

Informe final publicable de proyecto

Generación de un sistema económico de tipificación molecular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y su implementación en cepas aisladas en el país.

Código de proyecto ANII: FMV_3_2018_1_148367

01/06/2021

GREIF CARÁMBULA, Gonzalo (Responsable Técnico - Científico)

BENTANCOR, Maria Noel (Investigador)

COITINHO AZEVEDO, Cecilia Esther (Investigador)

HURTADO, Joaquin (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

Resumen del proyecto

La Tuberculosis es la primera causa de muerte por un agente infeccioso en el mundo (desplazado provisoriamente por el COVID-19), provocando 1,7 millones de fallecidos anualmente. En Uruguay se observa un incremento de los casos desde 2006, con una incidencia en la población general de 30 casos en 100.000 habitantes. Esta incidencia puede aumentar más de 50 veces en determinadas poblaciones (personas privadas de libertad, personas HIV positivas, etc.).

Conocer cuáles son las cepas de Mycobacterium tuberculosis que circulan en el país es una herramienta de gran importancia para identificar la aparición de brotes, detectar resistencia a fármacos y prevenir el aumento del número de casos de la enfermedad.

A través del presente proyecto se generó una herramienta que permite la tipificación y análisis de resistencia de aislados de Mycobacterium tuberculosis mediante amplificación y secuenciación de regiones específicas de su genoma. Utilizando esta nueva herramienta, realizamos la tipificación y análisis de resistencia a fármacos anti-tuberculosis de 49 aislados del sistema penitenciario (SP) comparando con las cepas que circulan en la población general en los últimos años.

A partir de dicho análisis no se detectaron casos de resistencia a los principales fármacos utilizados en el control de la enfermedad. Por otra parte, se encontró la presencia de una cepa particular representada de forma significativa en el SP con muy baja circulación a nivel comunitario (32% vs 1% de muestras del linaje X). Resulta interesante observar, que cerca del 36% de las cepas aisladas al ingreso al SP son precisamente de esta cepa, sin embargo en todo los casos se trata de personas con antecedentes que probablemente hayan adquirido la cepa en estadías anteriores en el SP.

El sistema desarrollado permitirá realizar un seguimiento epidemiológico tanto en el SP como en la población general, así como determinar resistencia a fármacos anti-TB.

Ciencias Médicas y de la Salud / Biotecnología de la Salud / Tecnologías que involucran la identificación de ADN, proteínas y enzimas / Epidemiología Molecular

Palabras clave: Tuberculosis / Epidemiología molecular / Salud /

Introducción

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infectocontagiosa granulomatosa crónica, causada por Mycobacterium tuberculosis, localizada generalmente en el pulmón, pudiendo afectar otros órganos. Se transmite básicamente de persona a persona por inhalación de aerosoles contaminados por el bacilo. Aunque se trata de una enfermedad curable y que puede ser prevenida, la TB se encuentra entre las primeras 10 causas de muerte a nivel mundial, y la primera causa de muerte por un agente infeccioso (superando en el año 2017 al VIH y actualmente superada por el Sars-cov2). En 2019 se registraron aproximadamente 10 millones de casos nuevos y 1,4 millones terminaron en la muerte del paciente. Finalmente, se estima en 490.000 el número de casos que presentaron multi-resistencia a fármacos (MDR) [1]. El hacinamiento, la malnutrición, el SIDA, el abuso de psicotrópicos y las malas condiciones de vida disminuyen la inmunidad y favorecen el contagio, aumentando la probabilidad de la aparición de la enfermedad.

En Uruguay, la incidencia reportada para el año 2019 fue de 30 por 100.000 habitantes (promedio en el país), alcanzando en Montevideo una tasa de 38/100.000 habitantes. A través del Programa de Control de la Tuberculosis, la Comisión Honoraria de Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes logró en 2006 el menor registro de incidencia en el país de 17 casos cada 100.000 habitantes, sin embargo desde ese año la incidencia comenzó un aumento sostenido. Inciden en el fenómeno el aumento de poblaciones vulnerables: personas privadas de libertad (PPL) (incidencia 40 veces superior a la población general), habitantes de zonas marginales (donde las tasas son cercanas a 50 por 100.00 habitantes) y personas viviendo con VIH (incidencia 65 veces superiores a la población general). Cuando parecía acercarse la posibilidad de eliminación de la enfermedad en nuestro medio, aparecieron nuevos "bolsones" de TB refractarios al control, convirtiendo nuevamente la TB en un problema de salud pública.

En el contexto regional, el país se encuentra cerca del promedio de incidencia en América (27 casos/100.000 habitantes) posicionando a Uruguay en la franja media-alta de incidencia de TBC

Países europeos como Alemania y Bélgica han visto incrementada la incidencia de TB en los últimos años [2]. Y la desatención en la asistencia, diagnóstico y tratamiento, producida por la pandemia del nuevo coronavirus, empeora aún

más el panorama.

