

MESA: Innovaciones y avances en epidemiología molecular y genómica en estudios de contactos

Moderadores: **Pere J. Cardona.** *Servicio de Microbiología. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.*
Cristina Pitart. *Servicio de Microbiología Hospital Clínic. Barcelona.*

Retos y avances en la estrategia de epidemiología genómica de la TB en Cataluña (TB-SEQ)

Elisa Martró^{1,2,3} en nombre del grupo de estudio TB-SEQ

¹*Servei de Microbiologia. Laboratori Clínic Metropolitana Nord (LCMN). Institut d'Investigació i Hospital Germans Trias i Pujol (IGTP-HUGTIP). Badalona.*
²*Consorcio de Investigación Biomédica en Red de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). Instituto de Salud Carlos III. Madrid.* ³*Pathogen Diagnostics and Genomic Epidemiology research group.*

Correspondencia:
Elisa Martró
E-mail: emartro@igtp.cat

Inicios e implementación de la estrategia TB-SEQ

A finales del año 2021 se inició el proyecto piloto TB-SEQ, con el objetivo de integrar la genómica del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) en las actividades formales de vigilancia epidemiológica para mejorar el control y la prevención de la tuberculosis (TB) en Cataluña. Esta estrategia se implementó formalmente a finales de 2022 como una nueva línea de acción impulsada por el *Servei de Prevenció i Control de la TB de la Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de l'Agència de Salut Pública de Catalunya*. El Servicio de Microbiología del Laboratorio Clínico Metropolitana Norte (LCMN) en el HUGTIP, centraliza y realiza la secuenciación de genoma completo de los cultivos positivos de TB, y actúan como colaboradores indispensables la Unidad de Genómica de la Tuberculosis (IBV-CSIC, Valencia), los laboratorios públicos y privados de Cataluña, los Servicios de Vigilancia Epidemiológica (SVE) de Cataluña y la *Agència de Salut Pública* de Barcelona¹.

