

# **Molecular Epidemiology of Tuberculosis**

**P. Ioannidis, PhD**  
**National Reference Laboratory for Mycobacteria (*NRLM*),**  
***Sotiria* Chest Diseases Hospital**

**Typing**

- At the species level there is sufficient diversity, that organisms isolated from different sources, at different times and in different geographical regions may be differentiated or classified into sub-types or strains.
- In epidemiological terms, the organisms involved in the outbreak are clonally related; that is, they have a common origin. Clonally related organisms are members of the same species that share virulence factors, bio-chemical traits, and genomic characteristics.

The role of bacterial typing is to determine if epidemiologically identical or related isolates are also genetically related

- The process of (sub)typing is important epidemiologically for recognizing outbreaks of infection, detecting the cross-transmission of nosocomial pathogens, determining the source of the infection, recognizing particularly virulent strains of organisms, and monitoring vaccination programs.

**D. MICHAEL OLIVE & PAMELA BEAN: "Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms" JCM, 1999, V.37, p. 1661–1669**

2

Τα άτομα σε ένα είδος, εμφανίζουν αρκετή ποικιλομορφία ώστε οργανισμοί που απομονώνονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα ή χρονικά διαστήματα, να μπορούν να διακριθούν σε υποείδη ή σε διαφορετικά στελέχη. Μιλώντας με επιδημιολογικούς όρους οι οργανισμοί που εμπλέκονται σε μια επιδημική έξαρση θεωρούνται ότι συσχετίζονται μεταξύ τους κλωνικά και ότι έχουν κοινή καταγωγή – πρόγονο. Ο ρόλος της βακτηριακής γονοτυποποίησης είναι να διερευνήσει, αν τα μικροβιακά στελέχη που απομονώνονται από επιδημιολογικά σχετιζόμενα περιστατικά σχετίζονται μεταξύ τους και γενετικά και σε ποιο βαθμό. Η μοριακή επιδημιολογία όμως είναι εξαιρετικά σημαντική και για το αντίστροφο, για να αναγνωρίσουμε δηλαδή επιδημικές εξάρσεις, μελετώντας τον γονότυπο των επιμέρους στελεχών, να βρούμε την πηγή τους και τον μηχανισμό της διασποράς τους, να ξεχωρίσουμε παθογόνα στελέχη με ιδιαίτερα λοιμογόνα χαρακτηριστικά, αλλά και να ελέγξουμε την αποτελεσματικότητα των παρεμβάσεων μας, όπως π.χ. των προγραμμάτων εμβολισμού ή τον έλεγχο της ενδονοσοκομειακής διασποράς.

## Genotyping

- Genotyping is the process of determining which genetic variants an individual possesses.
- Genotyping can be performed through a variety of different methods, depending on the variants of interest and resources available.

3

Η γονοτυποποίηση είναι η διαδικασία με την οποία βρίσκουμε τα γενετικά αλληλόμορφα που φέρει ένα άτομο ενός είδους . Χρησιμοποιούνται διαφορετικές και ποικίλες μέθοδοι ανάλογα και με το σε ποιους γενετικούς τόπους αναζητούμε την ποικιλομορφία. Οι τόποι, πριν την εισαγωγή των μεθοδολογιών του NGS, που επιτρέπουν την ανάλυση όλου του γονιδιώματος, ήταν - και είναι ακόμη, αν και η κατάσταση αλλάζει ραγδαία με το NGS - καθορισμένες περιοχές του γονιδιώματος που εμφανίζουν διάφορο βαθμό μεταβλητότητας έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικοί δείκτες

The speed of evolution of a given marker conditions its power of resolution (both in time and space)

- **Fast markers short-term epidemiology**  
(IS6110, MIRU-VNTR)
- **Slower markers long-term epidemiology**  
(Direct Repeat)
- **Slow markers phylogenetic studies**  
(rRNA)

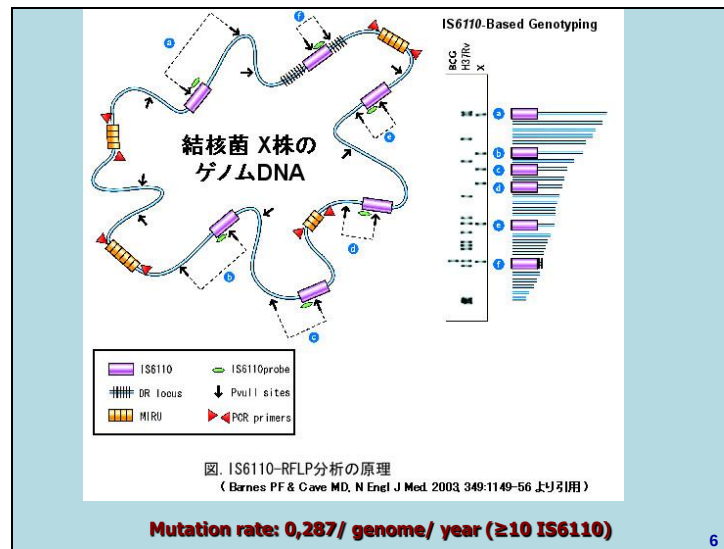
Tibayrenc, C. R. Acad Sci III, 1995

4

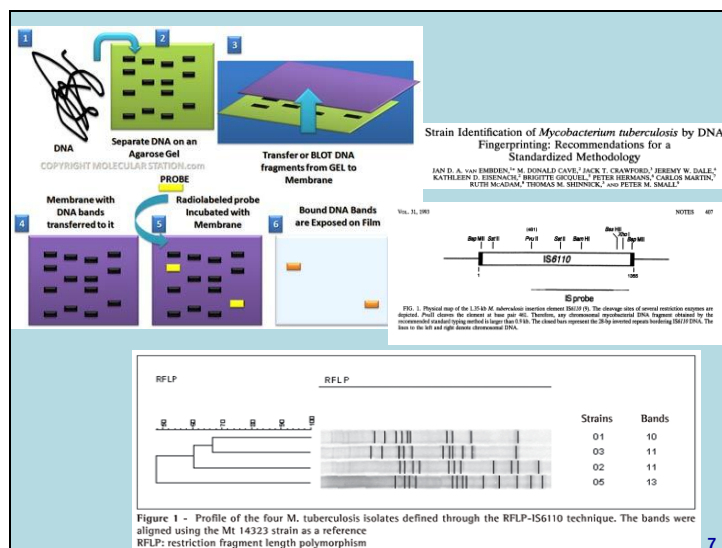
Το είδος της πληροφορίας που μας δίνει κάθε τέτοιος δείκτης εξαρτάται από το ρυθμό με τον οποίο μεταβάλλεται. Μπορεί έτσι να χρησιμοποιηθεί είτε για βραχυπρόθεσμη - και περιορισμένη γεωγραφικά ανάλυση - ή για πιο μακροπρόθεσμη και εκτεταμένη επιδημιολογική διερεύνηση. Οι δείκτες που ιστορικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την επιδημιολογική διερεύνηση στο μυκοβακτηρίδιο είναι τρεις: Το μεταθετό στοιχείο IS6110, η περιοχή του γονιδιωμάτος του βακίλου με τα Direct repeats - DRs και οι διάσπαρτες περιοχές MIRU-VNTR. Γενετικοί τόποι που εμφανίζουν πολύ αργό ρυθμό μεταβολής, για την ακρίβεια μπορούν να θεωρηθούν εξαιρετικά σταθεροί, όπως π.χ. τα γονίδια που κωδικοποιούν το rRNA, χρησιμοποιούνται, λόγω ακριβώς αυτής της σταθερότητας τους, για φυλογενετικές και εξελικτικές συσχετίσεις, όπως είδαμε και πριν με τις μεθόδους για την διαφοροδιάγνωση των NTM .

- MTB genome 4,441,529 bp, high CG content (~65%). Numerous repetitive sequences, no plasmid  
*Cole, Nature 1998*
- No exchange of genetic material. Propagates clonally (the offspring are genetically identical to their parent)
- "The only requirement for population genetics is to use molecular markers that show sufficient level of polymorphism and make possible multilocus analysis"  
*Tibayrenc, C. R. Acad Sci III, 1995*

Το γονιδίωμα του μυκοβακτηρίου της φυματίωσης αποκωδικοποιήθηκε το 1998, έχει λίγο λιγότερες από 4,5 εκατ. βάσεις, υψηλό GC περιεχόμενο, πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και δεν φέρει πλασμίδια. Το μυκοβακτηρίδιο δεν κάνει ανταλλαγή γενετικού υλικού μέσω πλασμιδίων ή άλλων μηχανισμών. Έτσι το γενετικό υλικό των απογόνων είναι πανομοιότυπο με το πατρικό ή μάλλον σωστότερα, διαφέρει μόνο στο βαθμό που έχουν συμβεί μεταλλάξεις κατά τη διαδικασία του διπλασιασμού του DNA. Σε οργανισμούς με τέτοια χαρακτηριστικά, η μόνη προϋπόθεση για πληθυσμιακή γενετική ανάλυση, είναι η παρουσία ικανού αριθμού διαφορετικών περιοχών με ικανό βαθμό μεταλλαγής, ώστε να μπορέσουν συνδυασμένα να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί γονοτυπικοί δείκτες.



Ιστορικά ο πρώτος γενετικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε για την επιδημιολογική διερεύνηση των στελεχών MTB ήταν το μεταθετό στοιχείο IS6110. Είναι τύπου II μεταθετό στοιχείο που κωδικοποιεί την δική του TRANSPOSASE, την πρωτεΐνη δηλαδή που εξασφαλίζει την μετάθεσή του ως τμήμα DNA, από μια περιοχή του γενετικού υλικού σε άλλη. 1-15 αντίγραφα του στοιχείου IS6110 βρίσκονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα του μυκοβακτηριδίου. Έχει δείχθει ότι το στοιχείο είναι μεν αρκετά σταθερό σε επίπεδο στελέχους, αρκετά όμως «ευκίνητο» ώστε να επιτρέπει το διαχωρισμό δύο επιδημιολογικά μη συσχετιζόμενων στελεχών. Ο ρυθμός μεταβολής έχει εκτιμηθεί σε μία κάθε 3,5 χρόνια.