Considerado globalmente, en el mundo se ha registrado un descenso tanto de la incidencia como de la mortalidad debido a la Tuberculosis, aunque existe consenso de que esta mortalidad continúa siendo inaceptablemente elevada. Por este motivo, y porque la TBC no ha dejado de ser un importante problema de salud a nivel mundial, la OMS ha trazado objetivos para tratar de abatir estas cifras de manera significativa para los próximos años lanzando la nueva estrategia mundial llamada END TB 2015 – 2035, cuya visión es un mundo sin TB y su objetivo poner fin a la epidemia mundial de TB. La Estrategia Fin a la TB tiene como objetivo poner fin a la epidemia mundial de tuberculosis reduciendo el número de muertes en un 95% y la tasa de incidencia en un 90% entre 2015 y 2035 y consiguiendo que ninguna familia tenga que hacer frente a gastos catastróficos debido a la tuberculosis

La resolución adoptada por la Asamblea Mundial de la Salud insta a los Estados Miembros a que adapten la estrategia y la pongan en práctica, aportando la financiación necesaria y un compromiso de alto nivel. Se pone especial atención en el servicio a las poblaciones más vulnerables a la infección y con mal acceso a la atención sanitaria, como los migrantes.

La Estrategia End TB se basa en 4 Principios:

1. Rectoría y rendición de cuentas por los gobiernos, con monitorización y evaluación.
2. Coalición sólida con las organizaciones de la sociedad civil y las comunidades.
3. Protección y promoción de los derechos humanos, la ética y la equidad.
4. Adaptación nacional de la estrategia y las metas, con colaboración mundial.

Además, se establecieron 3 Pilares fundamentales:

1. Atención y prevención integradas y centradas en el paciente.
2. Políticas audaces y sistemas de apoyo.
3. Intensificación de la investigación y la innovación.
 - a. Descubrimiento, desarrollo y aplicación rápida de nuevos instrumentos, intervenciones y estrategias.
 - b. Investigación para optimizar la aplicación y el impacto, y fomentar las innovaciones.

Este proyecto se enmarca en el pilar número 3 de la Estrategia mundial End TB.

En este contexto es necesario llevar adelante mejoras en los programas de control de la TB. En este sentido la vigilancia epidemiológica tradicional así como la inclusión de la epidemiología molecular ha aportado información de gran utilidad respecto de la transmisión de la enfermedad [3][4].

La epidemiología molecular a través de la tipificación o genotipado permite estudiar la estructura de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTBC) que comprende distintos linajes filogenéticos caracterizados por diferencias en la distribución geográfica, inmunogenicidad, virulencia y resistencia a drogas. Los datos del genotipado aportan información capital acerca de identificación de cepas emergentes, vigilancia epidemiológica, discriminación entre recaída y reinfección, desarrollo de nuevas pruebas diagnósticas, y en última instancia contribuirán a un mejor control de la enfermedad.

El genotipado permite también la comparación de familias de *M. tuberculosis* en las grandes bases de datos internacionales existentes, y de este modo detectar y controlar brotes amplios que podrían no identificarse adecuadamente en estudios de ámbito local.

Un ejemplo evidente de la necesidad de este tipo de estudios se puede observar en los análisis epidemiológicos que se llevan a cabo en algunos países y que permiten diseñar políticas específicas contra la tuberculosis [3,4]. Es importante poder distinguir si, en un área determinada, la afectación de la población por la tuberculosis se debe a una infección reciente o a la reactivación de una tuberculosis latente. Si en efecto, los casos por infección reciente son significativos, deben intensificarse las medidas de búsqueda de casos y su tratamiento. Si por el contrario, la causa principal es la reactivación de TB, se deberán, por ejemplo, ampliar las medidas de quimioprofilaxis [5][6].

Es importante que se conozcan qué cepas son las que predominan en nuestra comunidad, así como determinar como se transmiten e identificar los grupos vulnerables, ello exige la realización de este tipo de estudios a nivel nacional.

En nuestro laboratorio hemos puesto a punto los sistemas mundialmente utilizados para la tipificación de las cepas (MIRU-VNTR y Spoligotyping) en el marco de colaboraciones con la CHLA-EP. Resultados preliminares de la tipificación de las

cepas de poblaciones particulares como las obtenidas en el marco del proyecto FSS_X_2016_1_127692, comienzan a mostrar la importancia de contar con estos métodos para todas las cepas aisladas en el país. Un trabajo reciente publicado por nuestro grupo mostró resultados de la tipificación de cepas aisladas de pacientes de Cuidados Intensivos y la comparación de cepas circulantes en la comunidad [7]. En dicho trabajo se evidencia la una distribución diferente de los genotipos de ambas poblaciones. Si bien, los métodos de tipificación se encuentran disponibles en la actualidad, se trata de métodos que requieren alto entrenamiento, un tiempo elevado para obtener resultados y un costo elevado por muestra. Asimismo, es limitado el número de muestras que puede procesarse en simultáneo. También se han desarrollado métodos alternativos basados en el spoligotyping que podrían ser más económicos y rápidos [8] pero que implicaría un inversión alta en equipamiento no disponible en el país.

