

## MESA: Estudio de contactos II

**Moderadores:** **Miguel Santín.** Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat.  
**Pere J. Cardona.** Servicio de Microbiología. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona.

### ¿Qué se espera en el estudio convencional de contactos de los estudios de genómica? [Qu'y a-t-il derrière les coulisses ?]

**Juan B. Bellido-Blasco<sup>1</sup>, Mariana G. López<sup>2</sup>, Aurora Blasco-Mollá<sup>1</sup>, Juan Carlos Gascó-Laborda<sup>1</sup>, Sergio P. Viciado-Mata<sup>1-3</sup>, Oscar Pérez-Olaso<sup>1</sup>, Gabriela D. Deaconescu<sup>1</sup>, Iñaki Comas<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Grupo Interdepartamental de Tuberculosis, Castellón. Unidad acreditada por SEPAR (Dra. Margarita Marín). <sup>2</sup>Unidad de Genómica de la Tuberculosis, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC). <sup>3</sup>Unidad de Medicina Preventiva y Salud Pública. Hospital Clínic Universitari de Valencia..

#### Correspondencia:

Juan Bellido

E-mail: bellido\_jua@gva.es

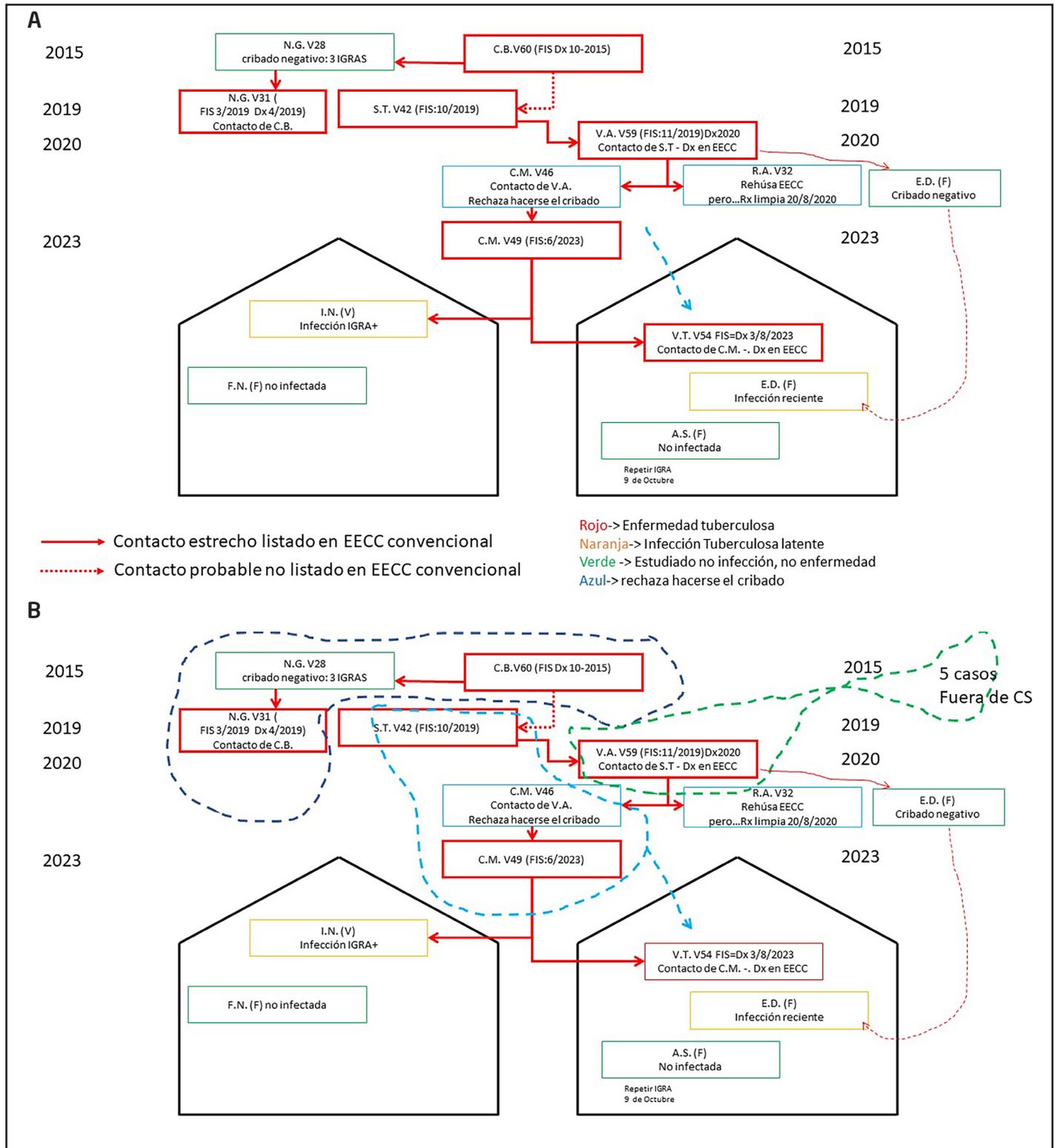
Cuando se nos propuso participar en estas Jornadas de tuberculosis (TB), todavía estábamos recuperándonos tras el impacto que la pandemia que la COVID-19 había ocasionado a los servicios de Epidemiología, Microbiología Clínica y Genómica (SeqCovid), entre otros. Ahora bien, ello no significaba que no hubiera nada que aportar en este momento, en noviembre de 2023, que será cuando lean esto. La tuberculosis sigue ahí. Y aquí estamos, de nuevo, enfrentándonos a los problemas que sólo estaban parcial y pasajeramente arrumbados. En este texto intentaremos resumir algunas ideas y propuestas entresacadas de la experiencia acumulada durante la colaboración del Grupo Interdepartamental de Tuberculosis de Castellón con la Unidad de Genómica de la Tuberculosis y el Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC). No abordaremos aquí el análisis formal y numérico de los resultados combinados de epidemiología y genómica en tuberculosis, como pudieran ser la comparación de los casos aislados vs los de pertenecientes a cadenas de transmisión, la cuantificación de la transmisión reciente, la concordancia entre brotes detectados con y sin genómica, la sensibilidad del Sistema de Vigilancia Epidemiológico clásico para detección de clústers, etc.

Mirando atrás, en el año 2018, expusimos en este mismo foro (XXII Jornadas de la fUITB) tres ejemplos de estudio de contactos (EECC) mediante epidemiología genómica y epidemiología convencional<sup>1</sup>. Dos años después, en 2020, expusimos otro brote complejo en el que pudimos vincular los casos de Castellón con

una paciente diagnosticada en Pontevedra (a más de 1.000 km de Castellón), gracias a la secuenciación completa y, hay que decirlo, a la colaboración también del Dr. Luís Aníbarro, neumólogo de la ciudad gallega. Al mismo tiempo, hemos seguido atentamente el trabajo de otros grupos con experiencia en EECC que incorporan la genómica en su práctica, con especial atención a población inmigrante en nuestro país<sup>3</sup>. En este camino, se ha propuesto la denominación de EECC "refinados" cuando se acopla la genómica a los EECC (véase el editorial en este mismo número de la revista).

