

Helgenomsekvensering for epidemiologisk overvåking av TB

Nasjonalt referanselaboratorium for mykobakterier

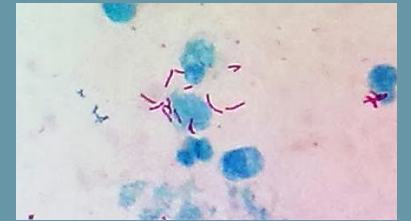
Avdeling for tuberkulose, blod og seksuell smitte

Anne Torunn Mengshoel

Overlege

Bidrag fra Vegard Eldholm

Senior forsker



Referanselaboratoriet for mykobakterier

Avd for bakteriologi og molekylærbiologi

- Mottar alle tuberkuloseisolat fra ny diagnostiserte pasienter i Norge
 - 8 laboratorier i landet som utfører dyrkning
- Identifikasjon av art i *M. tuberculosis*-komplekset (Mtbcc)
- Resistenstesting med fenotypiske og molekylære metoder
- Molekylær epidemiologisk undersøkelse: genotyping

Molekylær epidemiologisk overvåkning

- Mål: redusere byrden av TB
 - Oppdage pågående smitte og forhindre videre smitte
- Utfordring:
 - skille nylig smittede fra reaktivering
- Metode: kombinere data
 - Molekylære
 - Kliniske
 - Epidemiologiske