En este proyecto se planteó la realización de un sistema de tipificación de cepas mediante secuenciado masiva de fácil implementación y económicamente accesible, de modo de permitir la tipificación de las cepas de TB aisladas en el país. Durante el transcurso del proyecto se realizaron cambios a la propuesta inicial incorporando además la posibilidad de detectar mutaciones de resistencia a fármacos antituberculosis (en particular los más utilizados –fármacos de primera línea- y los que son utilizados en caso de resistencia a estos –fármacos de segunda línea-).

Inicialmente, al comienzo del proyecto, el objetivo principal consistía en la generación de una alternativa a la tipificación molecular de cepas de TB basado en el spoligotyping utilizando la tecnología de Illumina MiSeq, en lugar de la hibridación en membrana. El proyecto fue re-estructurado, para obtener resultados más consistentes, incorporando la tipificación mediante polimorfismos de nucleótido simple [9]. Asimismo, en una temprana etapa, se incorporó el diseño de cebadores que permitieran la detección de mutaciones en genes asociados a resistencia a fármacos.

Particularmente se diseñaron cebadores para amplificación en multiplex (12 regiones de tipificación y 8 genes completos asociados a resistencia a fármacos).

A partir de dichos multiplex, se realizan bibliotecas para secuenciado profundo (esta etapa permite la realización de varias muestras en simultáneo incorporando secuencias tipo barcode. Luego se realizará un análisis bioinformático analizando la presencia/ausencia de SNP en las regiones de tipificación y también buscando mutaciones conocidas asociadas a resistencia a fármacos. También durante el transcurso del proyecto, surgieron alternativas bioinformáticas disponibles online que posibilitan una transferencia más sencilla del sistema generado a la CHLAT sin necesidad de realizar capacitaciones en bioinformática específicas que resultan en cuellos de botella a la hora de procesar los datos.

Para la validación del método contamos con algunas poblaciones tipificadas [10], cepas de referencia y otras muestras ya tipificadas por los métodos convencionales.

En el transcurso del proyecto, se realizó la tipificación de los aislados de SP del año 2019 (47 cepas) y se compararon las cepas circulantes con datos previos de nuestro grupo de las cepas circulantes de la comunidad. Esta tipificación permitió realizar un primer diagnóstico de la situación de cepas circulantes en los centros penitenciarios. La importancia de contar con los datos de las cepas circulantes en el sistema penitenciario, se debe a que se ha postulado que estas instituciones pueden actuar como amplificadores de TB y TB resistente en la población. Esta hipótesis sugiere que Las condiciones carcelarias junto con una alta incidencia de TB podrían actuar como un amplificador de la epidemia que terminara impactando en la comunidad, por fuera del SP [11].

Realizar un análisis prospectivo de las cepas circulantes, por ejemplo comunidad vs SP, podría permitirnos probar dicha hipótesis, diseñar y medir el impacto de nuevas medidas específicas de control TB.

La obtención de datos de tipificación de todas las cepas aisladas en 2017 es el primer paso para determinar el estado de situación actual de los aislados que circulan en el país. Se trata del primer mapeo que no solamente involucra un brote en particular [10,12] o una población de interés (Proyecto FSS_X_2016_1_127692), sino que abarca todos los aislados de un año constituyendo un aporte fundamental para el Programa de Control de la Tuberculosis. Si bien inicialmente se planteó la realización de la tipificación de todos los aislados de la comunidad, la misma no pudo realizarse.

Si bien el método que se desarrolló puede ser transferido e implementado por el laboratorio de la CHLA-EP, los costos aún hacen pensar en utilizar la herramienta para análisis de poblaciones particulares (como la llevada a cabo en este proyecto) o el análisis de brotes o casos particulares. En este sentido, tanto realizando la secuenciación por el método desarrollado, como la generación de bibliotecas de genoma completo ya puede ser transferido al laboratorio para realizar análisis retrospectivos que se requieran (considerando que se cuenta con el banco de ADN de todas las cepas aisladas en el país desde el año 2010 en el laboratorio de la CHLA-EP). Asimismo, permite tener una herramienta para ser aplicada a

futuro (dado la continua disminución de costos y el mayor acceso a las tecnologías de secuenciación en el país) en todos los nuevos aislados de cepas de TB. Se trata de una información relevante para un mejor control de la enfermedad identificando, por ejemplo, tempranamente posibles brotes de rápida dispersión (como el publicado por nuestro grupo en 2014) [10].

Como ya fue mencionado el objetivo general del proyecto fue el diseño, puesta a punto y validación de un método de tipificación molecular de cepas de *M. tuberculosis* que pueda ser utilizado por el sistema de salud para realizar epidemiología molecular de la enfermedad producida por este patógeno. Para el servicio de laboratorio de la CHLA-EP constituye una herramienta poderosa que brindará información que en la actualidad no es posible obtener para todos los aislados.

