

Utilidad de la epidemiología genómica del SARS-CoV-2 en el estudio de brotes nosocomiales

David Panisello Yagüe¹, Andreu C. Pelegrin¹, Montserrat Giménez^{1,2,3}, Irma Casas^{2,4}, Antoni E. Bordoy¹, Sandra Martínez-Puchol^{1,5}, Nieves Sopena^{2,3,6}, Laia Castellà², Laia Soler¹, Gemma Clarà¹, Sara González-Gómez¹, Alèxia Paris de León¹, Ana Blanco¹, Pere-Joan Cardona^{1,3}, Ignacio Blanco⁷, Verónica Saludes^{1,8}, Elisa Martró^{1,8*}

¹Departamento de Microbiología. Laboratori Clínic Metropolitana Nord (LCMN). Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol (IGTP). Badalona. Barcelona. ²Equipo de Control de la Infección Nosocomial. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. ³CIBER en Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Instituto de Salud Carlos III. Madrid. ⁴Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. ⁵Vicerectorat de recerca. Universitat de Barcelona (UB). Barcelona. ⁶Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. ⁷Departamento de Genética Clínica. LCMN. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. ⁸CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Madrid.

Resumen

Objetivo: Determinar el grado de relación genómica entre casos de infección por SARS-CoV-2 involucrados en brotes nosocomiales en un hospital de tercer nivel para informar al Equipo de Control de la Infección Nosocomial (ECIN).

Material y método: Mediante secuenciación rápida de genoma completo (*whole genome sequencing*, WGS) se analizaron prospectivamente todos los brotes nosocomiales detectados en 2022 en el Hospital Germans Trias i Pujol. Los resultados obtenidos referentes a la relación genómica entre casos se informaron rápidamente al ECIN, y se contrastaron con los informes del estudio de epidemiología clásica.

Resultados: En total se detectaron 23 brotes nosocomiales, en los que todos los casos secuenciados y analizados (n=227) pertenecieron a la variante Ómicron, aunque se detectaron varios linajes e identificaron distintas agrupaciones filogenéticas (*clusters*). La mayoría de los brotes no tuvieron un origen único (fueron policlonales) y varios de los *clusters* identificados afectaron a más de una planta del hospital.

Conclusión: Aunque las guías nacionales e internacionales para la vigilancia genómica del SARS-CoV-2 recomiendan realizar WGS en un 10 % de los casos implicados, nuestros resultados indican que es imprescindible secuenciar el mayor número de casos posible para comprender mejor la dinámica de transmisión y el alcance de cada brote nosocomial.

Palabras clave:

Brote nosocomial. SARS-CoV-2. COVID-19. Secuenciación de genoma completo. Epidemiología genómica. Hospital.

Usefulness of the genomic epidemiology of SARS-CoV-2 on the study of nosocomial outbreaks

Summary

Objective: To determine the genomic relationship between cases of SARS-CoV-2 infection involved in nosocomial outbreaks in a third level hospital in order to inform the Nosocomial Infection Control Team (ECIN).

Material and method: Using rapid whole genome sequencing (WGS), all nosocomial outbreaks detected in 2022 at the Germans Trias i Pujol Hospital were prospectively analyzed. The results obtained regarding the genomic relationship between cases were quickly reported to the ECIN, and they were compared with the classical epidemiology study reports.

Results: A total of 23 nosocomial outbreaks were detected, in which all the cases sequenced and analyzed (n=227) belonged to the Omicron variant of concern, although several lineages were detected and different phylogenetic clusters were identified. Most of the outbreaks did not have a single origin (they were polyclonal) and several of the clusters identified affected more than one hospital ward.

Conclusion: Although the national and international guidelines for the genomic surveillance of SARS-CoV-2 recommend performing WGS in 10% of the cases involved, our results demonstrate the usefulness of sequencing as many cases as possible to better understand the transmission dynamics and the spread of each nosocomial outbreak.