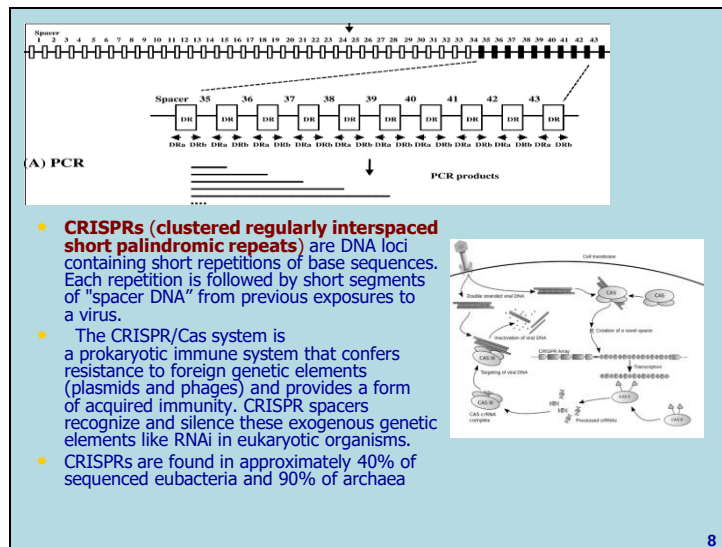
Μεθοδολογικά: Γίνεται πέψη του DNA με την ενδονουκλεάση Pvu II που έχει ένα σημείο αναγνώρισης εντός του IS6110 και φυσικά πολλαπλά σημεία στο υπόλοιπο γενετικό υλικό. Τα τμήματα του DNA που προκύπτουν ηλεκτροφορούνται, μεταφέρονται σε μεμβράνη και υβριζονται με σημασμένο ιχνηθέτη που αναγνωρίζει το άκρο του μεταθετού στοιχείου. Το pattern που προκύπτει καθορίζεται από τον αριθμό των αντίτυπων του μεταθετού στοιχείου και την θέση τους στο γονιδίωμα. Η σύγκριση των διαφορετικών patterns επιτρέπει την συσχέτιση μεταξύ των διαφορετικών στελεχών, όπως φαίνεται στο κάτω μέρος της διαφάνειας

ΤΡΙΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ:

1. Χρειάζεται αρκετή ποσότητα DNA που προϋποθέτει μεγάλη καλλιέργεια μυκοβακτηριδίου και αυτό δεν είναι ότι πιο ασφαλές και επιπρόσθετα είναι χρονοβόρο.
2. Τα αποτελέσματα δεν είναι εύκολα συγκρίσιμα μεταξύ πολλών διαφορετικών στελεχών αλλά και μεταξύ των εργαστηρίων.
3. Είναι χαμηλή η διακριτική ικανότητα για στελέχη που έχουν μικρό αριθμό επαναλήψεων του IS6110

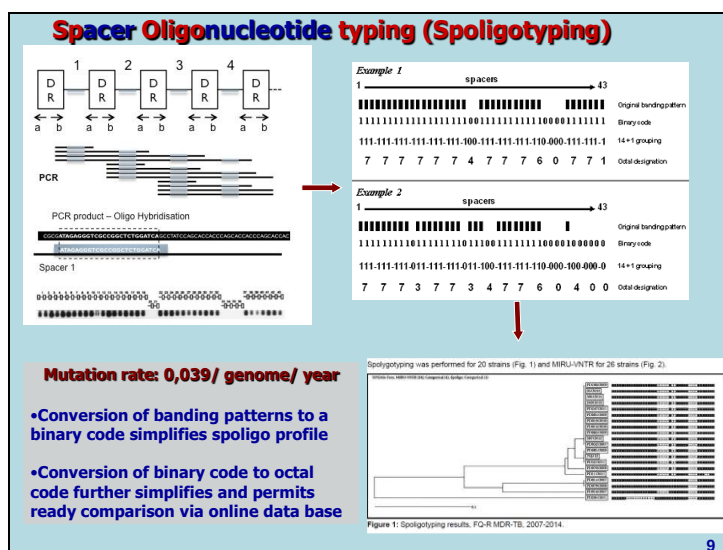
Έτσι η μέθοδος κατέληξε τελικά να χρησιμοποιείται μόνο συμπληρωματικά και στο βαθμό που χρειάζονταν να αυξηθεί η διακριτική ικανότητα των προσεγγίσεων που θα δούμε στην συνέχεια

## Διαφάνεια 8

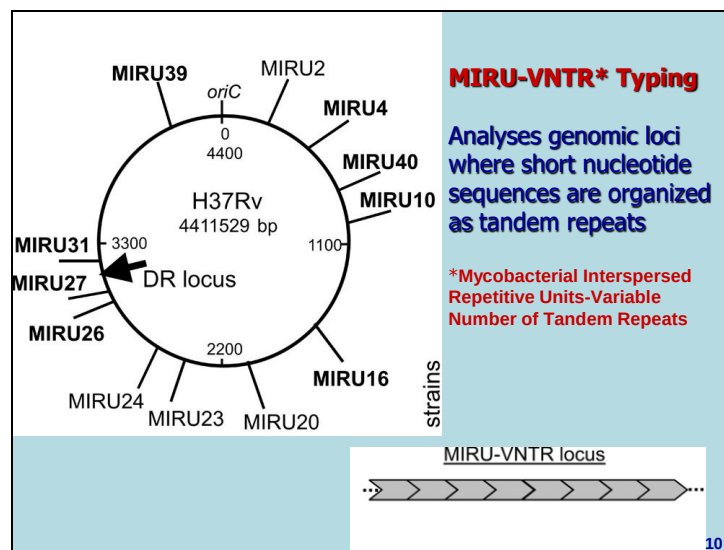


Ο δεύτερος δείκτης που χρησιμοποιήθηκε είναι η περιοχή με τα Direct Repeats. Στην περιοχή αυτή υπάρχουν 44 επαναλήψεις της ίδιας μικρής αλληλουχίας. Οι παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες ανάμεσα σε κάθε αντίτυπο είναι μοναδικές. Σήμερα ξέρουμε το ρόλο που παίζει αυτή η περιοχή. Είναι ένα γενετικός τύπος CRISPR που αποτελεί μηχανισμό άμυνας πολλών ειδών προκαρυωτικών οργανισμών έναντι εισβολέων, όπως οι φάγοι ή τα πλασμίδια.

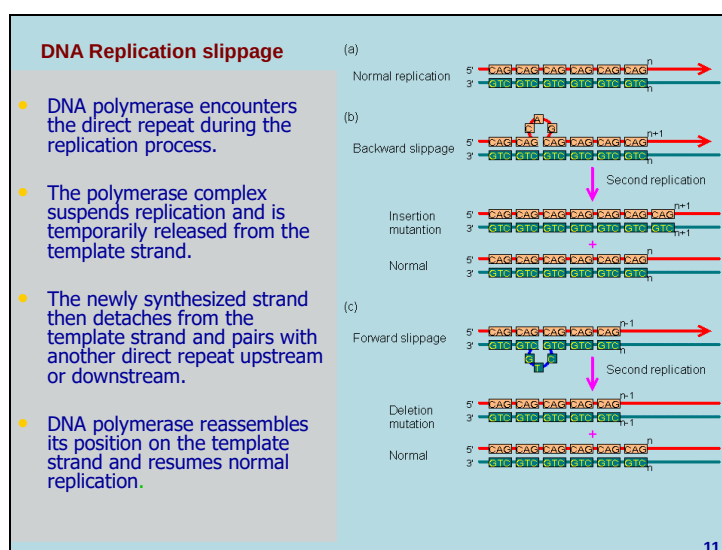




Οι μεταβλητές αλληλουχίες μεταξύ των DRs ακινητοποιούνται με καθορισμένη σειρά σε μεμβράνη και χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες στους οποίους υβριδίζονται τα προϊόντα PCR που καλύπτουν την περιοχή. Ο ρυθμός μετάλλαξης της περιοχής είναι μια κάθε 25 χρόνια και αυτές οδηγούν στην απώλεια DRs, άρα και των παρεμβλλόμενων περιοχών. Έτσι διάφορα στελέχη μπορεί να εμφανίζουν διαφορετικό pattern υβριδισμού, το οποίο εύκολα περιγράφεται με το δυαδικό σύστημα (NAI/OXI) ή τελικά με το οκταδικό σύστημα.) Η μετατροπή αυτή βοηθά στην ανάλυση & σύγκριση μεταξύ των στελεχών ακόμη και αν απομονώνονται από διαφορετικά εργαστήρια. Η διαδικασία ονομάζεται Spoligotyping (Spacer Oligonucleotide typing). Ο ρυθμός μεταλλαξογένεσης είναι μικρός και γι αυτό ο marker αυτός επιτρέπει τον πιο αδρό διαχωρισμό και θεωρείται κατάλληλος για την κατάταξη των στελεχών των μυκοβακτηριδίων σε μεγάλες εξελικτικές οικογένειες και υπό-οικογένειες



Η γονοτυπική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε στη συνέχεια, αναλύει τις περιοχές MIRU-VNTR που είναι διάσπαρτες στο γονιδίωμα του μυκοβακτηριδίου. Σε κάθε MIRU-VNTR έχουμε διαδοχικές επαναλήψεις της ίδιας αλληλουχίας *in tandem*, δηλαδή χωρίς να παρεμβάλλονται ανάμεσά τους άλλες αλληλουχίες όπως συμβαίνει στα DRs. Ο αριθμός των επαναλήψεων μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ατόμων του είδους. Έχει χρησιμοποιηθεί διαδοχικά η συνδυασμένη ανάλυση 12, 15 και 24 διαφορετικών MIRUs.

