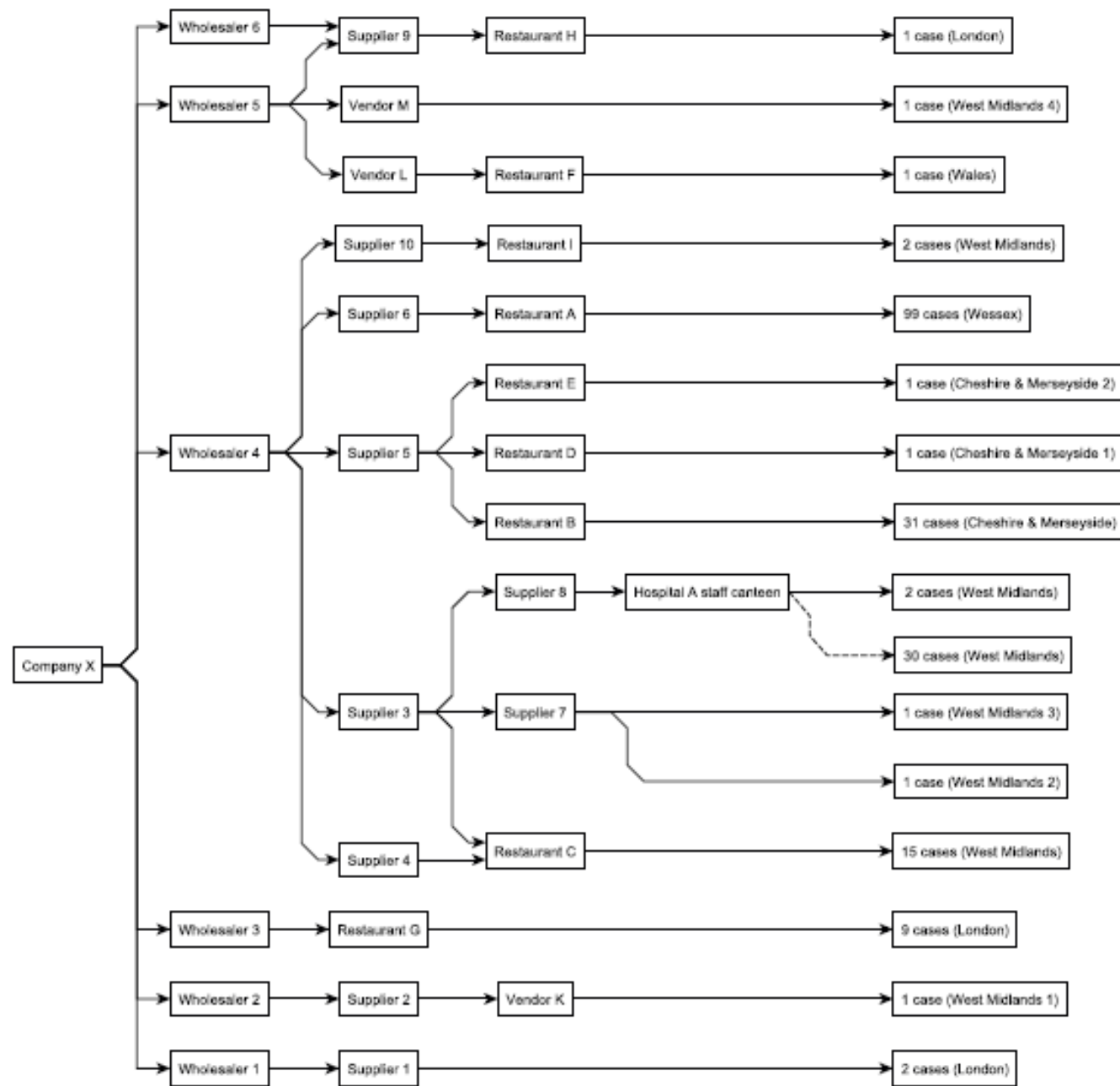
# Descrição do surto

## 287 casos clínicos (UK):

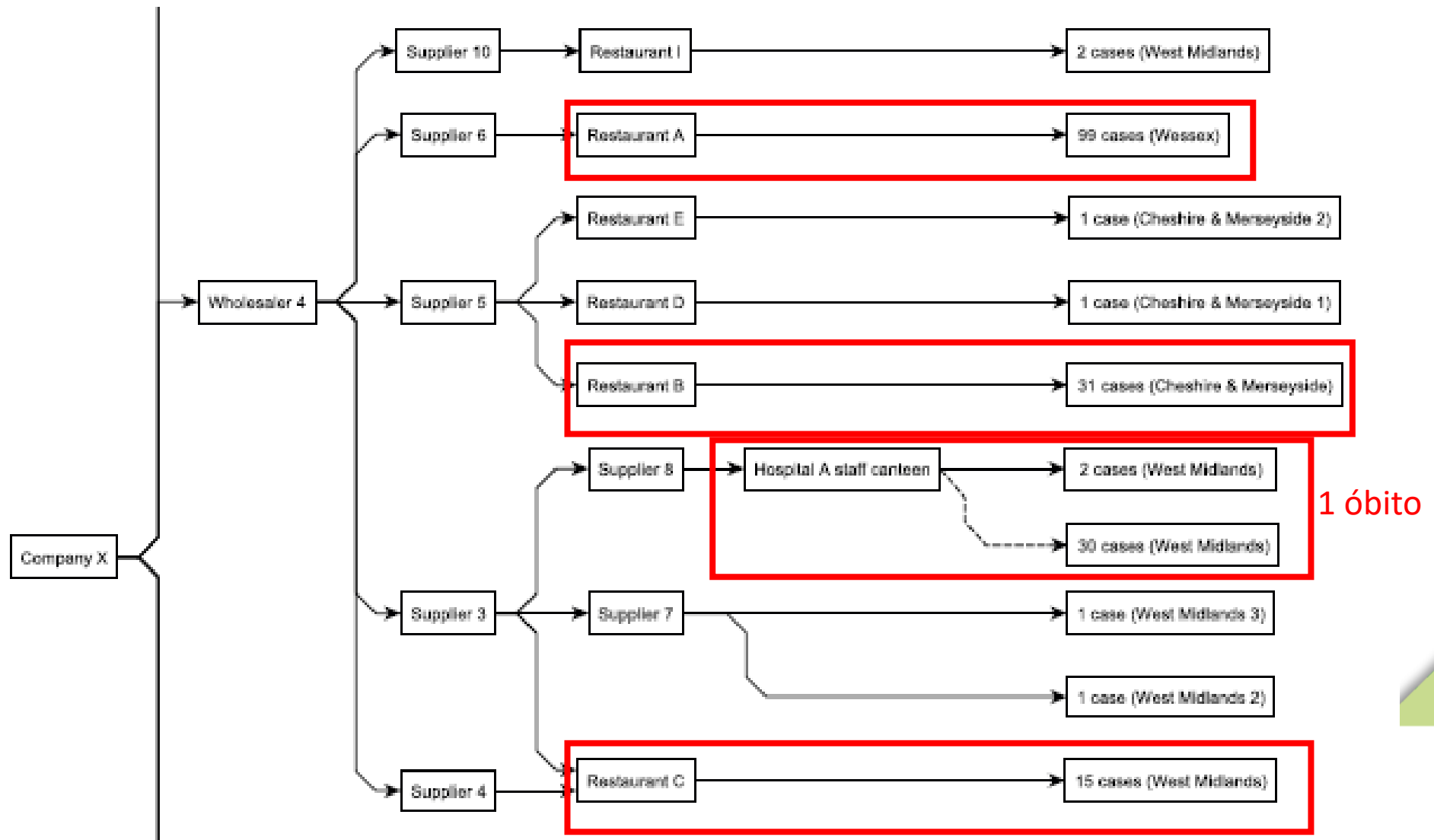
- 1 e 92 anos;
- 78 hospitalizados (16 suspeitas infecção dentro do hospital);
- 53% eram homens;

**FIGURE 3**

Egg supply network showing links between Company X and *Salmonella* Enteritidis phage type 14b cases in England and Wales, 2014



# Descrição do surto





# Descrição do surto

<b>S. Enteritidis PT14B - MLVA compatível com casos clínicos</b>	Hospital A	carrinho bufê
	Restaurante B	alimento
		pano de limpeza
	Restaurante C	pano de pratos
		suabe de pia para preparação de vegetais
		macarrão vegetariano com ovo