Los EECC convencionales se plantean según la estrategia de "círculos". Además, podemos diferenciar los EECC descendentes o ascendentes (o combinados), según la sea la finalidad de la búsqueda de infectados o casos, respectivamente. Así, somos capaces de describir y analizar un escenario mediante las técnicas clásicas de entrevista e interpretación de información clínica y epidemiológica. Ese escenario -simple o complejo- es eso: lo que se ve. Pero, especialmente por las características de la infección tuberculosa, puede que haya algo más. Suele haberlo. La genómica nos ayuda a desvelar qué hay más allá de esa escena visible, entre bastidores, *derrière les coulisses*. Con esa información podemos confirmar brotes sospechados; podemos identificar cadenas de transmisión que no veíamos y re-encuestar casos; podemos buscar contactos allá donde los debería haber, eslabones perdidos; podemos también descartar casos aparentemente asociados. Esto es algo que aporta la genómica a la epidemiología de campo. Ahora bien, para que todo ello tenga

Figura 1. Esquema de un caso a estudio, todavía en investigación. Posible cadena de transmisión trazada en (A) mediante el EECC convencional, y en (B) tras los resultados aportados por la genómica, con tres clústers identificados (áreas delimitadas por líneas discontinuas). Contexto: población inmigrante y pobre, residente en asentamientos de una zona periurbana semiabandonada por razones urbanísticas. Cada paciente en un recuadro con color; entre paréntesis fecha de inicio de síntomas (FIS) o diagnóstico (Dx). EECC, estudio de contactos. [Esquema elaborado por Sergio P. Viciedo, residente de Medicina Preventiva del Hospital Clínico Universitario de Valencia- Sección de Epidemiología CSP Castellón].



aplicación práctica en los EECC convencionales y se incorpore en los programas de control de TB, ¿qué sería deseable? He aquí algunos aspectos a considerar:

- Trabajo en estrecha colaboración MGE: Microbiología-Genómica-Epidemiología (y social, ver último párrafo). Información compartida en sentido bi-direccional.
- Resultados compartidos... en tiempo suficiente para usar esa información durante el trabajo en epidemiología de campo: revisión de casos, ampliación de cadenas, explicación de la transmisión y toma de decisiones en consecuencia.
- Tener en cuenta el área geográfica-administrativa que cubre la investigación epidemiológica y genómica (cadenas de transmisión que alcanzan otras circunscripciones, casos "aislados" que, sencillamente, están en otras áreas).
- Mejora de los indicadores de evaluación de los programas de control de la tuberculosis si se acoplan los estudios de genómica (número de casos detectados en EECC, número de contactos por caso, etcétera).

En la Figura 1 se muestra un ejemplo -todavía en investigación- de una posible cadena de transmisión en población inmigrante y de bajo nivel económico, residentes en varios asentamientos de una zona periurbana. Trazada mediante un minucioso EECC convencional, y tras los resultados de la genómica disponibles.

Finalmente, hay un aspecto de primer orden que no lo puede resolver la colaboración MGE, citada en el paréntesis del primer punto. Es el relativo a los factores socio-económicos y culturales que, a distinta escala, determinan las circunstancias de la vida y posibilidades de las personas afectadas por la TB<sup>4,5</sup>. En su escala

más cercana, por ejemplo, es imprescindible el trabajo de los agentes comunitario de salud<sup>5</sup> y las ONG en la detección de casos, estudio de contactos y su seguimiento.

## Bibliografía

1. Comas I, Cancino-Muñoz I, Romeu-García MA, Arnedo-Pena A, Bellido-Blasco JB. Complementariedad entre la epidemiología genómica y la epidemiología convencional: ejemplos de su aplicación práctica en Castellón. *Rev Enf Emerg* 2018;17(3):142-6 [http://www.enfermedadesemergentes.com/revistas/enf\\_emergentes\\_3-2018.pdf](http://www.enfermedadesemergentes.com/revistas/enf_emergentes_3-2018.pdf)
2. Gascó-Labordá JC, Bellido-Blasco JB, Comas I. Investigación epidemiológica y genómica de brotes complejos en TB y COVID-19. Mesa: Brotes complicados. Importancia de los cribados XXIV Jornadas Internacionales sobre Tuberculosis FUITB-2020, Barcelona 16-17 noviembre 2020. Disponible en <https://www.youtube.com/watch?v=JwLyD2ev34w&list=PLeS9CW0lwD-DNSiGIVD-SaAedLoQ5xXgD&index=7> [consultado el 12-10-2023]
3. Martínez-Lirola M, Alonso-Rodríguez N, Sánchez ML, Herranz M, Andrés S, Peñafiel T, *et al*. Advanced survey of tuberculosis transmission in a complex socioepidemiologic scenario with a high proportion of cases in immigrants. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2008 Jul 1 [cited 2023 May 13];47(1):8-14. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article/47/1/8/377506>
4. López MG, Campos-Herrero MI, Torres-Puente M, Cañas F, Comín J, Copado R, *et al*. Deciphering the Tangible Spatio-Temporal Spread of a 25-Year Tuberculosis Outbreak Boosted by Social Determinants. *Microbiol Spectr*. 2023 Feb 14;11(2):e0282622. doi: 10.1128/spectrum.02826-22. Epub ahead of print. PMID: 36786614; PMCID: PMC10100973. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10100973/pdf/spectrum.02826-22.pdf>
5. Ospina JE, Orcau A, Millet JP, Sánchez F, Casals M, Caylà JA. Community health workers improve contact tracing among immigrants with tuberculosis in Barcelona. *BMC Public Health*. 2012 Mar 6;12:158. doi: 10.1186/1471-2458-12-158. PMID: 22394990; PMCID: PMC3312853. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22394990/>

## Contribución de la secuenciación masiva en la investigación de brotes de tuberculosis animal

Bernat Pérez de Val<sup>1,2</sup>, Carles Riera<sup>3</sup>, Albert Sanz<sup>3</sup>, Jose Luís Sáez<sup>4</sup>, Enric Vidal<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unitat mixta d'Investigació IRTA-UAB en Sanitat Animal. Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Bellaterra. Barcelona. <sup>2</sup>IRTA. Programa de Sanitat Animal. CRESA. Campus de la UAB. Bellaterra. Barcelona. <sup>3</sup>Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural (DAC) de la Generalitat de Catalunya. Barcelona. <sup>4</sup>Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). Madrid.

Correspondencia:

Bernat Pérez de Val

E-mail: [bernat.perez@irta.cat](mailto:bernat.perez@irta.cat)

La tuberculosis (TB), causada por las bacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), es una enfermedad multi-