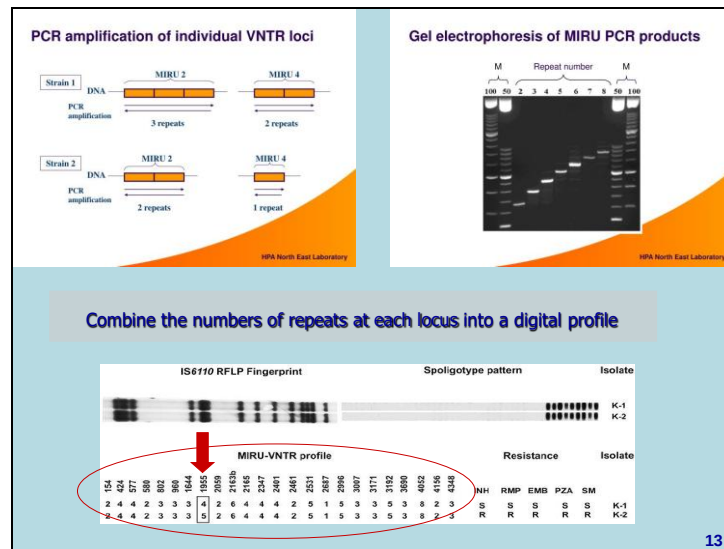


Ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών στα MIRUs μπορεί να μεταβάλλεται, κυρίως λόγω «γλιστρήματος» του νεοσυντηθεμένου κλώνου DNA κατά την διαδικασία της αντιγραφής και υβριδισμού του με την πριν ή μετά ευρισκόμενη επαναλαμβανομένη αλληλουχία. Η διαδικασία αυτή μπορεί να προσθέσει αλλά και να αφαιρέσει αντίτυπα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Έτσι μπορεί να συμβεί και αναστροφή μιας μετάλλαξης, πράγμα που δεν συμβαίνει με τις παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες στα DRs. Βέβαια τόσο σε ό,τι αφορά τις περιοχές MIRU/VNTR, όσο και την περιοχή DR, έχουν βρεθεί στελέχη με τεράστια κατά τα άλλα γενετική ποικιλομορφία, στα οποία η συγκλίνουσα εξέλιξη δημιούργησε πανομοιότυπα pattern MIRU/VNTR ή Spoligotypes. Και για το μεταθετό στοιχείο, όμως υπάρχουν δεδομένα ότι έχει «προτίμηση» μετάθεσης σε συγκεκριμένες περιοχές. Ο κίνδυνος να συσχετιστούν μεταξύ τους στελέχη που δεν έχουν σχέση, αλλά εμφανίζουν ομολογία σε συγκεκριμένους γενετικούς τόπους λόγω συγκλίνουσας εξέλιξης, δεν αφορά φυσικά μόνο το MTB και στην πράξη αντιμετωπίζεται μόνο με την γονοτυπική ανάλυση του συνόλου του γονιδιώματος.

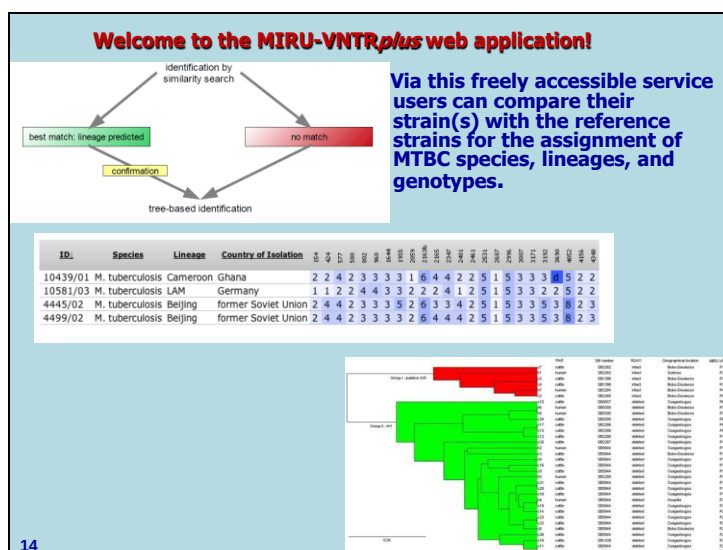
- The mutation rate in *M. tuberculosis* is 0.0014/locus/year
- The variability between strains is analogous to time elapsed from their common ancestor
- Analysis of 24-loci MIRU-VNTR has been shown to be remarkably suitable to simultaneously used for both transmission detection and phylogenetic studies

12

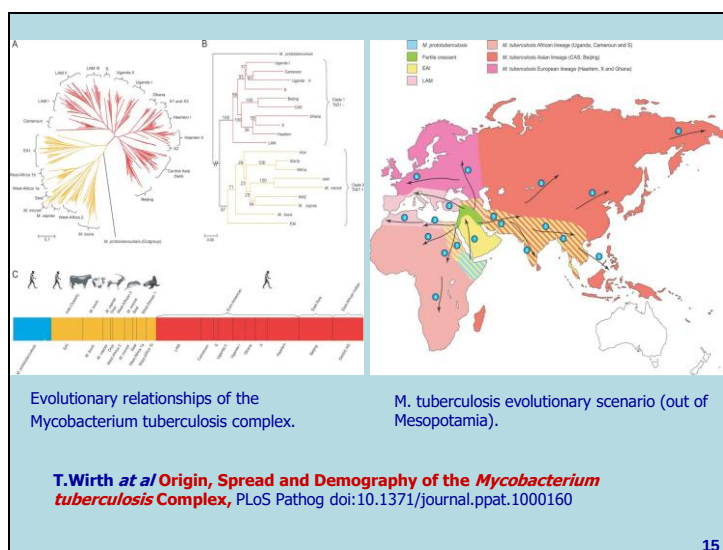
Ο ρυθμός μετάλλαξης ανά MIRU/VNTR τόπο είναι μικρός. Τα διαφορετικά στελέχη μυκοβακτηριδίων μπορεί να εμφανίζουν διαφορές στον αριθμό των αντιτύπων σε επιμέρους γενετικούς τόπους. Η διαφορά μεταξύ δύο στελεχών είναι ανάλογη του χρόνου που έχει μεσολαβήσει από τον κοινό πρόγονό τους. Έχει δειχθεί ότι η ανάλυση 24 συγκεκριμένων MIRU-VNTR - από τα 41 συνολικά που έχει το MTB – είναι ικανή να δώσει πληροφορία τόσο για την φυλογενετική μελέτη όσο και για την διερεύνηση της αλυσίδας της μετάδοσης. Συνδυαστικά οι 24 τόποι εμφανίζουν ρυθμό μεταλλακτικότητας ανάλογο του μεταθετού στοιχείου IS6110 .



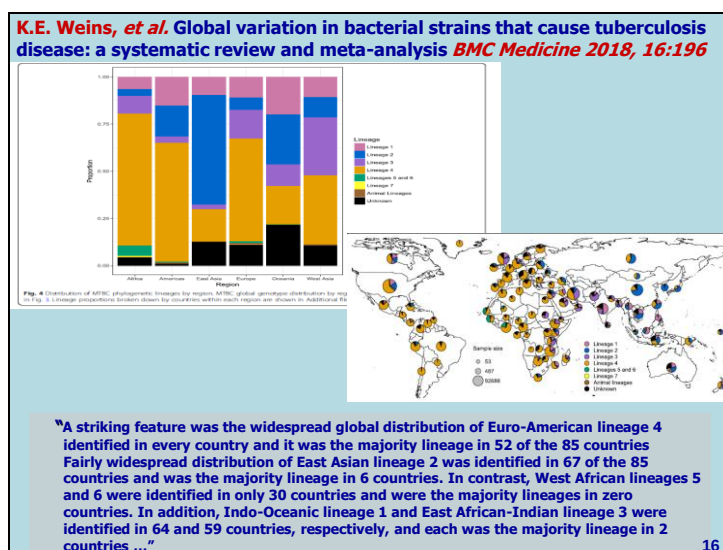
Τεχνικά αυτό που κάνουμε είναι να πολλαπλασιάσουμε με PCR τους διαφορετικούς τόπους και να υπολογίσουμε από το μέγεθος του προϊόντος τον αριθμό των αντιτύπων σε κάθε VNTR τόπο. Αποδίδουμε το αποτέλεσμα με ένα 24ψήφιο αριθμό που σε κάθε ψηφίο του το νούμερο αντιστοιχεί στον αριθμό των αντιτύπων για κάθε ένα από τα MIRU-VNTR. Με βάση αυτόν τον αριθμό συγκρίνουμε μεταξύ τους τα στελέχη. Στελέχη με πανομοιότυπο MIRU-VNTR pattern θεωρούνται ότι ανήκουν σε επιδημική διασπορά του ίδιου κλώνου.



Υπάρχουν βάσεις δεδομένων και on line προγράμματα ανάλυσης που μας επιτρέπουν να συγκρίνουμε τα γενετικά αποτυπώματα των στελεχών τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα στελέχη που τα δεδομένα τους υπάρχουν ήδη κατατεθειμένα. Έτσι επιτυγχάνουμε την ομαδοποίηση των στελεχών ανάλογα με το βαθμό ομοιότητας σε αθροίσματα (CLUSTERS) πανομοιότυπων γονοτυπικά στελεχών. Αυτά με τη σειρά ταξινομούνται σε ομάδες υψηλού βαθμού ομοιότητας, σε υπο-οικογένειες μικρότερου βαθμού, κ.ο.κ. Κάνουμε δηλαδή μια κατηγοριοποίηση από κάτω προς τα πάνω με βάση τον βαθμό ομοιότητας. Η ομαδοποίηση αυτή βοηθά στην ανάλυση της γεωγραφικής και πληθυσμιακής κατανομής τους, αλλά και της «παρακολούθηση» της διασποράς τους από την αρχική γεωγραφική / πληθυσμιακή αφετηρία. Επιπρόσθετα, ανάλογα με το πόσο λεπτομερές είναι το γενετικό αποτύπωμα με την γονοτυποπτική μέθοδο ή με συνδυασμό των μεθόδων, μπορεί να αποκτήσουμε εικόνα για την πιθανή αλυσίδα μετάδοσης ενός στελέχους από ασθενή σε ασθενή.