Key words:

Nosocomial outbreak. SARS-CoV-2. COVID-19. Whole Genome Sequencing. Genomic epidemiology. Hospital.

Introducción

Con el escenario de la pandemia de COVID-19, las técnicas moleculares han sido clave para la identificación y el estudio de su agente etiológico: el coronavirus del síndrome respiratorio agudo grave 2 (SARS-CoV-2). Concretamente y desde la perspectiva de la epidemiología, la caracterización de su genoma mediante la secuenciación ha permitido el seguimiento a tiempo real de las distintas variantes del virus, así como el estudio de la transmisión del SARS-CoV-2. De este modo, se ha convertido en una herramienta clave para informar a las autoridades sanitarias y de salud pública, facilitando así la toma de medidas de control necesarias. De hecho, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC, por sus siglas en inglés) ya indicó en abril del 2020 la necesidad de implementar la vigilancia epidemiológica de la COVID-19 a nivel nacional en los estados miembros de la UE, incluyendo los siguientes objetivos¹: (i) vigilancia virológica para seguir la evolución de los cambios en el genoma del SARS-CoV-2, lo cual sería clave para el desarrollo de fármacos, vacunas y pruebas diagnósticas; y (ii) detección y control de brotes de SARS-CoV-2, tanto a nivel nosocomial como en centros de larga estancia y comunidades aisladas para proteger a los pacientes y al personal. Más allá de la clasificación en variantes de interés o preocupantes (VOI y VOC) establecida por la OMS y el CDC^{2,3}, A. Rambaut *et al.*⁴ propusieron una clasificación en linajes basada en la filogenia del SARS-CoV-2; el sistema Pango ofrece una clasificación de mayor resolución, especialmente útil para estudiar la transmisión del virus a una mayor profundidad.

Un brote nosocomial, a nivel epidemiológico, se define como la presencia de más de un caso positivo para SARS-CoV-2 entre pacientes, personal sanitario y/o trabajadores en un espacio determinado del centro sanitario, donde al menos un caso sea el de un paciente en su octavo día de ingreso o posterior⁵. La secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés) del SARS-CoV-2 nos permite ir un paso más allá; estudiar las diferencias a nivel genómico entre los casos que comparten un vínculo epidemiológico permite determinar el grado de relación entre ellos. Esta información, en combinación con los estudios de epidemiología clásica, puede ayudar a inferir las vías de introducción y de transmisión del SARS-CoV-2 en el hospital para poder intervenir en ellas y reducir el impacto de los brotes.

Con el objetivo de determinar el grado de relación genómica entre casos de SARS-CoV-2 involucrados en brotes nosocomiales detectados en un hospital de tercer nivel y aportar esta información al Equipo de Control de la Infección Nosocomial (ECIN), implementamos una técnica de secuenciación rápida y analizamos prospectivamente todos los brotes durante el año 2022.

Material y método

Se secuenciaron muestras tomadas de pacientes ingresados en el Hospital Germans Trias i Pujol, de Badalona (Barcelona, España), así como de los profesionales del hospital, cuando había sospecha que podían estar involucrados en brotes de transmisión nosocomial, según criterios epidemiológicos⁵. Los pacientes involucrados en brotes nosocomiales fueron negativos para SARS-CoV-2 en el momento del ingreso y presentaron positividad para el virus durante su ingreso.

Una vez el ECIN detectó cada uno de los brotes, se tomaron medidas de contención y se programó inmediatamente el cribado de los pacientes de toda la planta afectada. A partir de las muestras tomadas (hisopos nasofaríngeos), se extrajeron los ácidos nucleicos de forma automática mediante el equipo Microlab STARlet (Hamilton) con el STARMag Universal Cartridge Kit (Seegene). La presencia de SARS-CoV-2 se confirmó mayoritariamente por RT-PCR en un solo paso con la prueba Allplex™ SARS-CoV-2/FluA/FluB/RSV (Seegene) en equipos CFX96 (BIO-RAD). Para algunas muestras urgentes, la detección viral se realizó mediante el ensayo TMA Aptima® SARS-CoV-2 (Hologic) en la plataforma Panther® Scalable Solutions (Hologic) o con Simplexa™ COVID-19 & Flu A/B Direct en el dispositivo Liason® MDX (DiaSorin Molecular).