Principales avances y retos encontrados

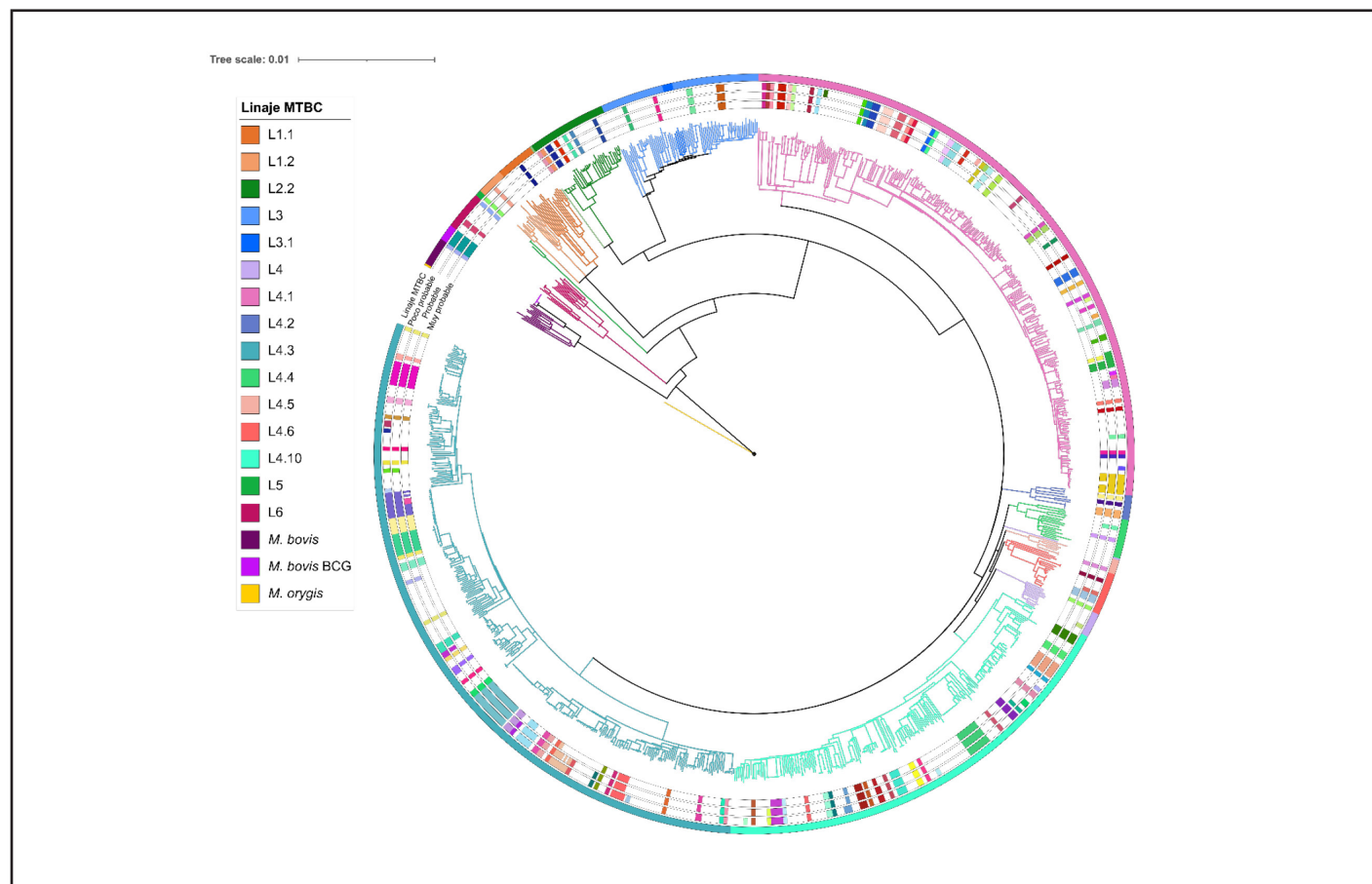
Hasta agosto de 2024 se han registrado un total de 1886 cultivos positivos de MTBC por parte de los 17 laboratorios que centralizan el envío de los cultivos al Servicio de Microbiología del HUGTIP, provenientes de los 43 laboratorios donde se han recibido las muestras clínicas. Uno de los principales retos ha sido poder vincular algunos de estos cultivos a los casos notificados en el *Registre Epidemiològic de Catalunya* (REC), por falta de información identificativa. En total, 420 casos se han eliminado por este y otros motivos (principalmente por caso duplicado). En total, se ha reportado al *Servei de Prevenció i Control de la TB* la

información generada por secuenciación de 1129 casos (Figura 1); de los casos de TB con cultivo positivo notificados en el REC durante 2023, se han secuenciado el 66,8%. Se está trabajando para poder secuenciar el máximo de cultivos positivos de Cataluña.

Un grupo de los casos que se secuencian corresponden a los solicitados activamente por los SVE en caso de brotes u otras situaciones epidemiológicas consideradas de interés. Se prioriza el procesamiento de estos cultivos para poder informar sobre su relación genómica, especialmente aquellas en que la relación entre las cepas es muy probable (0-5 SNPs de diferencia, transmisión reciente). Asimismo, para los clústeres de transmisión identificados que resultan de especial interés, se generan figuras de redes que muestran la direccionalidad de la transmisión, análisis que permite identificar qué casos tendrán, con mayor probabilidad, un vínculo epidemiológico entre ellos para facilitar la investigación del brote. Cuando el análisis está realizado se envían los resultados en forma de informe a los SVE que lo han solicitado; y se van actualizando periódicamente si se identifican nuevos casos involucrados.