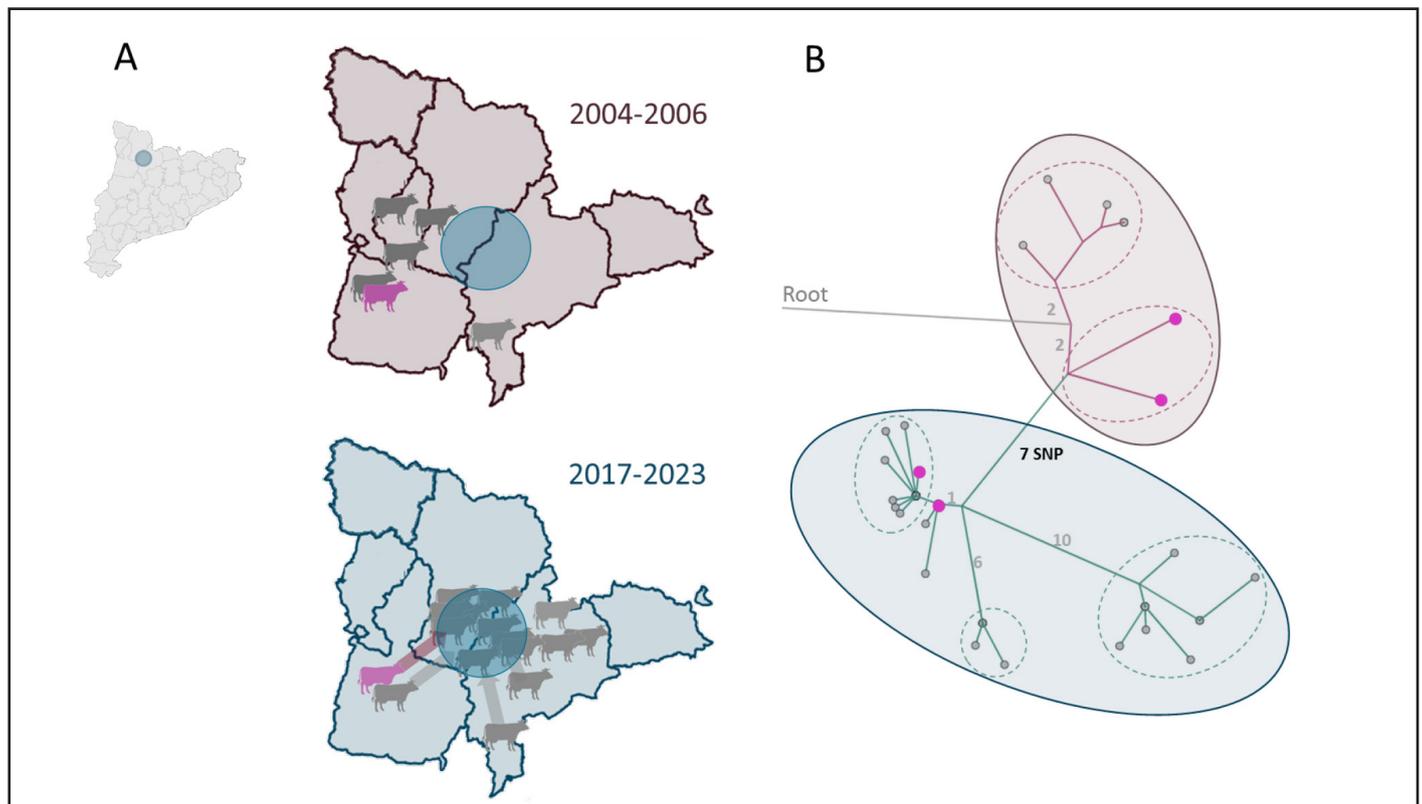
hospedador que puede afectar al ser humano y a un amplio abanico de animales domésticos y silvestres.

Las plataformas de secuenciación de nueva generación y, en particular, la secuenciación del genoma completo (SGC), han revolucionado nuestra capacidad para comprender la epidemiología molecular del CMTB. La SGC permite inferir relaciones epidemiológicas entre casos de TB a través del análisis filogenético de las cepas aisladas, rastrear las cadenas de transmisión que han tenido lugar en un brote y comprender mejor su origen<sup>1</sup> e incluso investigar los patrones de transmisión entre diferentes especies<sup>2</sup>. También nos permite estudiar la diversidad genética de los aislados del CMTB y hasta identificar mutaciones asociadas a resistencia a antimicrobianos<sup>3</sup>. Asimismo, integrando el análisis epidemiológico espacial y temporal con los datos de la SGC, podemos mapear y estudiar la relación entre diferentes brotes de TB que transcurren en una misma ventana temporal. La SGC puede incluso determinar si un nuevo brote tiene carácter reemergente, es decir, si se trata de una infección residual de un brote anterior<sup>4</sup>. Finalmente, en un enfoque de “una sola salud”, la SGC nos permite estudiar las relaciones entre cepas aisladas en animales y pacientes humanos con TB e identificar casos de TB zoonótica<sup>5</sup>.

## Aplicación de la SGC en el seguimiento de brotes de TB: un caso práctico

En 2017 se detectó un brote de TB por *M. bovis* en cuatro explotaciones bovinas que aprovechaban unos pastos comunales del Pirineo de Lleida. Posteriormente, el brote se extendió a 6 explotaciones más de los valles colindantes y también se aisló el mismo espigotipo (SB1337) en jabalíes y ciervos de la misma área. Tras un intenso periodo de pruebas de diagnóstico y sacrificio de animales positivos, en 2018 todas las explotaciones recuperaron la calificación sanitaria de oficialmente libres de TB. Sin embargo, en 2021 volvió a reemerger un nuevo brote de *M. bovis* SB1337 en el área, afectando a ocho nuevas explotaciones entre 2021-2023. La SGC y el posterior análisis filogenético permitió determinar que, con muy alta probabilidad, el brote se originó en los pastos comunales donde se habrían producido múltiples eventos de transmisión y excreción de micobacterias al medio, infectando jabalíes de esa área de pastos y generando la aparición de diferentes subgrupos filogenéticos. A partir de aquí, tal y como sugieren los datos filogenéticos, geoespaciales

**Figura 1. (A) Localización de los brotes de TB bovina por *M. bovis* en 2004-06 y 2017-23 en el Pirineo de Lleida. El círculo azul indica el foco en pastos comunales en 2017. Las siluetas indican explotaciones bovinas afectadas. La silueta rosada representa el rebaño implicado en ambos brotes. Las flechas indican movimiento a pastos comunales. (B) Árbol filogenético radial de los aislados de *M. bovis* en los brotes de 2004-06 (morado) y 2017-23 (azul). Los puntos rosados indican los aislados de la explotación implicada en ambos. SNP: Single Nucleotide Polymorphisms.**



y temporales, las explotaciones se habrían ido infectado, o bien a través del contacto directo entre rebaños o, en algunos casos, por contacto indirecto con jabalíes infectados que se habrían desplazado a los valles colindantes. Además, en uno de los valles afectados también se produjo la infección de algunos ciervos, probablemente también a través de jabalíes infectados. Estos resultados indican que se ha establecido una comunidad de mantenimiento de TB en esta área del Pirineo, compuesta por bovinos y jabalíes, y que el mantenimiento de la circulación de *M. bovis* en las poblaciones de estos últimos podría explicar la reemergencia del brote en 2021. Finalmente, se incluyeron en el análisis cepas de un brote anterior de *M. bovis* SB1337 ocurrido entre 2004-2006 en 6 explotaciones de bovino en el Pirineo de Lleida. Se observó que los aislados de una explotación de ese brote anterior mantenían una relación muy estrecha con los aislados recientes de esa misma explotación, también implicada en el brote de 2017 (ancestro común separado solamente por 7 substituciones de nucleótido único en once años de diferencia), sugiriendo que esta explotación podría ser el origen del brote re-emergente en 2017 (Figura 1), tratándose de un probable caso de infección residual no diagnosticada durante más de una década.

Este caso ilustra como el uso combinado de la epidemiología espaciotemporal y la SGC supone un salto cualitativo en el seguimiento de los brotes de CMTB y ya está contribuyendo de manera decisiva a la toma de decisiones para mejorar la vigilancia, el control y la prevención de la TB en animales.

## Bibliografía

1. Price-Carter M, *et al.* Whole genome sequencing for determining the source of Mycobacterium bovis infections in livestock herds and wildlife in New Zealand. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018;5:272.
2. Ciaravino G, *et al.* Phylogenetic relationships investigation of Mycobacterium caprae strains from sympatric wild boar and goats based on whole genome sequencing. *Transboundary and Emerging Diseases* 2021;68:1476–86.
3. Perea C, *et al.* Whole-Genome SNP Analysis Identifies Putative Mycobacterium bovis Transmission Clusters in Livestock and Wildlife in Catalonia, Spain. *Microorganisms*. 2021;(9);1629.
4. Trewby H, *et al.* Use of bacterial whole-genome sequencing to investigate local persistence and spread in bovine tuberculosis. *Epidemics* 2016;14:26–35.
5. Pérez de Val B, *et al.* Polyresistant Mycobacterium bovis Infection in Human and Sympatric Sheep, Spain, 2017–2018. *Emerging Infectious Diseases*. 2021;27(4):1241–2.