Para llevar a cabo la secuenciación, los eluidos de ácidos nucleicos fueron procesados mediante un protocolo de Nanopore Sequencing Technologies (ONT)⁶. Esta metodología de secuenciación, previamente validada en nuestro laboratorio en comparación con la de Illumina, nos permitió informar más rápidamente los resultados de secuenciación al ECIN del hospital. Para ello, el genoma del SARS-CoV-2 fue retrotranscrito y amplificado con el Midnight Expansion kit (ONT). Las muestras con un valor de Ct para el gen RdRp superior a 35 o con una concentración de los productos de amplificación inferior a 6 ng/μl fueron descartadas. A partir de los amplicones generados se prepararon e indexaron librerías genómicas mediante el Rapid Barcoding Kit 96 (ONT) y se secuenciaron en el dispositivo MinION Mk1C con *flow cells* R9.4.1 (ONT), según indicaciones del fabricante. Los datos crudos de secuenciación se procesaron con el pipeline nf-core/viralrecon⁷, que incluye las herramientas Nextclade y Pango para determinar la calidad de las secuencias consenso, detectar las mutaciones presentes y asignar el linaje de SARS-CoV-2 correspondiente. Las secuencias consenso obtenidas se alinearon con otras secuencias circulantes en España del mismo linaje en fechas similares, obtenidas del repositorio GISAID⁸. Se obtuvieron árboles filogenéticos por Máxima Verosimilitud y se calculó el número de polimorfismos de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) entre pares de muestras.

Con la información obtenida se elaboraron informes para el ECIN, indicando qué casos estaban estrechamente relacionados, cuando: (i) compartían un origen común reciente (agrupan en un *cluster* monofilético en el árbol filogenético) y (ii) se encontraban a ≤ 2 SNPs de diferencia, de acuerdo con la baja tasa de acumulación de mutaciones (promedio de ≤ 30 sustituciones al año⁹). En los casos en que se encontró el mismo linaje entre las secuencias de dos o más brotes coetáneos, se analizaron dichas secuencias conjuntamente en un mismo árbol filogenético.

Resultados

Entre enero y diciembre de 2022 se detectaron 23 brotes nosocomiales de SARS-CoV-2 en el hospital, con un total de 335 casos con sospecha de estar involucrados en estos brotes (mediana: 11 casos/brote; rango: 4-35), entre pacientes (65,7%) y profesionales (34,1%) provenientes de un total de 13 unidades distintas del hospital (Tabla 1).

Tabla 1. Información de los brotes durante el año 2022 y número de casos sometidos a secuenciación de cada brote.

Brote	Ubicación del brote en el hospital	Fecha de la primera muestra	Fecha de la última muestra	Número de casos secuenciados
1	K	17/01/2022	20/01/2022	4
2	B	18/01/2022	24/01/2022	11
3	E	24/01/2022	03/02/2022	6
4	E	09/02/2022	21/02/2022	7
5	G	21/02/2022	07/03/2022	27
6	A	30/03/2022	24/04/2022	21
7	B, C, D	30/03/2022	24/04/2022	18
8	E	12/04/2022	21/04/2022	8
9	F	19/04/2022	23/04/2022	5
10	G	12/04/2022	22/04/2022	5
11	G	03/05/2022	16/05/2022	8
12	E, L, M	11/05/2022	19/05/2022	8
13	A	28/05/2022	04/06/2022	8
14	A	21/06/2022	04/07/2022	16
15	H	27/06/2022	29/06/2022	6
16	C	03/07/2022	04/07/2022	5
17	J	14/07/2022	28/07/2022	8
18	C	05/08/2022	16/08/2022	4
19	C	07/10/2022	02/11/2022	11
20	A	02/11/2022	21/11/2022	21
21	I	21/11/2022	06/12/2022	10
22	B	08/12/2022	19/12/2022	5
23	G	03/12/2022	13/12/2022	5