Por otro lado, también se secuencian el resto de aislados de MTBC, aunque no exista sospecha de vínculo epidemiológico, para detectar posibles transmisiones que no se hayan detectado mediante la estrategia de estudio de contactos. Hasta ahora se han realizado cinco declaraciones de los clústeres genómicos identificados, y se ha diseñado un informe gráfico para poder identificar tendencias temporales en cuanto a número total de clústeres, porcentaje de casos en transmisión reciente, los linajes de MTBC circulantes, la caracterización de clústeres formados por casos de diferentes áreas, y la distribución espaciotemporal de los clústeres. Hasta la fecha, se han identificado 108 clústeres genómicos que incluyen un total de 346 casos con transmisión muy

Figura 1. Árbol filogenético de máxima verosimilitud de los casos secuenciados. Las ramas están coloreadas de acuerdo con el linaje de MTBC. Sobre cada anillo (de dentro hacia afuera) se representan coloreados los clústeres genómicos detectados a 0-5 SNPs de diferencia entre pares de casos (asociación epidemiológica muy probable), 6-10 SNPs (asociación probable), y 11-15 SNPs (asociación poco probable).



probable. Estos datos indican que el 30.9% de los casos agrupan en clústeres de transmisión reciente, evidenciando una transmisión comunitaria considerable en Cataluña. Al compararse estos datos con la información de los estudios de contactos realizados, únicamente para el 25,6% de los casos en clúster de transmisión muy probables se había detectado un vínculo epidemiológico².

Así mismo, se ha realizado un análisis conjunto de los casos secuenciados tanto en Cataluña como en la Comunidad Valenciana, identificándose 61 clústeres genómicos intercomunitarios que abarcan 359 casos (9% del total), basados en una distancia de 15 SNP (transmisión antigua) para tener en cuenta el amplio periodo de muestreo de 2014-2023. Sin embargo, 17 de los clústeres incluyen eventos de transmisión recientes³. Estos hallazgos subrayan el impacto significativo de la transmisión reciente entre CCAA y evidencian la necesidad de establecer una estrategia de vigilancia genómica a nivel nacional.

Desde sus inicios, se ha trabajado para agilizar los tiempos de respuesta desde la recogida de los cultivos en los laboratorios hasta la declaración de toda la información generada por secuen-

ciación, para que ésta pueda tener el máximo impacto. Si bien aún se está trabajando para agilizar los flujos de información, la estrategia TB-SEQ está demostrando el valor de la integración de la secuenciación de base poblacional en la vigilancia y control de la TB en Cataluña.

Bibliografía

1. Saludes V, Sicart-Torres E, Pequeño S, López MG, Bordoy AE, Ciruela P, et al. TB-SEQ: una nueva estrategia de epidemiología genómica para complementar el estudio de contactos de la tuberculosis en Cataluña. *Enf Emerg.* 2023;22(3):220-231.
2. Bordoy AE, Saludes V, icart-Torres E, Pequeño S, López GM, Gavalrà L, et al. Integrating genomic surveillance for tuberculosis control in Catalonia. 44th Annual Meeting of The European Society of Mycobacteriology, 2024.
3. López M, Saludes V, Sicart-Torres E, Gavalrà L, Bordoy A, Cano P, et al. *Cruzando fronteras: evidencia genómica de la transmisión intercomunitaria de la tuberculosis en España.* XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, SEIMC, 2024.

Innovaciones en epidemiología genómica: velocidad, precisión, análisis clínico e interterritorial

Darío García de Viedma

Hospital Gregorio Marañón. CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES). Madrid.

Correspondencia:

Darío García de Viedma

E-mail: dgvedma2@gmail.com

La introducción de la secuenciación de genoma completo para caracterizar con máxima precisión las cadenas de transmisión de la tuberculosis ha supuesto el inicio de una nueva era de epidemiología genómica en esta enfermedad. La mayor precisión aportada por estas estrategias genómicas es especialmente útil en escenarios socio-epidemiológicos de alta complejidad, en los que es obligado aplicar las aproximaciones analíticas más refinadas. Almería es un claro ejemplo de esta complejidad, con un 80% del total de casos de TB en 2023 correspondiendo a migrantes y con tasas de incidencia globales 4-5 veces por encima de los valores medios nacionales.