Σήμερα είμαστε σε θέση με βάση τα γενετικά δεδομένα να κάνουμε μια υπόθεση για την εξελικτική πορεία του MTB. Πιστεύεται ότι κάποιος πετυχημένος πρόγονος του βακίλου αποίκισε τον άνθρωπο περίπου 40.000 χρόνια πριν, εξελίχθηκε σε υποχρεωτικό ενδοκυττάριο παράσιτο και τον ακολούθησε στη διασπορά του σε όλη τη γη. Εκεί στους απομονωμένους ανθρωπίνους πληθυσμούς, το MTB, ίσως μερικώς γενετικά διαφορετικό εξ αρχής και λόγω πληθυσμιακών bottle necks, εξελίχθηκε στους προγόνους των σημερινών μεγάλων οικογενειών στελεχών, που εμφάνιζαν κατ' αρχάς τοπική διασπορά όσο την επέτρεπαν οι περιορισμένες ανθρώπινες επαφές. Οι επιμέρους αυτοί κλώνοι συνεξελίχθηκαν με τους ανθρώπινους πληθυσμούς που επιμόλυναν. Έτσι τα σημερινά στελέχη του MTB κατατάσσονται σε 7 μεγάλες εξελικτικές οικογένειες που εμφανίζουν χαρακτηριστική φυλογεωγραφική προέλευση.



Ο γεωγραφικός περιορισμός / εντοπισμός αλλάζει με την εντατικοποίηση των ανθρώπινων επαφών. Στην αρχή με την αποικιοκρατία και στην συνέχεια με την βιομηχανική επανάσταση, την αστικοποίηση και την μετανάστευση. Και ακόμη περισσότερο σήμερα με την πιο έντονη ανθρώπινη επαφή. Η εκτεταμένη μετά-ανάλυση που αναφέρεται στην διαφάνεια που περιέλαβε >200.000 στελέχη, έδειξε την πολύ ευρύτερη διασπορά των πιο πρόσφατων εξελικτικά οικογενειών 2 (Ανατολικό-Ασιατική), 3 (Ανατολικής Αφρικής – Ινδίας) και 4 (Ευρώ-Αμερικανική) και την φθίνουσα πορεία των εξελικτικά παλαιότερων Αφρικανικών οικογενειών 5 & 6. Επιπρόσθετα, ανέδειξε και το ρόλο της Ευρωπαϊκής αποικιοκρατίας στη διασπορά της Ευρώ-Αμερικανικής οικογένειας (με το μουσταρδί χρώμα) σε όλο τον κόσμο η οποία και κυριαρχεί στις 52 από τις 85 χώρες στις οποίες αναφέρονται τα δεδομένα.



### The Beijing family

- Highly conserved strains (their spread started recently?)
- Are more frequently isolated from young patients (are emerging?)
- Are associated with drug resistance and MDR-TB outbreaks
- Their genetic background favors transmission despite the fact that resistance cost fitness ?

17

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η οικογένεια BEIJING, μία από τις 5 υπο-οικογένειες της ευρύτερης Ανατολικό-Ασιατικής οικογένειας γιατί τα στελέχη της εμφανίζουν ορισμένα ιδιαίτερα ανησυχητικά χαρακτηριστικά όπως το ότι: α) φαίνεται να έχουν ενδογενώς σχετικά αυξημένη **ανοχή** στα Α/Φ φάρμακα, (ανεξαρτήτως της παρουσίας μεταλλάξεων στα γονίδια *rpoB* και *katG/inhA*) β) Αυτή η ανοχή μπορεί να διευκολύνει την ανάπτυξη **αντοχής** και αυτό ίσως να εξηγεί ότι συχνά BEIJING σελάχι συνδέονται με επιδημίες πολυανθεκτικής φυματίωσης γ) παρά την σχετικά πρόσφατη ανάδειξή τους – όπως υποδηλώνει η υψηλή εξελικτική ομοιογένειά τους – εμφανίζουν παγκόσμια διασπορά και επιπρόσθετα, δ) απομονώνονται με υψηλή συχνότητα από νέους ασθενείς. Τα παραπάνω υποδηλώνουν υψηλή μολυσματικότητα και διερευνάται το γενετικό υπόβαθρο που καθορίζει τα επιθετικά χαρακτηριστικά της ποιο επιτυχημένης, όπως χαρακτηρίζεται, εξελικτικής οικογένειας MTB.

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|-------------------------------------------------------------------------------------|
| National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention<br>Division of Tuberculosis Elimination                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |  |
| <h2>TB Molecular Epidemiology: Targeting Recent Transmission</h2>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |  |                                                                                     |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Goal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Reduce the burden of TB by identifying where transmission is currently occurring and interrupting it</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Challenge</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Distinguish recent transmission from cases infected long ago</li> </ul> </li> <li>▪ <b>Approach</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>– Combine molecular, clinical, and epidemiologic data to detect, investigate, and monitor recent TB transmission</li> </ul> </li> </ul> |  |                                                                                     |
| S.Talarico & B. Silk. Whole-genome sequencing for investigation of recent TB transmission in the United States: Current uses and future plans                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |  |                                                                                     |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | 18                                                                                  |

Η μοριακή γονοτυποίηση μπορεί να έχει ιδιαίτερα σημαντική συμβολή στην επιδημιολογική διερεύνηση της νόσου. Το κρίσιμο στην επιδημιολογική διερεύνηση της φυματίωσης είναι να διακριθούν τα περιστατικά που οφείλονται σε πρόσφατη διασπορά από αυτά που οφείλονται σε ενεργοποίηση λανθάνουσας νόσου και στα οποία η μόλυνση έχει συμβεί κάποια στιγμή στο μακρινό παρελθόν. Ο λόγος είναι προφανής. Μόνο στην πρώτη περίπτωση είναι δυνατόν/πιθανόν να αποκαλυφθεί μέσω αναζήτησης των επαφών, η αλυσίδα της μετάδοσης, να βρεθεί η πηγή της νόσου, να ληφθούν μέτρα διακοπής της διασποράς, να βρεθούν και να μπουν σε θεραπεία ασθενείς που δεν έχουν αναζητήσει ακόμη οι ίδιοι την ιατρική συμβολή, να διερευνηθεί η λανθάνουσα νόσος και να δοθεί χημειοπροφύλαξη.

Βέβαια για όλα τα παραπάνω δεν αρκεί μόνο η μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση αλλά χρειάζεται ο συνδυασμός της με κλινικά επιδημιολογικά δεδομένα και η ύπαρξη μηχανισμού εφαρμογής τους

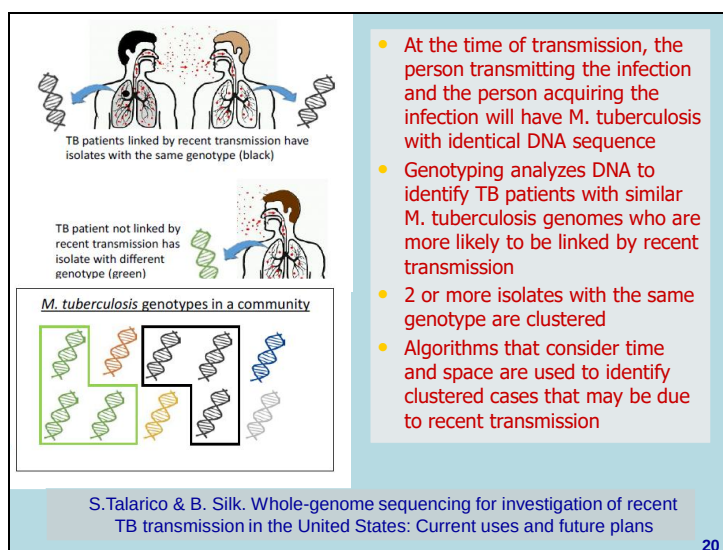
National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention  
Division of Tuberculosis Elimination


### Why combine molecular, clinical, and epidemiologic data to understand TB transmission?

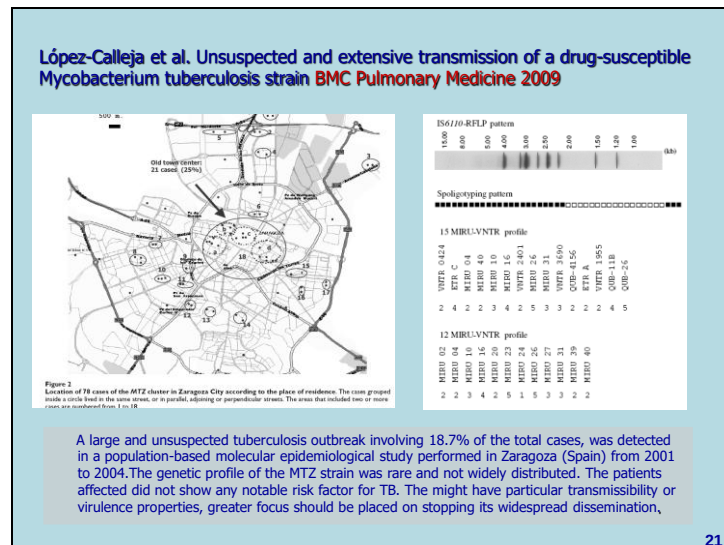
- Challenges to relying exclusively on epidemiologic investigation
  - Airborne transmission
  - Exposure in congregate settings
  - Long infectious periods
  - Patient recall may be incomplete or unreliable
  - Often in impoverished or marginalized communities
- Molecular genotyping data can provide additional, complementary information to aid detection and investigation of transmission
  - Genotyping identifies cases with genetically similar *M. tuberculosis* isolates that are more likely to be linked by transmission

S.Talarico & B. Silk. Whole-genome sequencing for investigation of recent TB transmission in the United States: Current uses and future plans
19

Ο συνδυασμός των προσεγγίσεων είναι αναγκαίος γιατί λόγω των χαρακτηριστικών του νοσήματος είναι δύσκολο να στηριχθεί κάποιος μόνο στα δεδομένα της κλασικής επιδημιολογικής αναζήτησης. Για ένα αερογενώς μεταδιδόμενο νόσημα υπάρχει πάντα η αμφιβολία που το «αναπνεύσαμε», πολύ περισσότερο μάλιστα όταν η περίοδος «επώασης» της νόσου μπορεί να είναι πολλά χρόνια. Ή ακόμη το γεγονός ότι η νόσος διασπείρεται/εκδηλώνεται πιο εύκολα σε ιδιαίτερα ευάλωτους πληθυσμούς π.χ. περιθωριοποιημένες κοινότητες, χρήστες ουσιών, αλκοολικοί ή άστεγοι στους οποίους υπάρχουν επιπρόσθετες δυσκολίες προσέγγισης & επιδημιολογικής διερεύνησης. Κατά συνέπεια η μοριακή επιδημιολογία αποκαλύπτοντας την ύπαρξη γενετικά όμοιων στελεχών μπορεί να προσφέρει πρόσθετη πληροφορία και να καθοδηγήσει/βοηθήσει την επιδημιολογική διερεύνηση στην κοινότητα.