En total, se analizaron 227 muestras mediante WGS y se obtuvieron 209 secuencias genómicas de calidad. Todas ellas pertenecieron a la variante Ómicron, pero se detectaron varios sublinajes (pertenecientes a los linajes parentales BA.1, BA.2, BA.3, BA.5, BE.1, BF.1, BF.7 y BQ.1) y se identificaron distintas agrupaciones filogenéticas o *clusters* implicados. De hecho, se observó que la mayoría de los brotes eran policlonales, evidenciándose así múltiples introducciones independientes del virus en muchas de las plantas afectadas. También se observó, en algunos casos, que las secuencias halladas en casos de dos o más plantas tenían un origen común reciente, evidenciando la transmisión entre dichas plantas.

El mes de abril de 2022 destacó por ser uno de los meses en que se detectaron más brotes: 5, que afectaron pacientes y/o profesionales de siete plantas distintas. Éstos involucraron a 76 casos, de los cuales pudimos analizar las secuencias de 53 muestras. Las secuencias pertenecieron a cuatro sublinajes distintos de Ómicron (BA.2, BA.2.3, BA.2.9 y BA.2.12), pudiéndose observar 14 introducciones independientes en total. La gran mayoría de estas secuencias agruparon en seis *clusters* de transmisión, mientras que ocho fueron casos aislados que no dieron lugar a transmisión intrahospitalaria (no presentaron relación con ninguna otra secuencia). Dos de estos seis *clusters* identificados en el mes de abril de 2022 (sublinajes BA.2 y BA.2.9) no dieron lugar a transmisión entre plantas. En cambio, los otros cuatro *clusters* afectaron a más de una planta: *cluster* 1, sublinaje BA.2.3 en las plantas A y B; *cluster* 2, sublinaje BA.2 en las plantas B y C; *cluster* 3, sublinaje BA.2.9 en las plantas C, E y F; y *cluster* 4, sublinaje BA.2.9, en las plantas C y F.

Discusión

Gracias a los resultados de WGS pudimos comprobar la complejidad de la diseminación del SARS-CoV-2 en los brotes nosocomiales notificados durante el año 2022. Dichos brotes fueron mayormente policlonales, al igual que en otros estudios realizados de forma similar^{10,11}, en los que se observó que la aplicación de WGS suele revelar la concurrencia de *clusters* y casos aislados de SARS-CoV-2. Cabe destacar que el rastreo de contactos junto a los resultados genómicos puede confirmar la existencia de vínculos entre distintas áreas o plantas^{10,12}, así como observamos también en nuestro hospital. Esta diseminación entre plantas pudo relacionarse con traslados de pacientes entre plantas en algunos casos y por el movimiento del personal en otros, como indican otros estudios^{10,12}. En alguno de los brotes no pudo identificarse una relación directa.

Nótese que gracias a haber secuenciado las muestras de los casos de todas las plantas del hospital afectadas por algún brote

en abril (incluyendo a pacientes y profesionales), se pudieron establecer relaciones entre casos de diferentes plantas. Por ejemplo, en la planta B hubo un solo caso del sublinaje BA.2.3, que resultó formar parte del *cluster* 1, el cual estaba diseminado entre profesionales y pacientes de la planta A. De no haberse secuenciado las muestras de la planta A, ese caso de la planta B se hubiera creído aislado. Además, en la planta C se identificaron 12 secuencias del sublinaje BA.2.9, que en realidad pertenecían a dos *clusters*, el 3 y el 4, que también involucraban diez casos más de las plantas E y F. A pesar de que algunas guías de vigilancia epidemiológica recomiendan la secuenciación del 10% de las muestras implicadas en un brote¹³ y asumen que eso bastaría para asignar la variante causante a todos los casos epidemiológicamente relacionados, nuestros resultados indican que la introducción de más de una variante en un determinado espacio y tiempo es posible, e incluso frecuente, por lo que ese porcentaje podría resultar insuficiente.