En esta población, llevamos más de dos décadas aplicando soluciones de vigilancia innovadoras, que descansan en el trabajo integrado de microbiólogos y epidemiólogos, persiguiendo un constante refinamiento en las estrategias aplicadas, tanto para el análisis de las cepas de *M. tuberculosis* como el de los individuos enfermos y de sus entornos.

Tras una primera etapa en la que se ha logrado ajustar la integración del análisis genómico con el estudio epidemiológico exhaustivo, estamos comenzando una segunda etapa, caracterizada por una explotación más detallada de los datos genómicos y por la reducción de los tiempos de respuesta; todo ello con el objetivo de aproximar al máximo la caracterización precisa de los casos en clúster al momento de su diagnóstico, para garantizar el máximo impacto en las intervenciones de control, diseñadas en función de la naturaleza de cada clúster.

En este sentido, tras un primer análisis cuantitativo de los SNP diferenciales entre las cepas, que nos permite identificar los casos que están en clúster¹, hemos pasado a un segundo nivel de análisis genómico más cualitativo/evolutivo, atendiendo a la distribución de esos SNP entre los casos de cada clúster. De este modo, podemos diferenciar entre casos:

- Implicados en una transmisión activa reciente entre ellos (conectados a 0-2 SNP con otros casos diagnosticados recientemente; Figura 1A).
- Supertransmisores, que han generado un elevado número de casos secundarios.
- Que han debido de participar en la cadena de transmisión pero que no han sido aún diagnosticados.

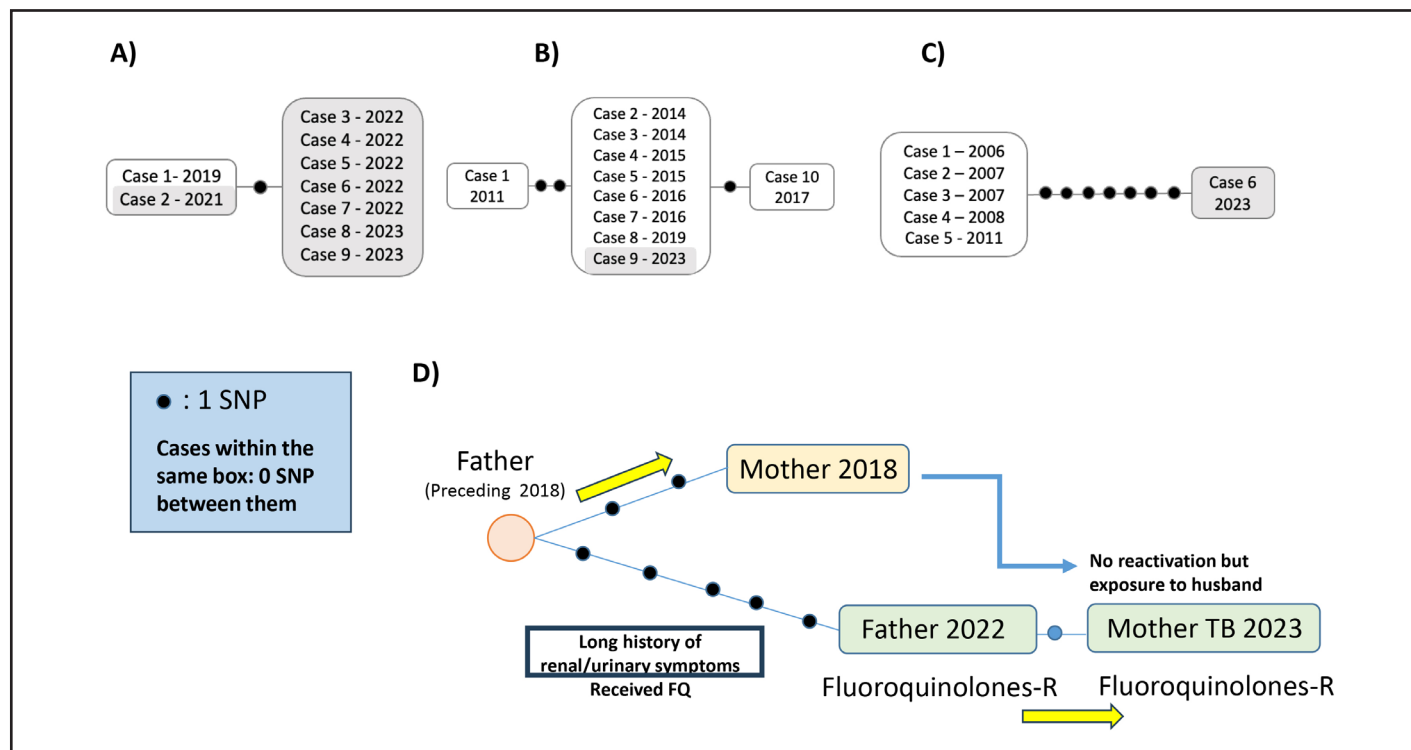
- Que corresponden más probablemente a reactivaciones de exposiciones en el pasado (conectados con casos diagnosticados hace varios años; Figura 1B) que a transmisiones recientes.
- Con demoras diagnósticas prolongadas (en ramas con un número elevado de SNP con respecto al caso previo; Figura 1C). Estos estudios, asimismo, nos han permitido documentar el impacto de la pandemia de COVID-19 sobre la transmisión de la TB, así como reinterpretar clústeres inicialmente considerados como microepidemias familiares, que escondían realmente una mayor complejidad (Figura 1D).