# Descrição do surto

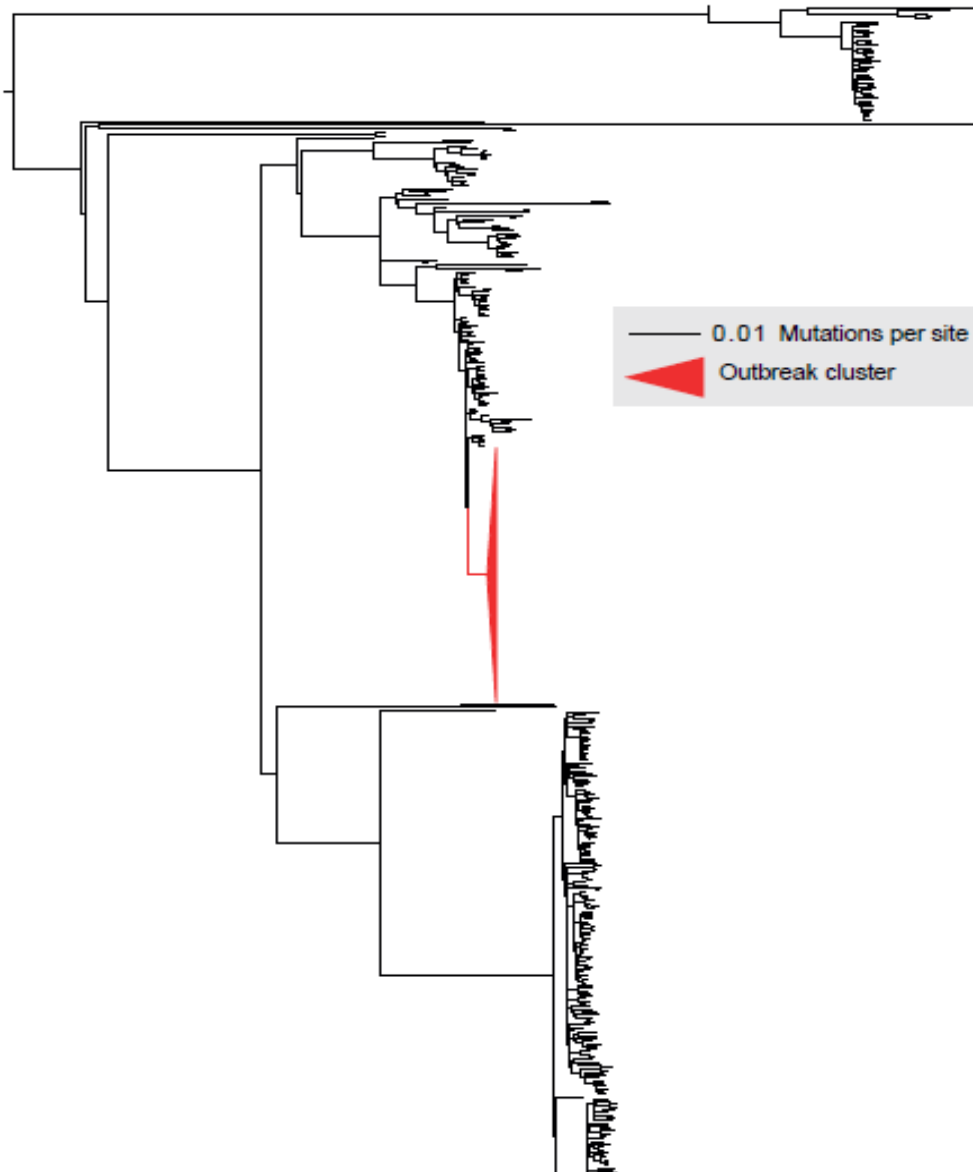
País	Nº isolados	Origem
França	4	2 - casos clínicos
		2 - ovos Empresa X
Luxemburgo	1	casos clínicos
Áustria	6	casos clínicos
Alemanha	14	5 - casos clínicos
		1 - bolo
		8 - ovos Empresa X
Inglaterra	20	ambientais
	287	casos clínicos
<b>TOTAL</b>	<b>332</b>	

# Análises

- Tipificação por MLVA
- Sequenciamento completo de genoma - 332
  - Identificação de SNPs
  - Análise filogenética - 332 surto + 484 (2012-2014; UK)

Início investigação ----- Resultados WGS  
06 Ago/14 26 Ago/14

# Análise filogenética



# Resultados do WGS

- Agrupamento em cluster único;
- SNP do surto (Inglaterra) = 0 à 23;
- SNP restaurantes A, B e C  $\leq 2$ ;
- Isolados ambientais e clínicos relacionados – idênticas ou 1 único SNP;

# Conclusão

- 198 de 287 casos (69%) – ligados a ovos da Empresa X;
- Restaurantes A, B e C – fornecimento de ovos pela Empresa X;
- Maioria dos casos contraiu de serviços de alimentação e não dos ovos diretamente;
- Todas as amostras agruparam em cluster único;

# Medidas de controle

- 2 filiais da Empresa X foram investigados:
  - Salmonella em fezes e poeira
  - Salmonella em ovos – mesmo MLVA
  - Medida: tratamento apropriado dos ovos destinados ao consumo
- Inglaterra:
  - Acompanhamento dos locais envolvidos – conformidade
  - Contato para reiterar preparo de alimentos com ovos
  - Procura de ovos da Empresa X em estabelecimentos



# Discussão

- Clara ligação entre isolados de casos clínicos, ovos e ambiente;
- WGS permite melhor discriminação entre isolados e adiciona uma nova dimensão à epidemiologia descritiva na forma de relações filogenéticas;

Sem WGS haveria apenas a confirmação que os isolados eram do mesmo fagotipo/MLVA.

# Mensagem

- WGS apresenta maior resolução;
- Universal para todos os micro-organismos;
- WGS -> capacidade de substituição de vários métodos;
- Análise retrospectiva;
- Entraves: custo, volume dados, expertise em bioinformática;
- Potencial -> metagenômica;

The slide features a white background with a dark green header bar at the top. The corners are decorated with geometric patterns of various shades of green. The word "OBRIGADO" is centered in a large, bold, black font.

**OBRIGADO**

fabio.marcelo@agricultura.gov.br