## Brote de tuberculosis en una escuela de primaria de Barcelona

Raquel Prieto García<sup>1,2,3</sup>, Joan Pau Millet<sup>1,3,4</sup>, Claudia Broto<sup>5</sup>, Elisa Lara<sup>5</sup>, Maria Espiau<sup>5,6</sup>, Antoni Soriano-Arandes<sup>5,6</sup>, Malú de Souza<sup>5</sup>, M<sup>a</sup> Angeles Jiménez<sup>5</sup>, Cristina Domingo<sup>1,3</sup>, Pere Simón<sup>1,3,4</sup>, Cristina Rius<sup>1,2,3,4</sup>

<sup>1</sup>Servei d'Epidemiologia (SEPID). Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB). Barcelona. <sup>2</sup>Departament de Ciències Experimentals i de la Salut (DCEXS). Universitat Pompeu Fabra. Barcelona. <sup>3</sup>Institut de Recerca Sant Pau (IIB Sant Pau). Barcelona. <sup>4</sup>CIBER de Epidemiologia y Salud Pública (CIBERESP). Barcelona. <sup>5</sup>Centre de Salut Internacional i Malalties Transmissibles Drassanes - Vall d'Hebron. Institut Català de la Salut. Barcelona. <sup>6</sup>Unitat de Patologia Infecciosa i Immunodeficiències de Pediatria. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

Correspondencia:  
Raquel Prieto  
E-mail: rprieto@aspb.cat

## Introducción

La tuberculosis (TB) continúa siendo un problema de salud pública de primera magnitud a nivel mundial<sup>1</sup>. En la ciudad de Barcelona en el año 2022 la incidencia fue de 16,2 casos por 100.000 habitantes, esta cifra supone un incremento del 11% con respecto al inicio de la COVID-19<sup>2</sup>. La estrategia End TB de

la OMS tiene como objetivos reducir la incidencia en un 80% y la mortalidad en un 90% para el 2030<sup>3</sup> algo a lo que no se llegará de seguir el lento ritmo de descenso. Uno de los pilares fundamentales para la consecución de estos objetivos es la realización de estudios de contactos de TB de manera sistemática para la detección de la enfermedad e infección tuberculosa latente (ITL)

en los países de alta y media renta<sup>4</sup>. Los contactos de personas con afectación pulmonar tienen un riesgo elevado de contraer TB o ITL. En Barcelona la investigación de los contactos se lleva a cabo de manera rutinaria y ante la notificación de un caso de TB se activa el circuito de inicio del estudio de contactos desde el Servicio de Epidemiología de la Agencia de Salud Pública de Barcelona (ASPB). El objetivo es mostrar cómo se desarrolló la investigación de un brote de TB en una escuela de primaria de Barcelona y mostrar las acciones llevadas a cabo para conocer la fuente de infección e interrumpir la cadena de transmisión y prevenir casos futuros de la enfermedad.

## Material y método

En junio de 2022 fue notificado a la ASPB un caso de TB pulmonar no bacilífera sin aislamiento del bacilo en el cultivo y con radiografía de tórax anormal no cavitada en una niña de una escuela de primaria de Barcelona. Desde l'ASPB se inició el estudio de contactos en setiembre del 2022. El estudio de contactos incluyó, además de la búsqueda de los contactos estrechos mediante el sistema de círculos concéntricos, la evaluación de los contactos y el tratamiento de la ITL y la TB. Un total de 31 personas, entre infantes, personal docente y personal de soporte, fue estudiado mediante la realización de la prueba de la tuberculina (PT) con 1 UI de tuberculina PPD RT23. La evaluación y el seguimiento de los contactos con PT positiva se realizó en la Unidad de Tuberculosis de Drassanes-Vall d'Hebron. En la primera visita realizada a la escuela se hizo una visita del edificio y se preguntó a la dirección del centro por la distribución de las clases y los espacios de comida y otras actividades.

Posteriormente, debido al elevado porcentaje de positividad de la PT encontrado en la clase del caso índice de TB, se amplió el estudio de contactos a todos los infantes de la escuela, personal docente y de soporte y personal que durante el curso 2021-2022 hubiera tenido algún tipo de relación con el centro. En ese momento, fue identificado un segundo caso de TB en otra niña que había iniciado síntomas en mayo de 2022 y que constituía a priori el caso primario. También se estudiaron todos los núcleos de convivencia de los infantes con diagnóstico de TB e ITL y se solicitó a la escuela el listado de las personas que habían tenido alguna visita o relación con el centro durante el curso 2020-2021.

La familia del caso primario fue nuevamente entrevistada para buscar posibles exposiciones que no hubieran sido con anterioridad valoradas.

Finalmente, se realizó solicitó la realización del análisis de la secuenciación genómica al servicio de Microbiología del Hospital Universitari Germans Trias i Pujol con el objetivo de identificar el caso fuente.

## Resultados

En el primer estudio de contactos realizado al grupo clase la PT fue positiva en un 37,5% (infantes y personal docente). Nueve de estas personas fueron diagnosticados de ITL y una niña de TB.

El segundo estudio de contactos se realizó a mediados del mes de octubre del 2022. Se convocó a toda la escuela, tanto alumnado como personal docente y de soporte. Se contactó y convocó también a los alumnos que durante el curso 2021-2022 realizaban sexto de primaria en la escuela. El resultado fue 28 ITL y tres casos de TB. También se contactó y convocó a todas aquellas personas que durante el curso 2021-2022 habían tenido alguna relación con el centro.

No se identificó ninguna persona adulta con TB ni en el ámbito domiciliario ni entre todas las personas adultas que hubieran tenido alguna relación con el centro durante el curso 2022-2021.

El resultado de la secuenciación genómica aportó un caso diagnosticado de TB en la provincia de Tarragona cuya cepa era idéntica (0-5 SNPs) al caso primario, pero sin vínculo epidemiológico conocido entre ambos casos. Posteriormente, se está realizando la secuenciación genómica de los casos de TB diagnosticados en los ámbitos identificados por la familia en el año 2021 y 2022 y en las cercanías del distrito de la escuela. La investigación está todavía en este momento sin concluir.

## Conclusiones

Es fundamental la realización de los estudios de contactos en búsqueda de casos fuente y como estrategia para interrumpir la cadena de transmisión de la TB e ITL.

En el planteamiento de los estudios de contactos es muy importante valorar no solamente el tiempo del contacto sino también considerar el espacio donde ha tenido lugar este contacto. Las características arquitectónicas de la escuela en cuanto a las pequeñas dimensiones de las aulas y de los espacios compartidos podrían hacer pensar en una transmisión comunitaria a nivel escolar.

En este estudio no ha sido posible, de momento, identificar el caso fuente y es necesario continuar y extender a la práctica diaria de vigilancia epidemiológica y estudio de brotes, los estudios de secuenciación genómica puesto que constituyen una pieza fundamental para complementar la investigación desde vigilancia epidemiológica.

## Bibliografía

1. WHO. Global Tuberculosis report 2022 [Internet]. [Cited 2023 Oct 6]. Available from: <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2022>

2. La salut a Barcelona 2022. Barcelona: Agència de Salut Pública de Barcelona, 2023.
3. WHO. The end TB Strategy global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015 a 2035. [Cited 2023 Oct 6]; Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-HTMTB-2015.19>
4. World Health Organization. Systematic screening for active tuberculosis: an operational guide. WHO/HTM/TB/2015.16. Geneva, Switzerland: WHO, 2015. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549172>

## TB-SEQ: una nueva estrategia de epidemiología genómica para complementar el estudio de contactos de la tuberculosis en Cataluña