Este nuevo análisis refinado de las relaciones genómicas entre los casos de un clúster debe de ser complementado con los datos clínicos de los pacientes, para finalmente corroborar aquellos casos que, a partir de la interpretación genómica probablemente corresponden a TB primaria o posprimaria, así como a demoras diagnósticas/cuadros subclínicos. La participación de los neumólogos o infectólogos que manejan a los pacientes supone el último avance en la discusión interdisciplinar abordada en nuestros estudios en Almería.

En nuestra persecución constante de los tiempos de respuesta más rápidos, estamos comenzando a generar estos análisis genómicos mediante los nuevos sistemas de secuenciación en nanoporos, más rápidos y flexibles, que nos permiten acelerar al máximo la identificación y caracterización de los casos en clúster, trabajando sobre los cultivos primarios², sin necesidad de esperar a subcultivos, e incluso abordando la secuenciación directa sobre muestra respiratoria.

Una vez que hemos logrado optimizar al máximo los diferentes aspectos analíticos en los que descansa el trabajo en epidemiología genómica, nos disponemos a abordar una mejora estratégica de gran calado: la integración de los resultados genómicos de casos de TB obtenidos en las poblaciones de nuestro territorio que cuentan con estudios con base poblacional (Cataluña, C. Valenciana, Aragón, Madrid, Sevilla y Almería). De este modo, podremos abordar el análisis de un aspecto de la epidemiología genómica de la TB que hasta ahora era inaccesible, la transmisión interterritorial, elemento clave en nuestro

Figura 1.



escenario de estudio, con una proporción elevada de población migrante, con una alta movilidad.

La sinergia entre microbiólogos de diferentes CCAA asegurando un análisis genómico refinado, rápido e integrado, epidemiólogos apoyados en agentes comunitarios en salud, que reorientan de modo eficaz sus estrategias de control guiados por los hallazgos genómicos, constituye un modelo innovador de trabajo que nos permite optimizar el impacto de los recursos de control de la tuberculosis en poblaciones complejas, así como extender la vigilancia de la transmisión más allá de cada población o territorio.