La principal ventaja del sistema de tipificación que se puso a punto en el presente proyecto es que puede ser fácilmente adoptado por el sistema de salud y realizar la tipificación de cepas a un costo razonable. Aunque la estimación inicial indicaba un costo menor (considerando la realización de muchas muestras por corrida), el costo finalmente obtenido procesando entre 10 y 20 muestras por corrida –más cercano a la posibilidad actual- indica un costo por muestra de aprox. 50 USD (vs un costo aprox. de 75 USD por genoma completa). En el primer caso se obtiene una información parcial aunque incluye la mayoría de las mutaciones asociadas a los principales fármacos y permite tipificar las cepas. Por otra parte este costo disminuye al no ser necesaria una cobertura de todo el genoma y se puede obtener la información necesaria con menor cantidad de secuencias lo que redundará en una disminución de costos. La ventaja obvia de obtener todo el genoma es contar con la información total con la posibilidad de encontrar nuevas mutaciones o buscar mutaciones que se asocien a posteriori de la realización de la secuenciación.

Es importante mencionar que las últimas recomendaciones de la OMS son la confirmación por secuenciación de las mutaciones asociadas a resistencia cuando la misma es detectada por otro método (ya sea fenotípico o molecular – GenXpert-).

Metodología/diseño del estudio

Muestras:

Para realizar la metodología propuesta, se utilizó de ADN genómico del banco que posee el laboratorio de Biología Molecular de la CHLA-EP. Brevemente, de cada cepa aislada en el laboratorio se realizan cultivos por métodos estandarizados (Löwenstein-Jensen, Ogawa y MGIT). A partir de los cultivos se realiza extracción de ADN genómico de acuerdo al protocolo previamente reportado [13].

Obtención de Multiplex PCR:

Se diseñaron cebadores que amplifican 12 regiones de discriminación de linaje y 8 genes asociados a resistencia a fármacos anti-tuberculosis. Se utilizaron los programas ppDesigner y PrimerPooler y luego una curación manual para realizar el diseño teniendo en cuenta la posibilidad de amplificación de varios amplicones un único tubo. Finalizado el proyecto y como oportunidad de mejora planteamos la posibilidad de agregar cebadores que permitan una mejor resolución dentro del linaje 4 y retirar cebadores que discriminan otros linajes cuya frecuencia en el país es prácticamente nula.

La puesta a punto incluyó la realización de diversas combinaciones de cebadores, evaluación de concentración de los mismos y evaluación de diferentes mezclas de reacción que permitiera la amplificación de todos los fragmentos incluidos en el multiplex.

Estrategia de preparación de bibliotecas:

Para cumplir el objetivo planteado en el proyecto se planteó la generación de bibliotecas de secuenciación compatibles con la tecnología Illumina.

En una segunda ronda de amplificación, se adicionan las secuencias que permiten mezclar diferentes muestras en una misma corrida de secuenciación (Barcoding o multiplexado). Para ello se utilizarán cebadores ofrecidos comercialmente por Illumina. Estos kits contienen cebadores con secuencias que permiten combinaciones para multiplexar hasta 384 muestras en una corrida. Las bibliotecas son luego purificadas con kits comerciales con lo que quedan listas para ser secuenciadas.

Secuenciación de las bibliotecas generadas:

Las bibliotecas fueron secuenciadas en el secuenciador MiSeq Illumina disponible en el Instituto Pasteur. Debido a la rotura del equipo en 2020, y la imposibilidad de realizar la reparación debido a los problemas ocasionados por las restricciones de movilidad debido a la pandemia de Covid-19, se realizó la secuenciación de algunas bibliotecas mediante servicios en el exterior.

Análisis Bioinformático:

En primer lugar las secuencias son separadas de acuerdo a las secuencias de los barcoding utilizados para cada

biblioteca, obteniendo por cada cepa un archivo de secuencias en formato fastq. Este proceso lo realiza el software del equipo de secuenciación en su análisis primario de los datos.

En esta primera instancia se chequean también los parámetros de calidad de la corrida, normalmente se obtienen entre 10 y 20 millones de secuencias por corrida, con una calidad $Q > 30$ (Phred score [14]) en mayor al 95% de las bases secuenciadas. En el caso de realizar la secuenciación simultánea de 384 muestras (el máximo posible) en una corrida de 10 millones de secuencias PE2x75 (considerando una corrida con bajo número de secuencias), se obtendrían más de 20.000 secuencias por cepa (lo que representa una cobertura mayor a 150X para las regiones de interés secuenciadas –aprox. 20.000 nucleótidos-). En el caso de secuenciar genomas completos (4Mb), en una corrida de 10 millones de secuencias PE2x75, sólo se podrían secuenciar 2.5 genomas con ese nivel de cobertura.