Verónica Saludes<sup>1,2</sup>, Elisabet Sicart-Torres<sup>3</sup>, Sandra Pequeño<sup>3</sup>, Mariana G. López<sup>4</sup>, Antoni E. Bordoy<sup>1</sup>, Pilar Ciruela<sup>2,3</sup>, Laia Soler<sup>1</sup>, Miquel Alsedà<sup>3</sup>, Adrián Antuori<sup>1</sup>, Mar Bosch<sup>3</sup>, Sara González-Gómez<sup>1</sup>, Sandra Esteban-Cucó<sup>5</sup>, Palmira Cano<sup>3</sup>, Eva Vicente<sup>5</sup>, Laura Clotet<sup>3</sup>, Griselda Tudó<sup>6,7</sup>, Laura Curto<sup>3</sup>, Julià González<sup>7,8</sup>, Núria Follia<sup>3</sup>, M<sup>a</sup> Teresa Tórtola<sup>8,9</sup>, Joan-Pau Millet<sup>2,10,11</sup>, Tamara Soler<sup>12</sup>, Àngels Tarrés<sup>3</sup>, María D. Guerrero<sup>12</sup>, Glòria Ferrús<sup>3</sup>, Iván Prats<sup>13</sup>, Jacobo Mendioroz<sup>3</sup>, Fernando Alcaide<sup>6,14</sup>, Lucía Fernández<sup>14</sup>, Eva Cuchí<sup>15</sup>, Montserrat Garrigó<sup>16</sup>, Paula Costa<sup>17</sup>, Antonio Casabella<sup>18</sup>, Ángeles Pulido<sup>19</sup>, Ester Picó-Plana<sup>20</sup>, Joan López<sup>21</sup>, Gloria Trujillo<sup>21</sup>, Nuria Torrellas<sup>22</sup>, Xavier Casas<sup>11</sup>, Pere-Joan Cardona<sup>1,23</sup>, Iñaki Comas<sup>2,4</sup>, Elisa Martró<sup>1,2</sup> en nombre del Grupo de Estudio TB-SEQ

<sup>1</sup>Servei de Microbiologia, Laboratori Clínic Metropolitana Nord. Institut de Recerca i Hospital Germans Trias i Pujol (IGTP). <sup>2</sup>CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP). <sup>3</sup>Agència de Salut Pública de Catalunya, Departament de Salut, Generalitat de Catalunya. <sup>4</sup>Tuberculosis Genomics Unit, Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV)-CSIC. <sup>5</sup>Laboratori de Referència de Catalunya. <sup>6</sup>Universitat de Barcelona. <sup>7</sup>Hospital Clínic de Barcelona-ISGlobal. <sup>8</sup>CIBER de Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC). <sup>9</sup>Hospital Universitari Vall d'Hebron. <sup>10</sup>Programa de Prevenció i Control de la Tuberculosis de Barcelona (PPCTB). Servei d'Epidemiologia (SEPID). Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB). <sup>11</sup>Serveis Clínics. <sup>12</sup>Consorci del Laboratori Intercomarcal (CLILAB) de l'Alt Penedès, l'Anoia i el Garraf. <sup>13</sup>Hospital Universitari Arnau de Vilanova. <sup>14</sup>Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL. <sup>15</sup>CATLAB-Centre Analítiques Terrassa AIE. <sup>16</sup>Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. <sup>17</sup>Laboratori Clínic Territorial de Girona. Hospital Universitari de Girona Dr. Josep Trueta. <sup>18</sup>Àrea de Microbiologia, Servei de Laboratoris Clínics, Parc Taulí Hospital Universitari, Institut d'Investigació i Innovació Parc Taulí (I3PT-CERCA), Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>19</sup>Hospital General de Granollers. <sup>20</sup>Hospital Universitari Joan XXIII. <sup>21</sup>Fundació Althaia. Hospital Sant Joan de Déu. <sup>22</sup>Laboratori Fundació Hospital de Palamós. <sup>23</sup>CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES).

### Correspondencia:

Verónica Saludes

E-mail: [vsaludesm.germanstrias@gencat.cat](mailto:vsaludesm.germanstrias@gencat.cat)

Elisabet Sicart-Torres

E-mail: [elisabetsicart@gencat.cat](mailto:elisabetsicart@gencat.cat)

### Utilidad de la secuenciación de genoma completo como marcador epidemiológico de alta resolución

A pesar del progreso significativo en el control de la transmisión de la tuberculosis (TB) en Cataluña, las estrategias tradicionales de rastreo de contactos muestran limitaciones, que han sido acentuadas por el impacto que ha ejercido la pandemia de COVID-19 sobre los sistemas de vigilancia, prevención y control de la TB<sup>1,2</sup>. En los últimos años, se ha demostrado la utilidad de los datos de secuenciación del genoma completo (whole-genome sequencing, WGS) del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) como marcador epidemiológico de alta resolución,

complementando los estudios de contactos en la detección de relaciones epidemiológicas entre pacientes con TB<sup>3,4</sup>.

### La estrategia TB-SEQ

A finales del año 2021 se diseñó la estrategia TB-SEQ en Cataluña, una iniciativa del Hospital e Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol y el Instituto de Biomedicina de Valencia, inicialmente planteada como un estudio piloto, que se puso en marcha con el soporte del CIBER en Epidemiología y Salud Pública (Convocatoria Intramural de Proyectos CIBERESP de 2022, Ref. ESP22PI06). El objetivo principal de la estrategia TB-SEQ es integrar la genómica de MTBC en las actividades formales de

vigilancia epidemiológica para mejorar el control y la prevención de la TB en Cataluña. Esta estrategia confluyó con la decisión de la *Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública* de incorporar la secuenciación genómica en el Programa de Control de la TB en Cataluña, en el marco de la reforma de la vigilancia epidemiológica planteada después de la pandemia. Esta acción se implementó a finales de 2022 y con ella se espera complementar el estudio de contactos, ayudar en la detección, estudio y seguimiento de brotes epidémicos, así como evaluar las tendencias a largo plazo de la transmisión de la TB en nuestra área geográfica, de manera coordinada. Bajo el paraguas del *Servei de Prevenció i Control de la TB de la Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública de Catalunya*, el Servicio de Microbiología del Laboratorio Clínico Metropolitana Norte (LCMN) localizado en el Hospital Universitario Germans Trias i Pujol en Badalona, centraliza los cultivos positivos de TB para llevar a cabo la WGS. Actúan como colaboradores indispensables la Unidad de Genómica de la Tuberculosis (IBV-CSIC, Valencia), la red de laboratorios de Cataluña donde se realiza el cultivo de TB (tanto públicos como privados), los Servicios de Vigilancia Epidemiológica (SVE) de Cataluña, la Agencia de Salud Pública de Barcelona y la Agencia de Salud Pública de Cataluña.

## Metodología

A través de la estrategia TB-SEQ, desde diciembre de 2021 y de forma prospectiva, se realiza la epidemiología genómica de las cepas de MTBC circulantes en Cataluña a partir de los casos con cultivo positivo (tanto de TB pulmonar como extrapulmonar). Los cultivos y una información epidemiológica básica de los casos se obtienen inicialmente de la red de laboratorios públicos y privados. Los cultivos se centralizan en el Servicio de Microbiología del LCMN, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, donde se realiza la extracción de los ácidos nucleicos y la WGS mediante la tecnología de Illumina. Los datos genómicos crudos se analizan mediante un pipeline bioinformático desarrollado previamente ([http://tgu.ibv.csic.es/?page\\_id=1794](http://tgu.ibv.csic.es/?page_id=1794)). Los clusters de transmisión se identifican mediante un árbol filogenético por máxima verosimilitud a partir de secuencias consenso y el cálculo de la distancia genética (número de single nucleotide polymorphisms, SNPs) entre pares de secuencias. Los eventos de transmisión entre pares de casos que pertenecen a un mismo cluster se clasifican como muy probables (0-5 SNPs de diferencia, transmisión reciente), probables (6-10 SNPs, transmisión intermedia), y poco probables (11-15 SNPs, transmisión antigua)<sup>3</sup>.