Bibliografía

- Abascal E, Pérez-Lago L, Martínez-Lirola M, Chiner-Oms Á, Herranz M, Chaoui I, *et al.* Whole genome sequencing-based analysis of tuberculosis (TB) in migrants: rapid tools for cross-border surveillance and to distinguish between recent transmission in the host country and new importations. *Euro Surveill.* 2019;24(4):1800005.
- Sanz-Pérez A, Rodríguez-Grande C, Buenestado-Serrano S, Martínez-Lirola MJ, Plata-Barril B, Herranz-Martín M, *et al.* Reducing delays in the genomic epidemiology of tuberculosis: a flexible and decentralized analysis of each incident case. *Journal of Infection and Public Health* 2024;10.21203/rs.3.rs-4729960/v1.

Understanding the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* for the treatment and control of TB

Mariana Gabriela López¹, Iñaki Comas^{1,2}

¹Instituto de Biomedicina de València. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. València. ²CIBER en Epidemiología y Salud Pública. Grupo en Biomedicina. Instituto de Biomedicina de Valencia IBV-CSIC. Valencia.

Correspondence:

Iñaki Comas

E-mail: icomas@ibv.csic.es

Genome sequencing technologies are slowly making their way into tuberculosis (TB) clinical settings, although they have already had a significant impact on biomedical research (Comas, 2023). In this review, I will primarily focus on the role of *Mycobacterium tuberculosis* genomics in public health and how we can improve TB control by understanding the evolution and epidemiology of the pathogen. I will provide examples of how we use genome sequence data for drug resistance control in different countries, along with relevant public health lessons.

The use of genomes as a diagnostic tool for drug resistance has been gradually gaining momentum over recent years, primarily for two reasons. First, genome sequencing is becoming increasingly affordable. As a result, it can now be used to characterize the bacteria infecting individual patients. Second, we have access to catalogs of drug resistance mutations that allow us to identify whether a genome harbors any mutations associated with drug resistance. These catalogs are based on large collections of strains with corresponding genome sequence and phenotypic data to assess drug resistance. The most commonly used catalog has been developed by the Foundation for Innovative Diagnostics (FIND) on behalf of the World Health Organization (WHO) (WHO 2023). The first version of the catalog already demonstrated high sensitivity and specificity for major first-line drugs such as rifampicin and isoniazid. However, it was much more limited in its coverage of novel and repurposed drugs, which are increasingly being used for MDR-TB treatment. To address this, a second version was created, based on genomic and phenotypic data from more than 50,000 strains. This strain set included resistant strains for drugs like bedaquiline, linezolid, and delamanid. As a result, the sensitivity of the catalog notably increased for novel and repurposed drugs, particularly bedaquiline (Figure 1). A total of 196 mutations associated with resistance for 13 drugs across 47 genomic regions have already been identified in the catalog, with another 1,004 likely associated. New versions are currently in development, but the catalog is already being widely used in various settings in the following ways:

- For drug resistance diagnosis when genome sequence data is derived from positive cultures.
- For surveillance of drug resistance and monitoring of first-line diagnostic tests.
- For understanding the evolution of drug resistance. I will now present three different TB settings where the application of the catalog and genome sequencing has contributed to local TB control in different ways.