El análisis posterior de las secuencias incluye un filtrado de calidad de las secuencias y eliminación de secuencias de adaptadores, para lo cual se utilizará el software Sickle [15]. Luego se realiza el mapeo de las secuencias sobre las regiones de interés utilizando Bowtie [16] y BWA [17]. Se analizará la presencia/ausencia de las regiones diferenciales mediante scripts desarrollados en el laboratorio. En el transcurso del proyecto se evaluaron programas informáticos online que realizan todas estas etapas y ofrecen informes tanto de tipificación como de resistencia (ej. www.phyresse.org [18] o www.ap.tbportals.niaid.nih.gov/). Ambas herramientas resultan de gran practicidad para personal no entrenado en bioinformática, ya que a partir de los datos crudos (archivos fastq), realizan el pipeline obteniendo un completo informe sobre tipificación y resistencia. Si bien, estos programas procesan genomas completos, a partir de las secuenciones realizadas en los multiplex específicos se obtienen los datos de resistencia y tipificación (aunque puede ser necesario actualizar fragmentos de amplificación que son evaluados de manera diferente en algunas herramientas).

Ventajas y desventajas del desarrollo realizado:

La principal ventaja de la técnica desarrollada es la posibilidad de dirigir la búsqueda de mutaciones y polimorfismos de regiones de interés sin necesidad de secuenciar el genoma completo. Esto por un lado, requiere un paso previo con una amplificación de varias regiones en un tubo (que si bien ha demostrado ser complejo y difícil de resolver, se logró optimizar) y la secuenciación masiva de bibliotecas realizadas a partir de dichos multiplex. Con esta estrategia se precisan mucha menor cantidad de secuencias por muestra para obtener la misma cobertura de las regiones de interés que la alternativa de realizar el genoma completo. Asimismo, el protocolo puede actualizarse incorporando nuevas regiones o sustituyendo regiones de tipificación más informativa que surgen de nuevos trabajos genómicos.

Una alternativa que comienza a utilizarse en países europeos a las técnicas de tipificación molecular convencionales consiste en la secuenciación de genomas completos (WGS). Aunque esta tecnología se utiliza de rutina en algunos países europeos, solo se realiza en el caso de cepas MDR. Asimismo la ECDC ha pospuesto la implementación del WGS hasta que las capacidades tecnológicas europeas se igualen y se hayan validado protocolos y nomenclaturas para la tipificación genómica de TB y la predicción de resistencia. Esto se debe a la limitada evidencia de la relación costo beneficio de realizar estudios rutinarios de WGS para la caracterización de brotes y estudios epidemiológicos [2,19].

Como desventaja respecto al WGS, podemos mencionar la presencia de mutaciones de resistencia en regiones no seleccionadas o la asociación de resistencia de nuevos fármacos aún no descrita.

Oportunidades de mejora de la metodología planteada:

Como mencionamos antes, la metodología propuesta presenta oportunidades de mejora y desarrollo a futuro. El principal cambio que proponemos es realizar la tipificación únicamente de cepas de linaje 4 (siendo que en todos nuestros trabajos previos y también en las tipificaciones realizadas para este trabajo son las únicas presentes en el país o las que circulan en la mayoría de la población) con un mayor nivel de profundidad y confianza.

Asimismo, se podrán incorporar nuevas regiones que aporten información sobre resistencia a nuevos fármacos o nuevas regiones que se asocien con resistencia a fármacos que se utilizan en la actualidad. Cabe destacar que la última directiva de la OMS respecto a la identificación de resistencia a fármacos, es la confirmación por secuenciación de las mutaciones asociadas a la misma [20].

Resultados, análisis y discusión

Resultados:

De acuerdo a los objetivos planteados en el proyecto, en primer lugar se realizó el diseño de cebadores para la amplificación de 12 regiones del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* que permiten la tipificación de los diferentes linajes genotípicos descritos en el complejo M. tuberculosis. Los mismos se detallan en el Anexo 1A. Tabla de regiones

amplificadas en cada multiplex.

Luego de realizar los análisis de los genotipos obtenidos, se resolvió mantener sólo aquellas regiones que discriminan dentro del linaje 4 (que circula en nuestro país), manteniendo 5 regiones dentro del multiplex (lpqC, fcoT, rpoC, mycP3 y ctpH).

También se realizó el diseño de cebadores para amplificar 9 regiones de interés relacionadas con resistencia a fármacos antituberculosis que se detallan a continuación (Anexo 1A. Tabla de regiones amplificadas en cada multiplex).

Las nueve regiones son amplificadas en un único tubo de reacción y cubre la búsqueda de las más comunes regiones que se asociación con los principales fármacos que se utilizan para el control de la TB, en particular Isoniazida, Rifampicina y Pirazinamida constituye el tratamiento inicial estándar.

Dichos fragmentos se amplifican en un único tubo de reacción (Anexo 1B. Resultado multiplex).