En conclusión, dado que la transmisión de SARS-CoV-2 no es homogénea en los brotes nosocomiales, la WGS es de gran utilidad para detectar las variantes virales introducidas y determinar cuáles de estas han causado la diseminación de la infección. Además, permite encontrar vínculos que inicialmente carecían de sospecha epidemiológica. Por ello, nuestro estudio indica la necesidad de secuenciar el mayor número posible de los casos potencialmente involucrados y así poder comprender con precisión la dinámica de transmisión y el alcance de cada brote.

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado con el soporte de la Fundació Marató de TV3 (Proyecto Ref. 342/C/2021). Los autores agradecen el soporte del Programa CERCA /Generalitat de Catalunya al Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol (IGTP).

Bibliografía

1. ECDC. Strategies for the surveillance of COVID-19; April 2020 [Internet]. [Consultado 22 Abr 2023]. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/strategies-surveillance-covid-19>
2. CDC. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions; March 2023 [Internet]. [Consultado 22 Abr 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
3. Organización Mundial de la Salud. Seguimiento de las variantes del SARS-CoV-2; Marzo 2023 [Internet]. [Consultado 22 Abr 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>
4. Rambaut A, Holmes EC, O'Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat Microbiol*. 2020;5(11):1403-7.
5. UK Health Security Agency. COVID-19: epidemiological definitions of outbreaks and clusters; Agosto 2020 [Internet]. [Consultado 22 Abr 2023]. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/covid-19-epidemiological-definitions-of-outbreaks-and-clusters>
6. Freed NE, Vlková M, Faisal MB, Silander OK. Rapid and inexpensive whole-genome sequencing of SARS-CoV-2 using 1200 bp tiled amplicons and Oxford Nanopore Rapid Barcoding. *Biology Methods and Protocols*. 2020;5(1), bpaa014.
7. Ewels PA, Peltzer A, Fillinger S, Patel H, Alneberg J, Wilm A, et al. The nf-core framework for community-curated bioinformatics pipelines. *Nat Biotechnol*. 2020;38(3):276-8. Disponible en: <https://nf-co.re/viralrecon>.
8. GISAID. GISAID [Internet]. [Consultado 31 Dic 2022]. <https://gisaid.org/>
9. NEXTSTRAIN. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 with subsampling focused globally since pandemic start [Internet]. [Consultado 31 Dic 2022]. Disponible en: <https://nextstrain.org/ncov/gisaid/global/all-time?l=clock>
10. Berggreen H, Løvestad AH, Helmersen K, Jørgensen SB, Aamot HV. Lessons learned: use of WGS in real-time investigation of suspected intrahospital SARS-CoV-2 outbreaks. *J Hospital Infect*. 2023;131:81-8.
11. Hare D, Meaney C, Powell J, Slevin B, O'Brien B, Power L, et al. Repeated transmission of SARS-CoV-2 in an overcrowded Irish emergency department elucidated by whole-genome sequencing. *J Hospital Infect*. 2020;126:1-9.
12. Ellingford JM, George R, McDermott JH, Ahmad S, Edgerley JJ, Gokhale D, et al. Genomic and healthcare dynamics of nosocomial SARS-CoV-2 transmission. *Elife*. 2021;10:e65453.
13. Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya. Vigilància de noves variants de SARS-CoV-2: integració de la seqüència genòmica del SARS-CoV-2 al Sistema de Vigilància de Catalunya; Setembre 2022 [Internet]. [Consultado 22 Abr 2023]. Disponible en: <https://hdl.handle.net/11351/5782>