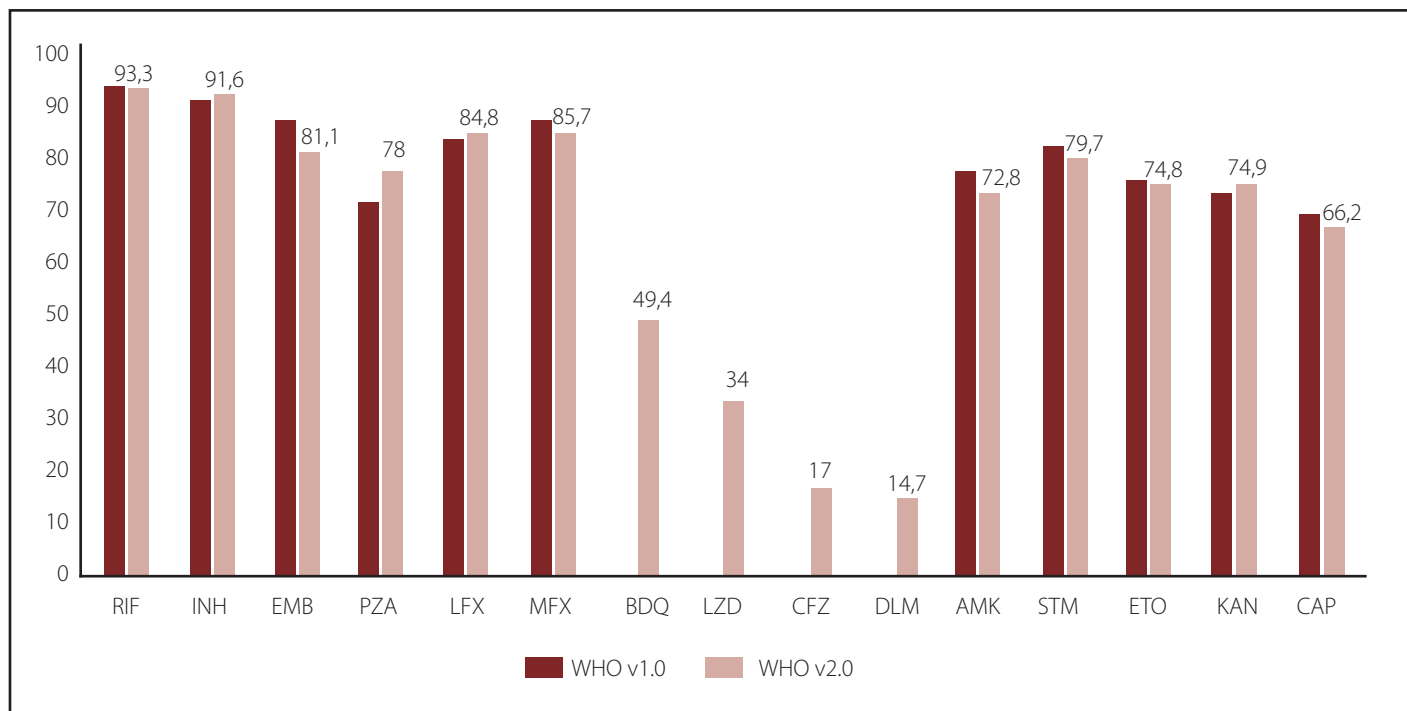
Scenario 1: Improving drug resistance diagnosis in a low TB resistance burden setting

Since 2014, we have been collecting around 70% of the isolates from culture-positive cases in the Comunitat Valenciana.

This gave us a unique opportunity to assess what difference the catalog could have made over the years in the diagnosis of patients. We compared the phenotypic profiles from the hospitals (mainly for first-line drugs) with the genomic predictions from the first version of the WHO catalog. We found a high correlation, with more than 98% accuracy in predicting pan-susceptibility. This indicates that the catalog, when combined with genome data, is an accurate test in low-burden settings. However, some discrepancies between the catalog and phenotypic tests remained, which we were mostly able to resolve. For instance, several mutations to rifampicin and isoniazid are borderline and tend to produce false negatives in the BACTEC system. A few cases with phenotypic resistance remained unexplained which can be due to laboratory errors or because there are still some genes and mutations linked to drug resistance that we have not uncovered. Genome sequences however have the virtue that can be reinterrogated as more evidence and new catalogues are generated. Finally, because the genome provides comprehensive information, we identified resistances not initially screened by phenotypic tests. For example, we found nine cases of mono-resistance to fluoroquinolones. Overall, our results demonstrate the strong performance of the catalog, often complementing culture susceptibility testing and, in some cases, enabling better identification of resistance profiles (García-Marín, 2024).