Την στιγμή της μετάδοσης τόσο ο ασθενής όσο και το άτομο που μολύνει φέρουν βακίλους με πανομοιότυπο γενετικό υλικό. Η γονοτυποίηση αποκαλύπτοντας την παρουσία βακίλων με πανομοιότυπο γενετικό υλικό θέτει την υπόνοια ότι οι δύο ασθενείς συνδέονται επιδημιολογικά και αποτελούν περιπτώσεις πρόσφατης μετάδοσης – μεταξύ τους ή μέσω τρίτου ή άλλων ασθενών – κατά τη επιδημική διασπορά ενός βακτηριακού κλώνου. Δύο ή περισσότερα βακτηριακά στελέχη με τον ίδιο γονότυπο κατατάσσονται όπως προαναφέραμε στην ίδια ομάδα (cluster) . Ειδικοί αλγόριθμοι που έχουν τεθεί σε εφαρμογή - όπως π.χ. από το CDC των ΗΠΑ – που συνεκτιμούν τον χρόνο και τον τόπο εκδήλωσης των κρουσμάτων αποκαλύπτουν πιθανά περιστατικά πρόσφατης διασποράς, που (θα) πρέπει να κινητοποιούν τις αρχές.



Ένα παράδειγμα της δυναμικής της μοριακής επιδημιολογίας φαίνεται στην διαφάνεια. Αφορά την πόλη της Σαραγόσα στην Ισπανία όπου η γονοτυπική ανάλυση αποκάλυψε ότι το 19% των στελεχών, σε μια περίοδο 3 ετών, είχαν ένα σχετικά σπάνιο αλλά πανομοιότυπο γονοτυπικό προφίλ και με τις τρεις μεθόδους γονοτυπικής ανάλυσης. Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι τα στελέχη που απομονώθηκαν από αυτούς τους 78 ασθενείς ήταν το αποτέλεσμα πολύ πρόσφατης κλωνικής διασποράς. Το γεγονός ότι οι ασθενείς, που οι περισσότεροι ζούσαν σε μια περιορισμένη περιοχή της πόλης ή σε κοντινά σπίτια/δρόμους, δεν είχαν κάποιο ιδιαίτερο παράγοντα κινδύνου, υποδήλωνε επίσης την παρουσία ενός σχετικά ισχυρά λοιμογόνου κλώνου. Τέτοιου είδους διερευνήσεις όταν γίνονται σε πραγματικό χρόνο—όπως συμβαίνει π.χ., στην Ολλανδία ή την Μ. Βρετανία - και όχι αναδρομικά, μπορούν να εντοπίζουν άμεσα την εμφάνιση κλωνικά σχετιζόμενων περιστατικών πράγμα, που σημαίνει ότι έχουμε πρόσφατη μετάδοση και να διευκολύνουν/κατευθύνουν την επιδημιολογική διερεύνηση στον ενεργό έλεγχο της νόσου και την λήψη μέτρων περιορισμού της διασποράς

**Molecular surveillance of MDR/XDR-TB in the EU, 2009-2012**

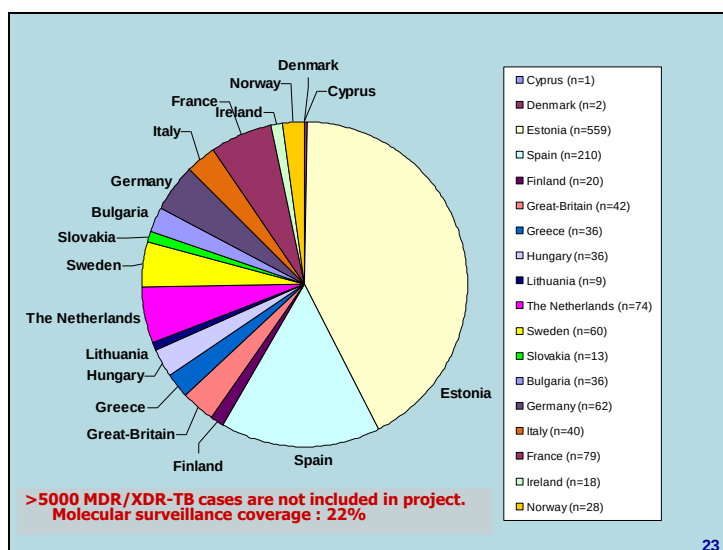
The aim of the project was to trace international transmission of MDR/XDR-TB in the European Union by the application of the 24- loci Variable Number of Tandem Repeats typing (VNTR or MIRU-VNTR)

Cluster definition: Two or more MDR-/XDR-TB strains with identical typing pattern, isolated in at least two different European countries

30 European National Reference Laboratories

22

Την περίοδο 2009 – 2012 το ΕΚΑΜ συμμετείχε μαζί με άλλα 29 Κέντρα Αναφοράς από όλη την Ευρώπη σε πανευρωπαϊκό πρόγραμμα μοριακής επιδημιολογικής διερεύνησης της πολυανθεκτικής – υπερανθεκτικής φυματίωσης. Στόχος του προγράμματος ήταν η διερεύνηση πιθανής διασυνοριακής διασποράς της νόσου στην πολυανθεκτική μορφή της. Εργαλείο η επιδημιολογική γονοτυπική ανάλυση με βάση τα 24-MIRU/VNTRs. Κριτήριο διασυνοριακής διασποράς ήταν ο εντοπισμός «Ευρωπαϊκών» clusters δηλαδή ομάδων δύο ή παραπάνω στελεχών με πανομοιότυπο MIRU/VNTR προφίλ που απομονώθηκαν όμως σε διαφορετικές χώρες.



Τα στελέχη που γονοτυποποιήθηκαν κατά την διάρκεια του προγράμματος κάλυψαν μόνο το περίπου το 22% από τα πάνω από 5000 εκτιμώμενα MDR/XDR στελέχη της περιόδου αυτής, στις χώρες που συμμετείχαν. Ο αριθμός των στελεχών που αναλύθηκαν ανά χώρα φαίνεται στη διαφάνεια. Μόνο 9 από τις 30 χώρες ανέλυσαν γονοτυπικά πάνω από το 70% των στελεχών που απομονώθηκαν αυτό το διάστημα και άλλες 4 γύρω στο 50%. Υπάρχει υποεκπροσώπηση από χώρες με υψηλό αριθμό πολυανθεκτικών στελεχών ή ακόμη και παντελής απουσία τους όπως π.χ. η Ρουμανία. Αυτή ήταν και η βασικότερη αδυναμία της μελέτης.

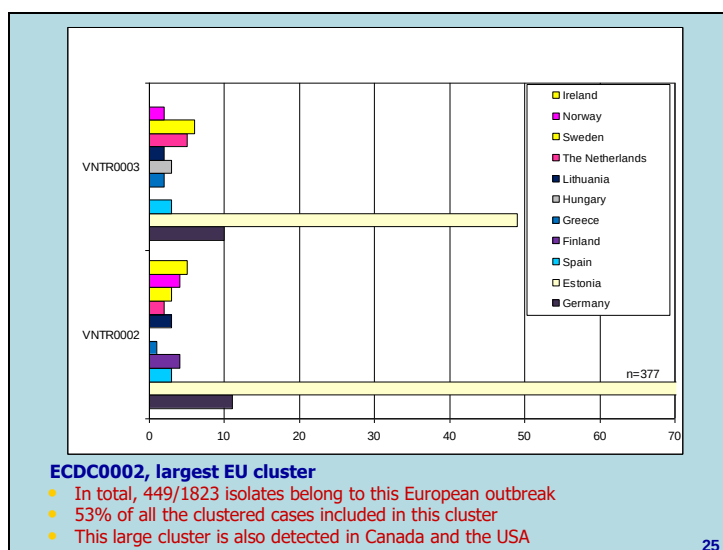
**De Beer *et al.* Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011.** EuroSurveillance 2014 Mar 20;19(11). pii: 20742

- In total, 2,092 variable number of tandem repeat (VNTR) patterns of MDR-/XDR-TB *Mycobacterium tuberculosis* isolates were collected, originating from 24 different countries in the period 2003 to 2011. Of the collected VNTR patterns, 45% (n=941) could be assigned to one of the 79 European multiple-country molecular fingerprint clusters and 50% of those (n=470) belonged to one extremely large cluster caused by Beijing strains of one genotype. We conclude that international transmission of MDR-/XDR-TB plays an important role in the EU, especially in the eastern part, and is significantly related to the spread of one strain or clone of the Beijing genotype. Implementation of international cluster investigation in EU countries should reveal underlying factors of transmission, and show how TB control can be improved regarding case finding, contact tracing, infection control and treatment in order to prevent further spread of MDR-/XDR-TB in the EU.

24

Τα δεδομένα έδειξαν ότι ένα υψηλό ποσοστό – ~45% των στελεχών – ομαδοποιήθηκε σε ένα από τα 79 «Ευρωπαϊκά» clusters που εντοπίστηκαν. Το εύρημα αυτό υποδηλώνει διασυνοριακή διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών σε πανευρωπαϊκό επίπεδο. Τα στελέχη που ομαδοποιήθηκαν σε clusters ανήκαν κυρίως στην οικογένεια BEIJING. Σε ορισμένες χώρες όπως αυτές της Βαλτικής φαίνεται ότι υπάρχει ενεργής διασπορά πολυανθεκτικών στελεχών για μεγάλο χρονικό διάστημα.