Por un lado, se ha enviado a los SVE los resultados genómicos de aquellos casos pertenecientes a un brote epidémico previamente declarado y para el que se ha solicitado la WGS,

para ayudar en su análisis epidemiológico. Por el otro, a partir de marzo 2023, todos los resultados de TB-SEQ se han transferido al *Servei de Prevenció i Control de la TB* para contrastar la información genómica con la información de los estudios de contactos y de brotes epidémicos, para determinar en qué proporción de los eventos de transmisión identificados genómicamente se había identificado un vínculo epidemiológico. Este vínculo es detectado desde los SVE al hacer los estudios de contactos y detectar nuevos casos de TB relacionados entre sí (brote). También se ha realizado el análisis de los factores asociados a pertenecer a un cluster de transmisión reciente mediante el paquete estadístico SPSS v. 18.0. En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo inicial univariado, para comprobar la normalidad de las variables se ha utilizado la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se han utilizado las estadísticas básicas de tendencia central: la media aritmética (desviación estándar) para las variables continuas de distribución normal y la mediana (rango intercuartílico) para aquellas con rangos de distribución no normal. La distribución relativa de frecuencias se ha utilizado para las variables categóricas. Se ha realizado un análisis bivariado entre los casos que pertenecían o no a un clúster, mediante la comparación de proporciones y variables independientes binarias, se han utilizado las tablas de contingencia, la estadística  $\chi^2$  y la prueba exacta de Fisher cuando ha sido necesario. Para la comparación de dos medias entre grupos, se ha utilizado la t-Student, si las variables cumplían los criterios de normalidad, o pruebas no paramétricas como la U-Mann Whitney en caso de no seguir parámetros de normalidad. Se ha considerado un valor estadísticamente significativo  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

Tras el primer año y medio de la estrategia TB-SEQ, se ha establecido con éxito una red de 16 laboratorios que realizan el cultivo de MTBC. Algunos de ellos, a su vez, centralizan muestras o cultivos de otros laboratorios y de un centro socio-sanitario especializado en el tratamiento de la tuberculosis, por lo que el total de centros representados en la red es de 43. La secuenciación prospectiva y centralizada de estos cultivos ha demostrado ser factible. A septiembre 2023, disponemos de resultados genómicos de 481 casos. Las muestras pertenecientes a los cultivos secuenciados se han recogido entre diciembre 2021 y febrero 2023.

En la Figura 1A se muestra el árbol filogenético de máxima verosimilitud realizado para el análisis de clusters de transmisión de los primeros 481 casos secuenciados. De acuerdo con la distribución geográfica de los diferentes linajes de MTBC el linaje 4 ha sido el mayoritario. En total se han detectado 55 clusters de transmisión usando un umbral de 15 SNPs; este umbral nos

permite detectar transmisiones recientes (0-5 SNPs), intermedias (6-10 SNPs) y antiguas (11-15 SNPs). Se estima que una transmisión reciente, se ha podido producir durante los últimos 5 años (típicamente durante los 2 últimos). El 30,8% de los casos secuenciados (148/481) forman parte de alguno de los clusters identificados y, entre los casos que forman parte de un cluster, el 81,8% (121/148) es de transmisión muy reciente o reciente (0-5 SNPs) y, por lo tanto, el grado de asociación epidemiológica es muy probable.

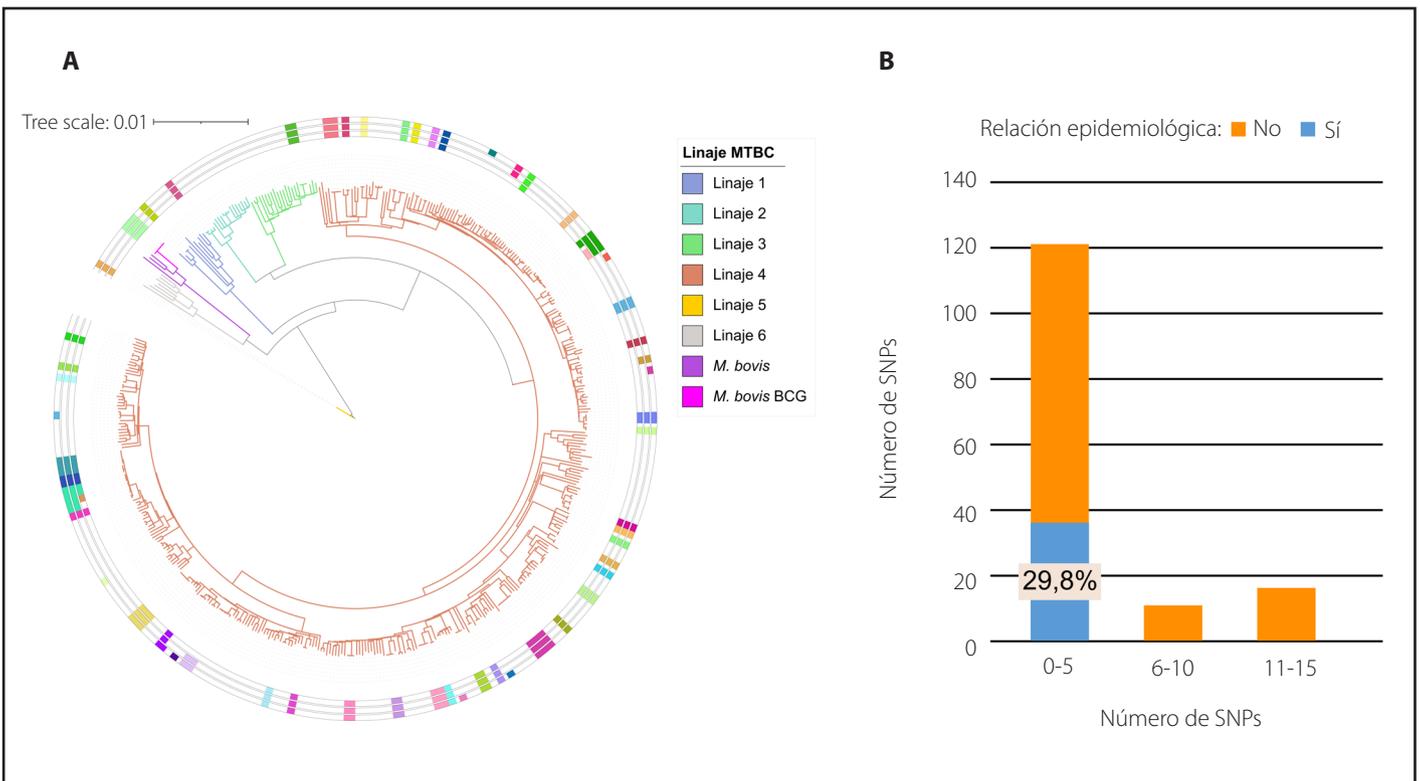
En la Figura 1B se muestra la correlación entre los eventos de transmisión detectados genómicamente y los eventos con vínculo epidemiológico identificado mediante el estudio de contactos. Únicamente para el 29,8% de los casos agrupados en clusters de transmisión muy probables (0-5 SNPs) se había detectado un vínculo epidemiológico. En aquellos casos de transmisión identificados genómicamente como probables y poco probables (6-15 SNPs), no se había identificado previamente ningún vínculo epidemiológico. Las actuaciones futuras serán revisar los datos de la encuesta epidemiológica de los casos pertenecientes a clusters con un grado de asociación genómica muy probable

y sin vinculación epidemiológica identificada anteriormente, y, si es necesario, re-encuestar a estos pacientes para clarificar la relación epidemiológica que hay entre ellos y detectar nuevos casos pertenecientes a brotes. En paralelo, se ha identificado que los factores asociados a formar parte de un cluster de transmisión son la edad más joven, el género masculino, la TB pulmonar, ser contacto de un caso diagnosticado de TB, no tener domicilio fijo, y el tabaquismo (Tabla 1).