Scenario 2: Monitoring first-line diagnostics for drug resistance

Worldwide, the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* is commonly performed using molecular-based tests. The most widespread is Xpert/Ultra, which has very high sensitivity for *Mycobacterium tuberculosis* DNA detection and can also identify rifampicin resistance. However, the panel of resistance mutations targeted by Xpert/Ultra is far from complete, raising concerns that some rifampicin resistance may be missed. Additionally, isoniazid resistance is not part of the test. In many parts of the world, including Mozambique, Xpert/Ultra is used as a frontline diagnostic tool, and only those positive for rifampicin resistance undergo more comprehensive phenotypic testing. Recently, we evaluated the performance of Xpert/Ultra by comparing the genome data from culture-positive cases with drug resistance results from Xpert/Ultra. We discovered strains circulating with mutations conferring rifampicin resistance that were not detected by Xpert/Ultra. Furthermore, we found an increasing prevalence of isoniazid mono-resistance that was also undetected by Xpert/Ultra. We also showed that both drug-susceptible and drug-resistant strains are clustering within Mozambique and with strains from neighboring countries. While Xpert/Ultra is a significant advancement in *Mycobacterium tuberculosis* diagnostics, we demonstrate its limitations for drug resistance identification, which may impact individual treatment plans and drug resistance prevalence studies (Mariner-Llícer 2024).

Figure 1. Sensitivity values of the WHO catalogue of mutations version 1 and version 2 for 13 different drugs.

Scenario 3: Emergence of drug resistance in a MDR-TB setting

Most of our understanding of drug resistance is currently based on isolates from sputum or other diagnostic samples. However, these samples may not reflect the complexity of infection within a host. To explore this complexity, we had access to lung resections from surgery patients. Importantly, we were able to analyze multiple isolates from the surgery, including samples from the cavity center, internal and external wall of the cavity, surrounding tissue, and the corresponding sputum sample. When analyzed together in a phylogeny, we found that the samples from the same patient did not always cluster together. Further analysis confirmed that in some cases, the genotype of the bacteria in the sputum differed from that in the lung, indicating polyclonal infections. In several instances, two genotypes coexisted in the same patient (co-infection), while in others, we suspected superinfections from two consecutive transmission events. Two key lessons emerged from this study. First, the coexistence of two different genotypes could not be detected from sputum samples alone, meaning that sputum-based analyses underestimate the true burden of polyclonal infections in Georgia. Second, in many cases, the two genotypes infecting a patient had different drug resistance profiles, highlighting the risks polyclonal infections pose to individualized treatment (Moreno-Molina, 2021).

All these examples together with others shows that genomics is not anymore, a promising tool. The studies show that is

already making a difference in TB control at the individual and population level.

Recommended bibliography

- Cancino-Muñoz I, López MG, Torres-Puente M, Villamayor LM, Borrás R, Borrás-Máñez M, *et al.* Population-based sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals how current population dynamics are shaped by past epidemics. *Elife*. 2022;11:e76605.
- Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance, second edition. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Comas I, López MG, Chiner-Oms Á, Farhat MR, Semuto Ngabonziza JC, Campos J, *et al.* Genomic approaches to tuberculosis management and control. pp. 178–190. En: Alberto L. García-Basteiro, Füsün Öner Eyüboğlu, Molebogeng X. Rangaka. *The Challenge of Tuberculosis in the 21st Century*. *European Respiratory Society*, 2023.
- García-Marín AM, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, Villamayor LM, Borrás R, Borrás-Máñez M, *et al.* Role of the first WHO mutation catalogue in the diagnosis of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in the Valencia Region, Spain: a retrospective genomic analysis. *Lancet Microbe*. 2024;5(1):e43–e51.
- Mariner-Llicer C, Saavedra Cervera B, Mambuque E, Gomes N, Mungambe S, Villamayor L, *et al.* Monitoring of First-line Drug Resistance Mutations Outside the Scope of Xpert MTB/RIF Ultra is Needed for Successful Control of DR-TB in Southern Mozambique. *Clin Infect Dis*. 2024;78(4):842–845.
- Moreno-Molina M, Shublazde N, Khurtsilava I, Avaliani Z, Bablshvili N, Torres-Puente M, *et al.* Genomic analyses of *Mycobacterium tuberculosis* from human lung resections reveal a high frequency of polyclonal infections. *Nat Commun*. 2021;12(1):2716.