Για τα δύο μεγάλα clusters, που εντοπίστηκαν, ο συντριπτικά μεγαλύτερος αριθμός των στελεχών προέρχονταν από την Εσθονία. Στη χώρα αυτή, που υπερ-αντιπροσωπεύονταν σε ότι αφορά τον αριθμό των στελεχών στο συνολικό δείγμα, φαίνεται ότι υπήρχε ενεργός διασπορά στην κοινότητα- και για μεγάλο διάστημα – των δύο αυτών πολυανθεκτικών κλώνων. Όπως προαναφέρθηκε το πρόβλημα έχει την ρίζα του στην βαθιά κρίση της δεκαετίας του '90 στις χώρες της πρώην ΣΕ. Διασπορά των συγκεκριμένων κλώνων εντοπίστηκε στα πλαίσια του προγράμματος σε άλλες 16 Ευρωπαϊκές χώρες. Άλλα έχουν απομονωθεί και στις ΗΠΑ & τον Καναδά. Τα δεδομένα αυτά δείχνουν βέβαια, ότι για ένα αερογενώς μεταδιδόμενο νόσημα και στα πλαίσια ενός αλληλοσυνδεόμενου κόσμου είναι αυταπάτη να πιστεύεται ότι αν το πρόβλημα πάρει τοπικές διαστάσεις θα περιοριστεί εκεί. Φυσικά και το είδαμε με τραγικό τρόπο με την Covid-19.

| SEX*          | NUMBER | %     |
|---------------|--------|-------|
| MALE          | 42     | 80,7% |
| FEMALE        | 10     | 19,3% |
| NOT AVAILABLE | 2      |       |

\*All demographic and clinical information from: **1.** state TB notification reports or **2.** upon contact with the clinician

26

ΑΠΟ ΤΗΝ ΧΩΡΑ ΜΑΣ ΑΝΑΛΥΘΗΚΑΝ 54  
ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΑ/ΥΠΕΡΑΝΘΕΚΤΙΚΑ ΣΤΕΛΕΧΗ  
ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΗΤΑΝ ΚΑΤΑ 80%  
ΑΝΤΡΕΣ

| Place of birth of MDR/XDR patients |            |                       |            |
|------------------------------------|------------|-----------------------|------------|
| COUNTRY                            | NUMBER (%) | COUNTRY               | NUMBER (%) |
| GREECE                             | 16 (29,6%) |                       |            |
| GEORGIA                            | 10         | BULGARIA              | 2          |
| RUSSIA                             | 7          | POLAND                | 1          |
| MOLDOVA                            | 3          | ROMANIA               | 1          |
| KAZAKHSTAN                         | 2          | EASTERN EUROPE (-FSU) | 4 (7,4%)   |
| UKRAINE                            | 1          |                       |            |
| ARMENIA                            | 1          |                       |            |
| FSU                                | 24 (44,5%) |                       |            |
| SOMALIA                            | 1          | FRANCE (METROPOLITAN) | 1          |
| EGYPT                              | 1          | BANGLADESH            | 1          |
| KENYA                              | 1          |                       |            |
| IVORY COST                         | 2          | UNKNOWN               | 3          |
| AFRICA                             | 5 (9,3%)   |                       |            |

27

ΤΟ 30% ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΗΤΑΝ ΓΗΓΕΝΕΙΣ ΕΛΛΗΝΕΣ ΚΑΙ ΤΟ 45% ΠΡΟΕΡΧΟΝΤΑΝ ΑΠΟ ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΗΝ Σ.Ε. ΕΔΩ ΚΑΤΑΤΑΧΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΟΙ ΠΑΛΙΝΟΣΤΗΣΑΝΤΕΣ ΕΛΛΗΝΕΣ ΤΟΥ ΠΟΝΤΟΥ ΠΟΥ ΚΥΡΙΩΣ ΠΡΟΗΛΘΑΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΓΕΩΡΓΙΑ. ΕΝΑ 10% ΤΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΠΡΟΗΛΘΕ ΑΠΟ ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ ΑΦΡΙΚΗΣ ΚΑΙ 7% ΑΠΟ ΧΩΡΕΣ ΤΗΣ Α. ΕΥΡΩΠΗΣ ΕΝΑΣ ΑΣΘΕΝΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΓΑΛΛΙΑ ΚΑΙ ΕΝΑΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΣΙΑ. ΓΙΑ ΤΡΕΙΣ ΔΕΝ ΥΠΗΡΧΑΝ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

| Patient's Origin         | Age (mean)*<br>(range) |
|--------------------------|------------------------|
| Native born Greeks       | 50,8 ± 17<br>(32-84)   |
| Immigrants/ Foreign born | 34 ± 15.7<br>(1.5-61)  |

\*p=0.002 (t-test)

28

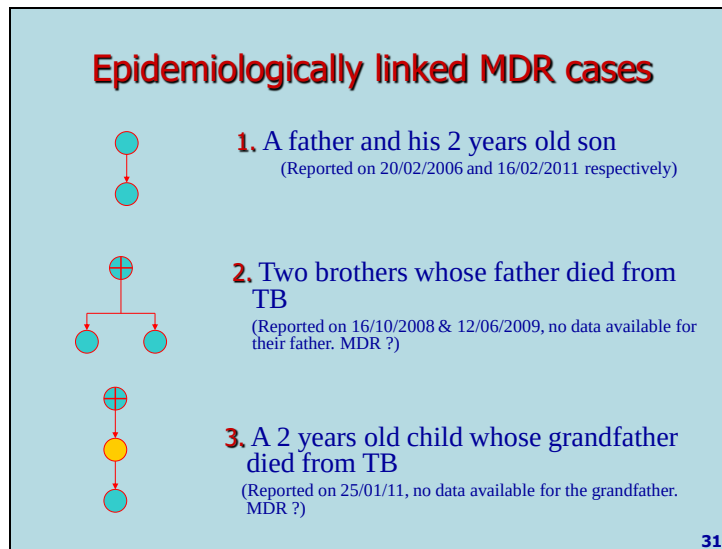
Η ΜΕΣΗ ΗΛΙΚΙΑ ΤΩΝ ΕΛΛΗΝΩΝ ΗΤΑΝ ΤΑ 51 ΧΡΟΝΙΑ ΚΑΙ ΤΩΝ ΞΕΝΩΝ ΤΑ 34  
ΑΥΤΟ ΤΟ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΟ, ΔΗΛΑΔΗ ΟΙ ΜΙΚΡΟΤΕΡΕΣ ΗΛΙΚΙΕΣ ΤΩΝ ΞΕΝΩΝ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΟΥΣ ΓΗΓΕΝΕΙΣ, ΑΦΟΡΑ ΚΑΙ ΤΟΥΣ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΕΥΑΙΣΘΗΤΗ ΝΟΣΟ

| <b>RISK FACTORS</b>                         |           |
|---------------------------------------------|-----------|
| <b>PREVIOUS THERAPY</b>                     | <b>14</b> |
| <b>CONTACT TB</b>                           | <b>4</b>  |
| <b>CONTACT TB + PREVIOUS THERAPY</b>        | <b>3</b>  |
| <b>IMMUNOSUPPRESSION</b>                    | <b>3</b>  |
| <b>IMMUNOSUPPRESSION + PREVIOUS THERAPY</b> | <b>1</b>  |
| <b>DIABETES MELITUS</b>                     | <b>1</b>  |
| <b>HEALTH CARE WORKER</b>                   | <b>2</b>  |
| <b>PRISON</b>                               | <b>1</b>  |
| <b>PRISON + IV DRUGS</b>                    | <b>1</b>  |
| <b>DATA NOT AVAILABLE</b>                   | <b>24</b> |

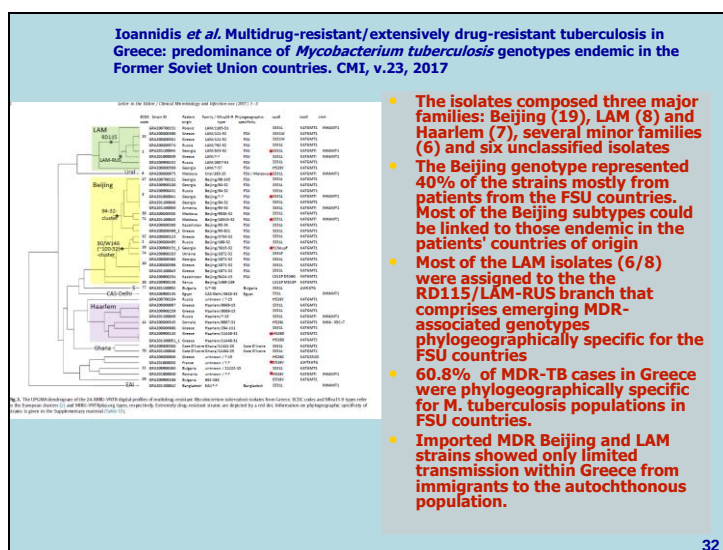
Η ΠΡΟΗΓΟΥΜΕΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ Η ΕΠΑΦΗ ΜΕ ΑΣΘΕΝΗ ΜΕ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΗΤΑΝ ΟΙ ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΕΙΧΑΜΕ ΚΑΙ ΔΥΟ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΥΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ  
ΟΙ ΕΡΓΑΖΟΜΕΝΟΙ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ ΑΝΗΚΟΥΝ ΟΠΩΣ ΕΙΝΑΙ ΦΥΣΙΚΟ ΣΕ ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΥΨΗΛΟΥ ΚΙΝΔΥΝΟΥ



ΟΙ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ ΠΟΛΥΑΝΘΕΚΤΙΚΗ ΦΥΜΑΤΙΩΣΗ ΔΙΕΜΕΝΑΝ Ή ΔΙΑΓΝΩΣΤΗΚΑΝ ΣΕ ΣΧΕΔΟΝ ΟΛΑ ΤΑ ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΑ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΧΩΡΑΣ ΜΕ ΤΟΝ ΜΕΓΑΛΥΤΕΡΟ ΑΡΙΘΜΟ ΣΤΗΝ ΑΘΗΝΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΣΥΝΕΧΕΙΑ ΣΤΗΝ ΜΑΚΕΔΟΝΙΑ ΚΑΙ ΤΗΝ ΘΡΑΚΗ



ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΣΤΗΝ ΧΩΡΑ ΜΑΣ ΔΕΝ ΥΠΗΡΧΑΝ  
ΕΤΣΙ ΤΟ ΜΟΝΟ ΣΤΟΙΧΕΙΟ ΕΠΑΦΗΣ ΑΦΟΡΟΥΣΕ ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΠΡΩΤΟΥ ΒΑΘΜΟΥ  
ΥΠΗΡΧΑΝ ΤΡΕΙΣ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΠΙΘΑΝΟΤΑΤΗΣ ΕΝΔΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΗΣ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ



Η γονοτυπική ανάλυση κατέταξε μαζί –ανά ζεύγη- όπως ήταν και το ανεμενόμενο, τα στελέχη των συγγενών, επιβεβαιώνοντας την ενδο-οικογενειακή διασπορά. Συνολικά τα 46 στελέχη, για τα οποία υπήρξαν αξιοποιήσιμα MIRU/VNTR αποτελέσματα, κατατάχτηκαν κυρίως στις 3 μεγάλες υπο-οικογένειες, την Beijing και τις δυο Ευρωπαϊκές LAM & Haarlem. Τα στελέχη που απομονώθηκαν από το ξένους ασθενείς είχαν συσχέτιση με κλώνους που κυκλοφορούν στις χώρες προέλευσης τους, το 60% με κλώνους με προέλευση/εντοπισμό χώρες της πρώην Σ.Ε. Αν τα δημογραφικά δεδομένα ήταν απολύτως σωστά, δεν φαίνονταν να υπάρχει ή υπήρχε μόνο μικρή διασπορά τους από τους ξένους στους γηγενείς. Φυσικά, όπως όλες αυτού του είδους οι μελέτες, αποτυπώνει μια «φωτογραφία» του προβλήματος την δεδομένη περίοδο.

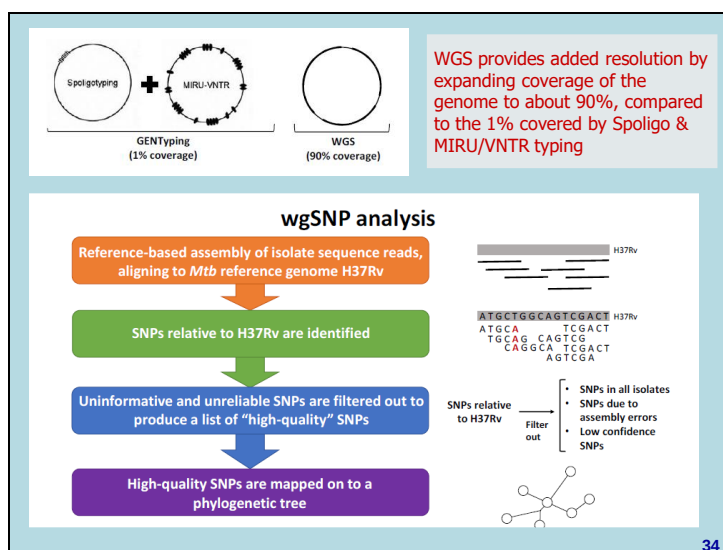


## WGS and Molecular epidemiology

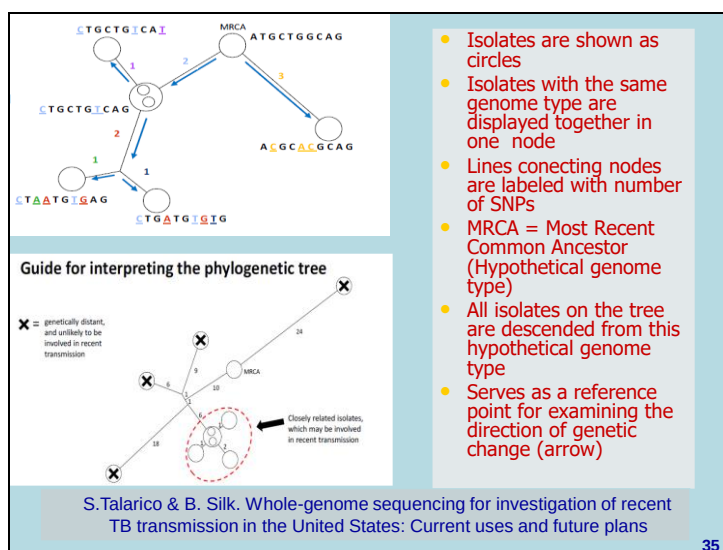
- The data generated from WGS allows for unparalleled ability to detect genetic variation in *M. tuberculosis*.
- The relatedness of *M. tuberculosis* genomes can be estimated by comparing whole genome Single Nucleotide Polymorphism (wgSNPs) differences between the isolates.
- Isolates with the smallest number of SNPs differences or shortest SNP distance would be linked, possibly representing a transmission event or cluster

33

Η αλληλουχοποίηση όλου του γονιδιώματος μας δίνει την δυνατότητα να έχουμε την απόλυτη εικόνα της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των στελεχών. Με τις μεθόδους του NGS μπορεί να γίνει πλέον «Molecular marker» όλο γονιδίωμα και η σύγκριση μεταξύ των στελεχών μπορεί να γίνεται με ανάλυση wgSNPs (whole genome Single Nucleotide Polymorphisms). Στελέχη με τη μικρότερη διάφορα σε SNPs μπορούν να θεωρηθούν ότι ανήκουν στο ίδιο cluster και πιθανώς δείχνουν μετάδοση μεταξύ των ασθενών από τους οποίους αυτά απομονώθηκαν.



Στην πράξη παίρνουμε πληροφορία από ~ 90% του γονιδιώματος, μιας και αφαιρούνται περιοχές δύσκολες για αλληλουχοποίηση, όπως π.χ. αυτές με επαναλαμβανόμενα στοιχεία. Σε σχέση με την πληροφορία που υπάρχει στο ~ 1% του γονιδιώματος που αναλύεται με το SpoligoTyping και τα MIRU/VNTRs η διαφορά είναι φυσικά τεράστια. Οι αλληλουχίες που παίρνουμε αντιπαραβάλλονται με την αλληλουχία συγκεκριμένου στελέχους αναφοράς – του H37Rv - εντοπίζονται τα SNPs, «ξεκαθαρίζονται» τα ακατάλληλα (π.χ. SNPs λόγω πιθανής χαμηλής αξιοπιστίας κατά την αλληλοχοποίηση) και οι υψηλής πιστότητας πολυμορφισμοί χρησιμοποιούνται για να αποκαλυφθούν οι φυλογενετικές συσχετίσεις.



Τα δεδομένα μπορούν να αποτυπωθούν (και) με την μορφή που φαίνεται στην διαφάνεια. Ο κάθε κύκλος αντιστοιχεί σε ένα περιστατικό. Πολλά περιστατικά με τον ίδιο γονότυπο περικλείονται από ένα μεγαλύτερο κύκλο. Τα περιστατικά συνδέονται με γραμμές, με μέγεθος ανάλογο του αριθμού των SNPs κατά τον οποίο διαφέρουν (ο αριθμός αναγράφεται πάνω στην γραμμή). Ένα υποθετικό γονιδίωμα/στέλεχος από το οποίο έχουν προέλθει όλα τα στελέχη του δέντρου (Most Recent Common Ancestor) χρησιμοποιείται ως σημείο αναφοράς για να αποτυπωθεί η κατεύθυνση των γενετικών αλλαγών. Περιστατικά με τον ίδιο γονότυπο ή μικρό αριθμό SNPs θεωρούνται ότι ανήκουν σε κλωνική διασπορά του ίδιου στελέχους. Επειδή τα SNPs στο σύνολο του γονιδιώματος εμφανίζονται πιο συχνά από ότι οι αλλαγές σε markres όπως π.χ. τα MIRU-VNTR τίθεται το ερώτημα στα πόσα SNPs πρέπει να μπει το cut-off για να θεωρούνται δυο περιστατικά ως κλωνικά σχετιζόμενα.

Articles

Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study

Timothy M Walker<sup>1</sup>, Caroline L Cyp<sup>2</sup>, Mark H Korman<sup>3</sup>, Jason T Evans, George Kourou, Martin J Dedering, David W Eise, David Wilson, Peter M Hawkey, Dennis W Cook, Julian Parkhill, David Hoare, A Sarah Walker, Rory Bowden, Philip Morris, J Graeme Smith, Tim J A Post

**Measured pairwise nucleotide differences within hosts**

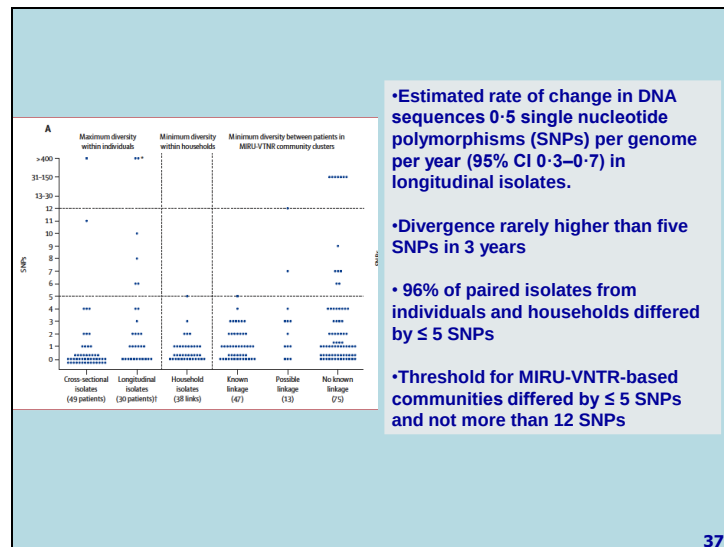
- **Cross-sectional:** 50 paired pulmonary & extrapulmonary isolates
- **Longitudinal :** 100 isolates, preferentially from patients with the largest intervals between samples