Luego de la estandarización, se logró la obtención de un protocolo que permite amplificar 14 regiones de interés en dos multiplex (Pool Linaje y Pool Resistencia). Se estandarizó la cantidad de cebadores de cada fragmento para obtener una representación pareja en la secuenciación.

Por cada aislado, los dos pooles se mezclan de forma equimolar para realizar una biblioteca por aislado. En este etapa se incorporan los cebadores de illumina para realizar la secuenciación, así como los barcode que permiten realizar la secuenciación de multiples aislados en una única corrida (Anexo 1C. Pipeline). Las bibliotecas fueron realizadas utilizando el kit Nextera XT (Illumina), siendo el paso más costoso del protocolo. Una vez realizado el control de calidad de las bibliotecas las mismas se secuencian mediante la tecnología illumina en corridas Paired-end 2 x 75 bases.

Luego de realizar la puesta a punto, para lo cual fue necesario realizar secuenciaciones en etapas hasta lograr obtener cobertura suficiente de cada región, se realizó una secuenciación de todos los aislados del año 2019 del Sistema Penitenciario (SP). Se obtuvo ADN del banco de cepas de la CHLA-EP de 49 aislados del SP, 28 corresponden a aislados que se detectan en el screening de ingreso al SP del área metropolitana. Únicamente 3 (10.7%) correspondían a personas que nunca estuvieron en el SP, siendo el restante 89.3% (25) aislados de personas que con ingresos previos. Por último 19 fueron detectadas dentro del mismo (PPL que consultaron con cuadro clínico compatible o fueron evaluados por ser contacto de TB).

A modo de validación del sistema desarrollado, se realizó el genoma completo de 5 cepas seleccionadas al azar de esta población. Tanto la tipificación como el análisis de resistencia mostró ser consistente con el método desarrollado en el presente proyecto (Anexo 1D. Muestras secuenciadas y validación).

Aunque falta la tipificación de algunas cepas, los resultados preliminares se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Distribución en porcentaje de los genotipos identificados de acuerdo a su lugar de origen, muestra bacteriológica provenientes del Sistema Penitenciario - Uruguay año 2019 Vs muestras bacteriológica provenientes de comunidad - Uruguay años 2016-2019. Datos preliminares

SP Comunidad

LAM (%) 28 60

X (%) 32 1

Haarlem (%) 17 35

S (%) 2 1

A det (%) 19 1

N(total) 47 95

Los resultados indican que en el SP circula en mayor proporción una cepa en particular (cepa X), la misma no se encuentra circulando en la comunidad, aunque relevamientos de circulación deben continuar realizándose para obtener datos a lo largo del tiempo. Una manera gráfica de observar los resultados se encuentra en el Anexo 1E. Gráficas de Tipificación.

Análisis y Discusión:

Un primer dato importante generado, consistió en determinar que los aislados en todos los casos eran sensibles a los fármacos para el tratamiento estándar de Tuberculosis. Si bien no se detectaron casos de Resistencia dentro del SP, esta información resulta muy valiosa para el seguimiento de estos pacientes ya que los mismos pueden ser tratados con el esquema estándar: Isoniacida/Rifampicina/Pirazinamida durante 2 meses. El resultado fue concordante con estudios de sensibilidad realizados previamente y con la respuesta clínico bacteriológica que tuvieron los pacientes. El desarrollo generado puede ser de importancia para ser aplicado en los ingresos para realizar tratamientos correctos y destinando a estas personas al módulo especial destinado a estos casos, para impedir la generación y diseminación de estas cepas dentro del SP, que debido a las condiciones de hacinamiento representaría un grave problema.

Los datos obtenidos de la tipificación por el sistema desarrollado y la comparación con datos de tipificación de cepas que circulan en la comunidad mostraron resultados inesperados respecto a la composición y diversidad de genotipos encontrados en ambas poblaciones.

En particular se encontró una cepa asociada al SP que no se encuentra circulando activamente en la comunidad. De acuerdo al análisis de tipificación realizado, la cepa X se encuentra en más del 30% de los aislados provenientes del SP (del año 2019) y su proporción es en el entorno del 1% en la comunidad. Asimismo, cuando se observan las cepas detectadas al ingreso al SP, la proporción de cepas X se mantiene superior al 30%, con la particularidad en este caso que todos los ingresos al SP con cepa X ya habían pasado antes por el mismo. En el caso de las otras cepas aisladas al ingreso, la situación puede ser similar, debido a que aprox. el 80% de la personas diagnosticadas con TB a su ingreso, ya tenían antecedentes penales.

Esto hace pensar en contagios intra-SP y que la diseminación en la comunidad es baja. Sin embargo, la ampliación del estudio a familiares, policías y otros actores del sistema puede revelar más datos sobre la dinámica de esta cepa. Este hallazgo y su análisis prospectivo muestra la importancia de la epidemiología molecular en TB y el rol que la misma puede tener en el control de la enfermedad. Especialmente en el desarrollo de políticas específicas, su monitorización y evaluación de impacto a nivel poblacional.