### Conclusiones

La implementación de la WGS en la vigilancia epidemiológica de la TB puede ayudar a detectar cadenas de transmisión y brotes epidémicos que no se identificaban con las estrategias tradicionales de rastreo de contactos. Agilizar y coordinar los circuitos para que la información llegue a tiempo a los SVE, así como plantear la ampliación de la investigación epidemiológica en los grupos de transmisión muy reciente, podría ayudar a mejorar las tareas derivadas de control y prevención de la TB.

**Figura 1. A) Árbol filogenético de máxima verosimilitud realizado para el análisis clustering genómico de los primeros 481 casos secuenciados. Las ramas están coloreadas de acuerdo al linaje de MTBC. Sobre cada anillo (de dentro hacia afuera) se representan coloreados los clusters 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). B) Correlación entre distancias genéticas en SNPs y eventos para los cuales se confirmó un vínculo epidemiológico (azul) o no (naranja) de los 148 aislamientos en cluster según los datos genómicos.**



**Tabla 1. Características de los casos analizados por secuenciación genómica. Datos obtenidos del Repositorio Epidemiológico de Cataluña. RDMI-TBC.**

	Población de estudio (N=481)	Secuenciación genómica completa		p-valor
		Clúster (n=148)	No clúster (n=333)	
Edad, años (mediana; P25-P75)	43 (30-59)	37,5 (28-53,5)	47 (31-61)	<0,001*
Edad en categorías (años)				
0-14	12 (2,5%)	9 (6,1%)	3 (0,9%)	0,001*
15-24	46 (9,6%)	17 (11,5%)	29 (8,7%)	
25-44	194 (40,3%)	67 (45,3%)	127 (38,1%)	
45-64	140 (29,1%)	38 (25,7%)	102 (30,6%)	
65+	89 (18,5%)	17 (11,5%)	72 (21,6%)	
Sexo, Hombre	327 (68%)	110 (74,3%)	217 (65,2%)	0,04*
Localización de la tuberculosis				
Pulmonar (Pulmonar exclusiva y pulmonar mixta)	390 (81,1%)	130 (87,8%)	260 (78,1%)	0,01*
Extrapulmonar exclusiva	91 (18,9%)	18 (12,2%)	73 (21,9%)	
Baciloscopia positiva	178 (37,6%)	57 (38,8%)	121 (37%)	0,71
Resistencias				
Monoresistencia a la Isoniacida	8 (29,6%)	1 (16,7%)	7 (33,3%)	0,72
Monoresistencia a la Pirazinamida	11 (40,7%)	3 (50%)	8 (38,1%)	
Multidrogoresistencia (MDR)	8 (29,6%)	2 (33,3%)	6 (28,6%)	
País de origen				
España	185 (39%)	62 (42,2%)	123 (37,6%)	0,34
Otros países	289 (61%)	85 (57,8%)	204 (62,4%)	
Factores de riesgo				
Contacto de paciente con TB	50 (14,4%)	36 (31,3%)	14 (6%)	<0,001*
Familia desestructurada	26 (7,8%)	7 (6,7%)	19 (8,3%)	0,6
Sin domicilio fijo	22 (6,6%)	13 (12,3%)	9 (4%)	0,005*
Vive en instituciones cerradas	11 (3,3%)	4 (3,8%)	7 (3,1%)	0,73
Personas que se inyectan drogas (PQID) o ex-PQID	10 (2,4%)	3 (2,3%)	7 (2,5%)	0,92
Tabaquismo	163 (37,5%)	64 (47,1%)	99 (33,1%)	0,005*
Consumo excesivo de alcohol	66 (15,7%)	26 (19,7%)	40 (13,8%)	0,12
Comorbilidades				
Diabetes mellitus	39 (9,5%)	9 (7%)	30 (10,6%)	0,25
Insuficiencia renal crónica	16 (3,9%)	5 (3,9%)	11 (4%)	0,98
Inmunosupresión (tratamiento)	27 (6,6%)	8 (6,3%)	19 (6,8%)	0,84

## Bibliografía

- Pequeño S. Situación epidemiológica de la TB en Cataluña. *Rev Enf Emerg* 2022;21(3):184-185.
- Simón P, Millet JP. Programa de TB en Barcelona: 35 años y diversos factores inesperados en contra. *Rev Enf Emerg*. 2022;21(3):186-90.
- Xu Y, Cancino-Muñoz I, Torres-Puente M, et al. High-resolution mapping of tuberculosis transmission: Whole genome sequencing and phylogenetic modelling of a cohort from Valencia Region, Spain. *PLOS Medicine* 2019;16(10):e1002961.
- Cancino-Muñoz I, López MG, Torres-Puente M, et al. Population-based sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* reveals how current population dynamics are shaped by past epidemics. *Elife*. 2022;26(11):e76605.

## Grupo de estudio TB-SEQ

Además de los autores, el grupo TB-SEQ incluye a: David P Yagüe, Gemma Clarà, Andreu C Pelegrin (Servei de Microbiologia, Laboratori Clínic Metropolitana Nord. IGTP); Ángela Domínguez (Universitat de Barcelona; CIBERESP); Manuela Torres-Puente (Tuberculosis Genomics Unit, IBV-CSIC); Pere Godoy (Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRBLleida)-Universitat de Lleida; CIBERESP); Cristina Rius (Agència de Salut Pública de Barcelona; CIBERESP); Esteve Muntada, Jordi Casabona, y Evelin López-Corbeto (Centre d'Estudis Epidemiològics sobre les ITS i Sida de Catalunya (CEEISCAT); CIBERESP).

## Genómica rápida y epidemiología refinada: un tándem sinérgico

**Darío García de Viedma**

Laboratorio de Genómica Microbiana, Servicio de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón.

Correspondencia:

Darío García de Viedma

E-mail: dgvedma2@gmail.com

La complejidad socio-epidemiológica de determinadas poblaciones, como resultado de la elevada proporción de casos de TB correspondientes a población migrante, requieren de aproximaciones analíticas especiales. Almería es un claro ejemplo de esta complejidad, con un 75% del total de casos de TB en 2022 correspondiendo a migrantes y con tasas de incidencia globales 4-5 veces por encima de los valores medios en España.

En esta población, llevamos más de dos décadas aplicando soluciones de vigilancia innovadoras, que descansan en el trabajo conjunto 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 pacientes enfermos y de sus entornos. En los últimos años, hemos optimizado un proceso de trabajo cooperativo entre Madrid y Almería que descansa en 1) análisis molecular (MIRU-VNTR) in situ, sobre las muestras respiratorias bacilíferas, con el fin de identificar rápidamente, incluso antes de que esté disponible el cultivo, los casos candidatos de constituir clusters de transmisión, 2) análisis genómico sobre el cultivo, cuando ya está disponible, de los casos candidatos de estar en cluster tras el análisis preliminar molecular, para confirmar cuales finalmente constituyen clusters robustos y 3) análisis epidemiológico refinado de los clusters, apoyado en la participación de agentes comunitarios de Salud que optimizan la entrevista a los casos, minimizando las barreras culturales/sociales/lingüísticas.