**and between hosts**

- **Household:** 90 isolates (70 patients, 27 households)
- **Community:** 217 isolates (168 patients, 11 clusters)

36

Οι Timothy Walker et al. ακολούθησαν την εξής προσέγγιση για να υπολογίσουν τον ρυθμό μεταλλαξογένεσης και την σχέση μεταξύ κλωνικά σχετιζόμενων στελεχών. Μέτρησαν τον αριθμό των SNPs μεταξύ ζευγαριών στελεχών που απομονώθηκαν από το ίδιο ασθενή αλλά από διαφορετικά ανατομικά σημεία ή από τον ίδιο ασθενή αλλά σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Επίσης από στελέχη απομονωμένα από δύο ή περισσότερα κρούσματα εντός της ίδιας οικογένειας και τέλος από στελέχη διαφορετικών ασθενών που όμως επιδημιολογικά αλλά και με ανάλυση MIRU-VNTR σχετίζονταν. Οι δύο τελευταίες κατηγορίες ασθενών ήταν αυτές στις οποίες η κλασική επιδημιολογία και οι προηγούμενες γονοτυπικές προσεγγίσεις θεωρούσαν ότι ο ένας ασθενής είχε μεταδώσει την νόσο στον άλλο. Με πιο ισχυρή βέβαια την επιδημιολογική συσχέτιση στα ενδο-οικογενειακά περιστατικά.



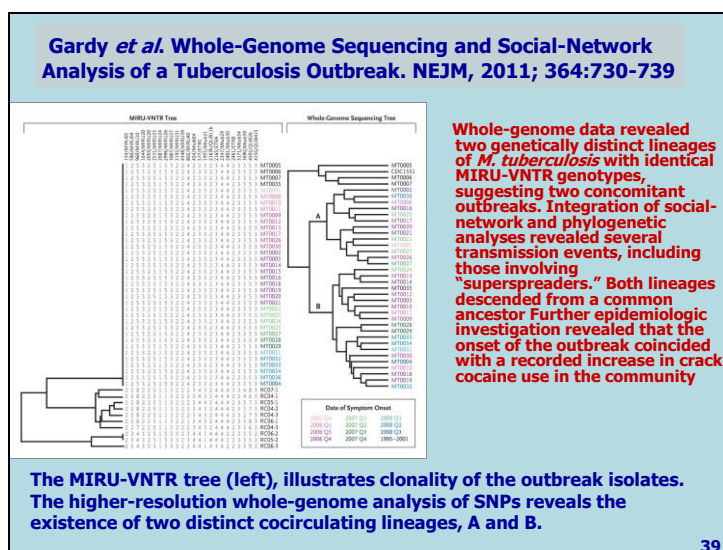
Μπόρεσαν έτσι να εκτιμήσουν τον ρυθμό της μεταλλαξογένεσης στους 0.5 πολυμορφισμούς ανά έτος ανά γονιδίωμα, επιβεβαιώνοντας την μεγάλη γενετική σταθερότητα που εμφανίζει το μυκοβακτηρίδιο. Τα ζεύγη των στελεχών από τον ίδιο ασθενή ή από ενδοοικογενειακή διασπορά διέφεραν σε λιγότερα από 5 SNPs και πάντως όσα συσχετίζονταν μεταξύ τους στο ίδιο MIRU-VNTR cluster, σε όχι περισσότερα από 12 SNPs. Η μελέτη αυτή έθεσε και τα όρια που χρησιμοποιούνται για να θεωρηθούν ότι δυο στελέχη σχετίζονται κλωνικά και είναι συνήθως τα  $\leq$  από 5 SNPs και πάντως πάντα  $\leq$  από 12 SNPs. Χωρίς βέβαια αυτά να θεωρούνται τα τελειωτικά ή απόλυτα.

Meehan CJ *et al.* The relationship between transmission time and clustering methods in *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. **EBioMedicine**. 2018

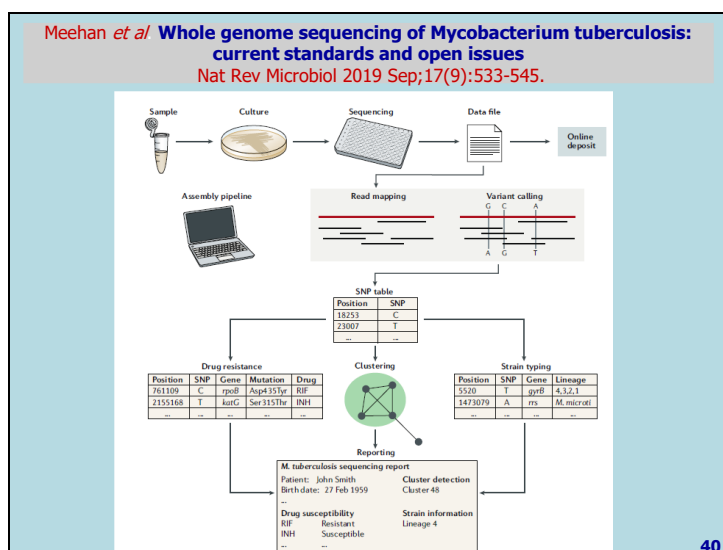
"Our results suggest that clusters based on Spoligotyping could encompass transmission events that occurred almost 200 years prior to sampling while 24-loci-MIRU-VNTR often represented three decades of transmission. Instead, WGS based genotyping applying low SNP or cgMLST allele thresholds allows for determination of recent transmission events, e.g. in timespans of up to 10 years for a 5 SNP/allele cut-off."

38

Μελέτη 324 στελεχών που απομονώθηκαν στο Κονγκό και η οποία χρησιμοποίησε ως gold standard την ανάλυση με WGS για να διερευνήσει ποια είναι η διακριτική ικανότητα των μεθόδων Spoligotyping και MITRU/VNTR κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η μεν πρώτη μπορεί να διακρίνει γεγονότα που ίσως συνέβησαν 200 και χρόνια πριν ή δε δεύτερη πριν 3 και δεκαετίες. Αντίθετα χρησιμοποιώντας ως cut-off τα 5 SNPs εκτιμήθηκε ότι μπορούμε να «δούμε» γεγονότα μετάδοσης μεταξύ ασθενών 10 και χρόνια πριν. Και ακόμη πιο πρόσφατα στα ~ 4 χρόνια αν μειωθεί το cut-off στο 1 SNP



Υπάρχουν πολλές μελέτες μοριακής επιδημιολογικής ανάλυσης με την χρήση του WGS . Παρατίθενται ενδεικτικά τα δεδομένα από μία εξ αυτών , για να δειχτεί ακριβώς η πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα που προσφέρει το βάθος της ανάλυσης με WGS, που στην προκειμένη περίπτωση συνδυάστηκε και με τη κλασική επιδημιολογική διερεύνηση. Στελέχη που η ανάλυση με MIRU-VNTR τα κατέτασσε στο ίδιο επεισόδιο κλωνικής επιδημικής έξαρσης, αποδείχθηκε ότι ήταν αποτέλεσμα της διασποράς δύο διακριτών κλώνων, με σχετικά πρόσφατο, βέβαια, πρόγονο, που διασπείρονταν παράλληλα κατά την ίδια χρονική περίοδο των 3 ετών που κράτησε η επιδημική έξαρση τους. Ο συνδυασμός των γονοτυπικών δεδομένων με ανάλυση των επαφών των ασθενών, υπέδειξε ένα κοινωνικό-οικονομικό παράγοντα ως υπαίτιο – την αύξηση της χρήσης κρακ στην συγκεκριμένη περιοχή και περίοδο και το αντίστοιχο «δίκτυο» χρηστών/διακινητών και συγχρωτισμού για χρήση - και αποκάλυψε δύο άτομα σαν τη πιθανή πηγή της διασποράς κάθε κλώνου και τα οποία «έδρασαν» σαν superspreaders . Τα δεδομένα αυτά που προέρχονται από αναδρομική μελέτη δείχνουν και την δύναμη που μπορεί να έχει η μοριακή επιδημιολογική διερεύνηση με την χρήση του WGS, επειδή α) φτάνει στο απόλυτο της αναλυτικής ικανότητας και βέβαια β) όταν δουλεύει, σε πραγματικό χρόνο, και όχι αναδρομικά, μπορεί να καθοδηγήσει προληπτικές παρεμβάσεις, να ανιχνεύσει έγκαιρα νέα κλωνικά σχετιζόμενα περιστατικά, να βρει και να «σπάσει» την αλυσίδα της μετάδοσης



Να τελειώσουμε με την εικόνα στην διαφάνεια που δείχνει την μορφή που θα πάρει – και ήδη σε ορισμένες χώρες έχει πάρει – η ροή της δουλειάς στο διαγνωστικό εργαστήριο, με την εισαγωγή των μεθοδολογιών του WGS και τα αναμενόμενα οφέλη της τόσο στη κλινική πράξη όσο και την δημόσια υγεία. Μετά την θετικοποίηση ολιγοήμερης υγρής καλλιέργειας του κλινικού δείγματος, εξάγεται το βακτηριακό DNA και γίνεται WGS. Η αλληλουχίες με το κατάλληλο λογισμικό αντιπαραβάλλονται με το γονιδίωμα αναφοράς προτύπου στελέχους MTB. Η ανάλυση της γενετικής πολυμορφίας που αποκαλύπτεται - με την μορφή των wgSNPs – με την χρήση των κατάλληλων βάσεων δεδομένων δίνει πληροφορία για την τυποποίηση του στελέχους, την ένταξη του ή όχι σε κάποιο επεισόδιο επιδημικής διασποράς συγκρινόμενο με τα προηγούμενα στελέχη στην βάση δεδομένων και τέλος καθοδηγεί την κλινική πράξη για εξατομικευμένη θεραπευτική αγωγή, στηριζόμενη στην ενδεχόμενη παρουσία μεταλλάξεων που ενέχονται στην ανάπτυξη αντοχής σε Α/Φ.