Por último, se evidenció por métodos epidemiológicos clásicos la presencia de un brote intracarcelario en uno de los centros de reclusión más grandes del país. En estos momentos, nos encontramos realizando la búsqueda de estos aislados para confirmar la clonalidad del brote, su origen y su perfil de resistencia.

Conclusiones y recomendaciones

A través del presente proyecto se logró diseñar cebadores que permiten la amplificación de regiones específicas del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* en formato multiplex. Se realizó el diseño de dos multiplex independientes que amplifican por un lado regiones con polimorfismos característicos de los diferentes linajes y sublinajes descritos dentro de la especie y por otra parte 9 genes asociadas a resistencia a los principales fármacos anti-tuberculosis. Estos 9 genes son amplificados por completo, cubriendo no sólo las regiones con mutaciones conocidas sino toda la región codificante.

Por cada cepa que se desea obtener los datos de linaje y resistencia, se debe realizar la amplificación de cada uno de estos multiplex (llamados pool Linaje y pool Resistencia), para luego obtener una única biblioteca a partir de una mezcla de ambos por cepa. En esta etapa se realiza el barcode y adición de adaptadores de la tecnología de secuenciado.

Las bibliotecas son secuenciadas en corridas paired-end de 75 bases. De este modo, para el total de bases que se amplifican (aprox. 20000 bases), para obtener una cobertura de 100 X (es decir, secuenciar cada base al menos 100 veces), es necesario obtener en el entorno de 15.000 secuencias por muestra. Si bien los costos de realizar las bibliotecas es el mismo ya sea se desee obtener todo el genoma o solo las regiones seleccionadas en el presente desarrollo, si se quisiera obtener una cobertura de 100 X en el caso de un genoma serían necesario obtener al menos 2,6 millones de secuencias por biblioteca. De este modo, es posible incluir más muestras por corrida o utilizar secuenciadores o cartuchos de Illumina de menor cantidad de secuencias que redundan en una reducción importante de costos. Aunque la información de obtener genomas completos es más valiosa per se, los costos son mayores. Como ventajas, la información proveniente de genomas completos permite determinar con mayor precisión el linaje, realizar un mejor manejo en el seguimiento de brotes, determinar casos de re-infección o recaída o incluso encontrar mutaciones aun no asociadas a resistencia a fármacos que puedan influir en la misma o en el caso de aparición de nuevos fármacos obtener datos previos de posibles mutaciones que puedan afectar su modo de acción. Probablemente en un futuro, la disminución de costos de secuenciación

y la facilidad de acceso hagan posible llevar adelante la secuenciación de todo el genoma de forma rutinaria (como ya lo hacen algunos países de mayores ingresos). Sin embargo, en la actualidad, la alternativa planteada en el presente proyecto ofrece la posibilidad de obtener información relevante a un precio menor y con tiempos de análisis similares y puede plantearse como alternativa para realizarse a nivel local ya sea para todos los aislados o para aquellos que resultan de mayor interés (poblaciones vulnerables, brotes, cepas resistentes, etc.).

En el presente proyecto, realizamos el protocolo para caracterizar aislados del Sistema Penitenciario del año 2019 y realizar la comparación con datos previos de cepas circulantes en la comunidad.

El desarrollo del sistema llevado a cabo durante el proyecto será transferido al laboratorio de la CHLA-EP. Se realizará un entrenamiento para el procesamiento de los datos generados utilizándose los softwares disponibles online ya sea para el análisis de las regiones específicas (secuenciación basada en la presente propuesta) o de genomas completos de *M. tuberculosis*.

Finalmente, estamos preparando la realización en conjunto con la CHLA-EP un video de divulgación tanto de la nueva herramienta como de los resultados obtenidos con el análisis de muestras del SP. Dicho video tendrá como público objetivo principalmente a personal de salud involucrada en el manejo de la TB, así como personal del SP y público en general.