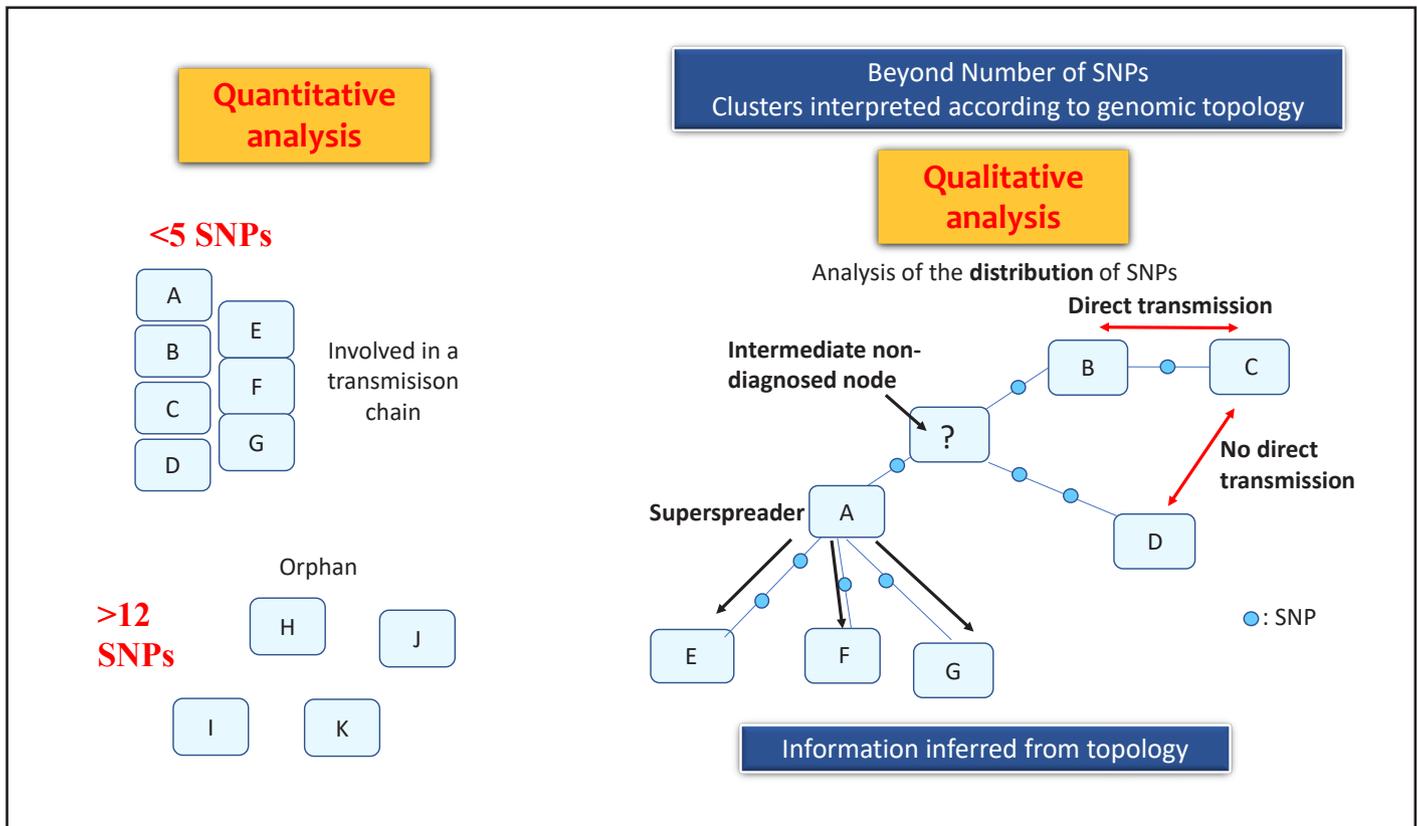
Tras acumular experiencia en la integración del análisis genómico con el estudio epidemiológico refinado, estamos persiguiendo extraer la máxima información relevante de los datos genómicos. En este sentido, tras un primer análisis cuantitativo de los SNPs, o mutaciones puntuales, diferenciales entre las cepas, que nos permite identificar los casos que están en cluster (aislados con un bajo número de SNPs entre ellos), hemos pasado a un segundo nivel de análisis cualitativo, más refinado.

Este análisis no solo considera el número de SNPs diferenciales entre cepas, sino que atiende a la distribución de esos SNPs entre los casos que están en cluster. De este estudio cualitativo, podemos inferir información relevante: casos en cluster en los que esperamos una transmisión directa entre ellos, casos en los que es más probable una transmisión indirecta, individuos supertransmisores que han generado un elevado número de casos secundarios, casos que han debido de participar en la cadena de transmisión pero no han sido aún diagnosticados (Figura), casos que corresponden más probablemente a reactivaciones de exposiciones en el pasado que a transmisiones recientes, etc. De estas observaciones y de la sinergia en tiempo real con los recursos de control y vigilancia se definen las intervenciones epidemiológicas más adecuadas a la naturaleza de cada cluster y de cada caso, priorizando la vigilancia en los entornos donde el análisis genómico documenta transmisión reciente activa.

La aplicación de este análisis genómico cualitativo acoplado a la investigación epidemiológica refinada nos ha permitido i) diferenciar clusters que crecen como resultado de reactivaciones de aquellos causados por transmisión reciente, ii) documentar el impacto de la pandemia de COVID-19 sobre la transmisión de la TB, iii) identificar casos que participaron en cadenas de transmisión en el pasado pero que son diagnosticados años más tarde, iv) reinterpretar clusters inicialmente considerados como microepidemias familiares que escondían realmente un mayor complejidad microbiológica y epidemiológica<sup>1</sup>.

Por último, la sinergia entre genómica y epidemiología refinadas, requiere asegurar la mayor rapidez en obtener los resultados genómicos, para poder integrar el análisis de los clusters de modo precoz en la investigación epidemiológica. Esto requeriría abordar el análisis directamente sobre la muestra respiratoria, un aspecto que aún no ha podido ser resuelto satisfactoriamente<sup>2</sup>. Mientras logramos este objetivo, en nuestro

Figura 1. Esquema de las dos aproximaciones, cuantitativa o cualitativa, realizadas a partir de los resultados genómicos. En el análisis cualitativo se presenta una red de relaciones genómicas entre los casos analizados (indicados por letras), a partir de la cual se puede inferir información de gran valor epidemiológico, que no es extraída del análisis simplemente cuantitativo.



grupo estamos intentando acelerar al máximo la obtención de datos genómicos, analizando los cultivos primarios, sin necesidad de esperar a subcultivos, y adoptando sistemas de secuenciación en nanoporos, más rápidos y flexibles<sup>3</sup>. Este nuevo avance ha sido pilotado satisfactoriamente, demostrando que es posible asegurar una dinámica de análisis rápido cada vez que un nuevo caso es diagnosticado, sin tener que acumular varios casos con el fin de rentabilizar el análisis genómico.

La sinergia entre microbiólogos asegurando un análisis genómico refinado y rápido y epidemiólogos apoyados en agentes comunitarios en salud que reorienten 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.

## Bibliografía

1. Martínez-Lirola M, Herranz M, Buenestado Serrano S, Rodríguez-Grande C, Domínguez Inarra E, Garrido-Cárdenas JA, *et al.* A One Health approach revealed the long-term role of *Mycobacterium caprae* as the hidden cause of human tuberculosis in a region of Spain, 2003 to 2022. *Euro Surveill.* 2023 Mar;28(12):2200852. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.12.2200852. PMID: 36951787; PMCID: PMC10037661.
2. Nilgiriwala K, Rabodoarivelo MS, Hall MB, Patel G, Mandal A, Mishra S, *et al.* Genomic Sequencing from Sputum for Tuberculosis Disease Diagnosis, Lineage Determination, and Drug Susceptibility Prediction. *J Clin Microbiol.* 2023 Mar 23;61(3):e0157822. doi: 10.1128/jcm.01578-22. Epub 2023 Feb 23. PMID: 36815861; PMCID: PMC10035339.
3. Hall MB, Rabodoarivelo MS, Koch A, Dippenaar A, George S, Grobelaar M, *et al.* Evaluation of Nanopore sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing and outbreak investigation: a genomic analysis. *Lancet Microbe.* 2023 Feb;4(2):e84-e92. doi: 10.1016/S2666-5247(22)00301-9. Epub 2022 Dec 19. Erratum in: *Lancet Microbe.* 2023 Feb;4(2):e72. PMID: 36549315; PMCID: PMC9892011.