Referencias bibliográficas

- [1] World Health Organization, Global Hepatitis Report, 2017, Who. (2017). [https://doi.org/ISBN 978-92-4-156545-5](https://doi.org/ISBN%20978-92-4-156545-5).
- [2] WHO, Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe, *Tuberc. Surveill. Monit. Eur.* (2018).
- [3] M. Andres, E. Gohring-Zwacka, L. Fiebig, M. Priwitzer, E. Richter, S. Rusch-Gerdes, W. Haas, S. Niemann, B. Brodhun, Integration of molecular typing results into tuberculosis surveillance in Germany-A pilot study, *PLoS One.* (2017). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188356>.
- [4] J. Mears, I. Abubakar, D. Crisp, H. Maguire, J.A. Innes, M. Lilley, J. Lord, T. Cohen, M.W. Borgdorff, E. Vynnycky, T.D. McHugh, P. Sonnenberg, Prospective evaluation of a complex public health intervention: Lessons from an initial and follow-up cross-sectional survey of the tuberculosis strain typing service in England, *BMC Public Health.* (2014). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-14-1023>.
- [5] S.C. Auld, N.S. Shah, T. Cohen, N.A. Martinson, N.R. Gandhi, Where is tuberculosis transmission happening? Insights from the literature, new tools to study transmission and implications for the elimination of tuberculosis, *Respirology.* 23 (2018) 807–817. <https://doi.org/10.1111/resp.13333>.
- [6] B. Mathema, N.E. Kurepina, P.J. Bifani, B.N. Kreiswirth, Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights, *Clin. Microbiol. Rev.* (2006). <https://doi.org/10.1128/CMR.00061-05>.
- [7] J. Hurtado, C. Coitinho, N. Nin, M. Buroni, F.J. Hurtado, C. Robello, G. Greif, Clinical and epidemiological features of tuberculosis isolated from critically ill patients, *Rev. Argent. Microbiol.* (2021). <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.011>.
- [8] L.S. Cowan, L. Diem, M.C. Brake, J.T. Crawford, Transfer of a Mycobacterium tuberculosis Genotyping Method, Spoligotyping, from a Reverse Line-Blot Hybridization, Membrane-Based Assay to the Luminex Multianalyte Profiling System, *J. Clin. Microbiol.* (2004). <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.474-477.2004>.
- [9] F. Coll, R. Mc Nerney, J.A. Guerra-Assunção, J.R. Glynn, J. Perdigão, M. Viveiros, I. Portugal, A. Pain, N. Martin, T.G. Clark, A robust SNP barcode for typing Mycobacterium tuberculosis complex strains, *Nat. Commun.* 5 (2014). <https://doi.org/10.1038/ncomms5812>.
- [10] C. Coitinho, G. Greif, C. Robello, P. Laserra, E. Willery, P. Supply, Rapidly progressing tuberculosis outbreak in a very low risk group, *Eur. Respir. J.* 43 (2014). <https://doi.org/10.1183/09031936.00150413>.
- [11] J.L. Warren, L. Grandjean, D.A.J. Moore, A. Lithgow, J. Coronel, P. Sheen, J.L. Zelner, J.R. Andrews, T. Cohen, Investigating spillover of multidrug-resistant tuberculosis from a prison: A spatial and molecular epidemiological analysis, *BMC Med.* (2018). <https://doi.org/10.1186/s12916-018-1111-x>.
- [12] G. Greif, C. Coitinho, C. Rivas, J. Van Ingen, C. Robello, Molecular analysis of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis isolates in Uruguay, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 16 (2012). <https://doi.org/10.5588/ijtld.11.0559>.
- [13] C. Coitinho, G. Greif, C. Robello, J. van Ingen, C. Rivas, Identification of Mycobacterium tuberculosis complex by polymerase chain reaction of Exact Tandem Repeat-D fragment from mycobacterial cultures, *Int. J. Mycobacteriology.* 1 (2012) 146–148. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2012.07.002>.
- [14] B. Ewing, P. Green, Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities, *Genome Res.* (1998). <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186>.
- [15] N. Joshi, J. Fass, Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software], Available at <https://github.com/Najoshi/Sickle>. (2011) 2011.
- [16] B. Langmead, C. Trapnell, M. Pop, S.L. Salzberg, Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome, *Genome Biol.* 10 (2009) R25. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-3-r25>.
- [17] H. Li, R. Durbin, Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform, *Bioinformatics.* 26 (2010) 589–595. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698>.
- [18] S. Feuerriegel, V. Schleusener, P. Beckert, T.A. Kohl, P. Miotto, D.M. Cirillo, A.M. Cabibbe, S. Niemann, K. Fellenberg, PhyResSE: a Web Tool Delineating Mycobacterium tuberculosis Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data, *J. Clin. Microbiol.* 53 (2015) 1908–1914. <https://doi.org/10.1128/jcm.00025-15>.
- [19] ECDC, ECDC roadmap for integration of molecular and genomic typing into European-level surveillance and epidemic preparedness, n.d.
- [20] WHO, Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis, 2016.
- [21] P. Miotto, B. Tessema, E. Tagliani, L. Chindelevitch, A.M. Starks, C. Emerson, D. Hanna, P.S. Kim, R. Liwski, M. Zignol, C. Gilpin, S. Niemann, C.M. Denking, J. Fleming, R.M. Warren, D. Crook, J. Posey, S. Gagneux, S. Hoffner, C. Rodrigues, I.

Comas, D.M. Engelthaler, M. Murray, D. Alland, L. Rigouts, C. Lange, K. Dheda, R. Hasan, U.D.K. Ranganathan, R. McNerney, M. Ezewudo, D.M. Cirillo, M. Schito, C.U. Köser, T.C. Rodwell, A standardised method for interpreting the association between mutations and phenotypic drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *Eur. Respir. J.* (2017). <https://doi.org/10.1183/13993003.01354-2017>.

Licenciamiento

Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional. (CC BY-SA)