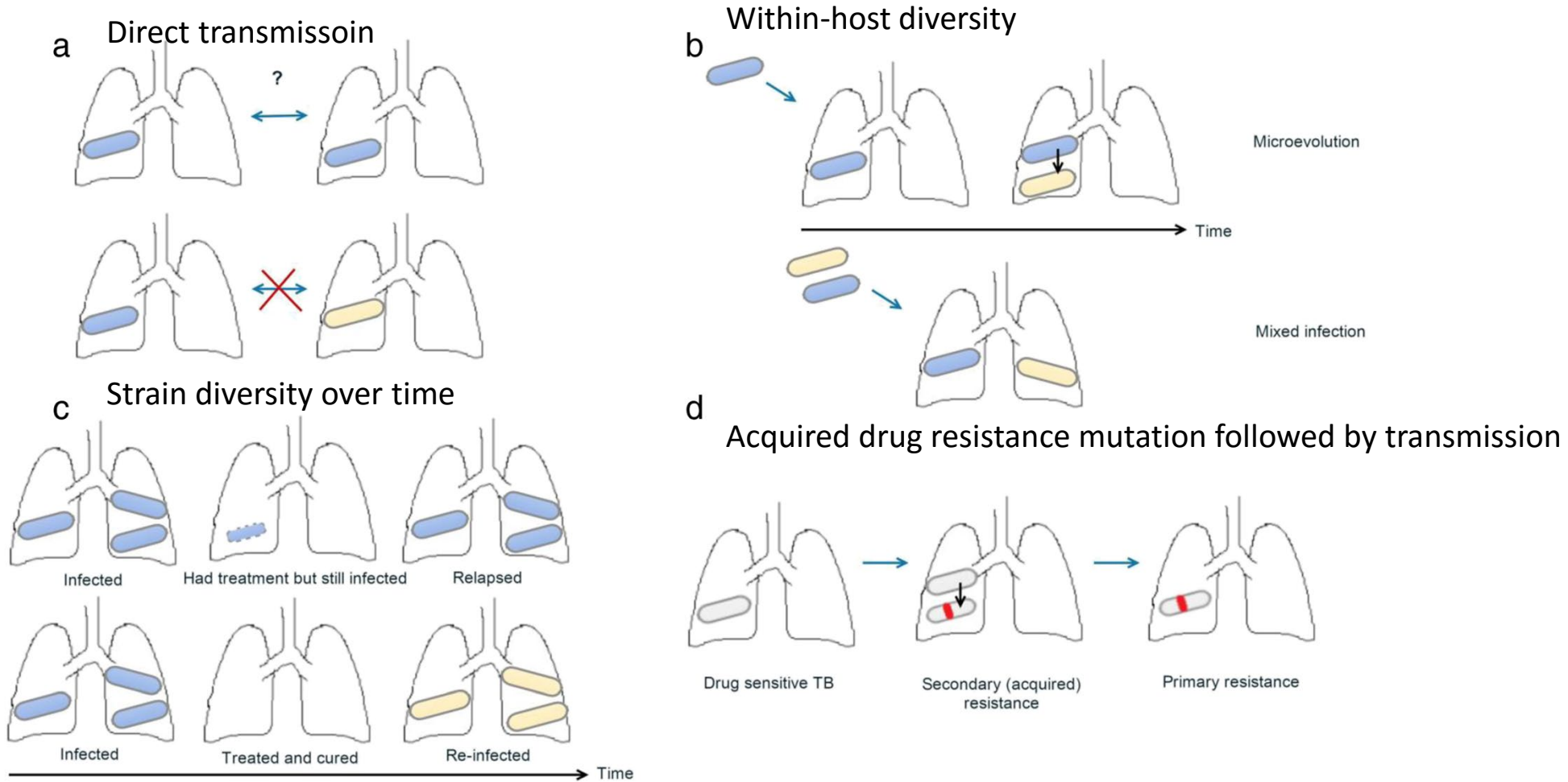
Molekylær epidemiologisk undersøkelse

Genotyping

- Kartlegger genetisk slektskap mellom tuberkulosebakteriene
 - Bekrefter eller avkrefter at bakteriene er beslektet
 - Oppdage og undersøke smittesammenheng mellom personer
 - Skille reinfeksjon fra reaktivering hos samme person
- Avdekke krysskontaminasjon i laboratoriet

Molekylær epidemiologisk overvåkning

- FHI overvåker clustre/klynger av bakterier som er genetisk beslektet
 - Cluster/klynge: 2 eller flere isolat
 - Siste 3 år
 - Smitteoppsporingsskjema og MSIS
 - Samarbeid med smittevernansvarlige/tuberkulosekoordinatoreri kommunen



[Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: a systematic review.](#)

Hatherell HA, Colijn C, Stagg HR, Jackson C, Winter JR, Abubakar I.

BMC Med. 2016 Mar 23;14:21. doi: 10.1186/s12916-016-0566-x. Review.

DNA: deoxyribonucleic acid

- DNA: fire ulike nukleotider med fire ulike baser:
Cytosine-Guanine og Adenine-Thymine
- Genomets sekvens: rekkefølgen av nukleotidene
- Genomet til tuberkulosebakterien inneholder mer enn 4.4 mil nukleotider
- Mutasjoner i DNA skjer over tid
- SNP: singel nucleotid polymorfisme

Ulike molekylær epidemiologiske metoder

- RFLP (~1990)
- Spoligotyping (~1995)
- MIRU-VNTR (~2005)
 - FHI fom 2012
- Helgenomsekvensering:
 - FHI fom 2016

Metodene varierer med hensyn til

- Området / andelen av genomet
- Mengde DNA
- PCR basert
- Hurtighet
- Utstørsbehov
- Oppløselighet / diskriminerende evne
- Databaser og deling av resultat

Ulike metoder kartlegger ulike deler av genomet

- **RFLP**
 - Restriction fragment length polymorfisme
 - Kutter genomet i ulike fragmenter
- **MIRU-VNTR**
 - Mycobacterial interspersed repetitive units-variable number tandem repeats
 - Repetitive områder (24 loci)
- **Spoligotyping**
 - Repetitivt område (DR locus)
- **Helgenomsekvensering**
 - DNA sekvensen for store deler av genomet

Molekylær epidemiologisk undersøkelser

Ulike metoder

- Spoligotyping og MIRU-VNTR dekker 1 % av genomet
 - Regionen(e) som undersøkes behøver ikke å endres innenfor tidsperioden som er hensiktsmessig for å forstå nylig smittesammenheng
 - Vanskeligere å skille tilfeller som skyldes reaktivering fra de som nylig har blitt smittet når det har foregått betydelig smitte tidligere i et samfunn/en gruppe
- WGS dekker 90% av genomet og avdekker mye mer av de genetiske forandringene som skjer

MIRU-VNTR

Mycobacterial interspersed repetitive units - variable number tandem repeats
Rutine på FHI/Europa for overvåkning siste år

POS

Rask (PCR)

OK oppløsning

Deling & Database

NEG

Krever kapillær elektroforese (HT)

Homoplasier

Ikke god nok oppløsning til å konkludere sikkert
ang transmisjon/utbrudd

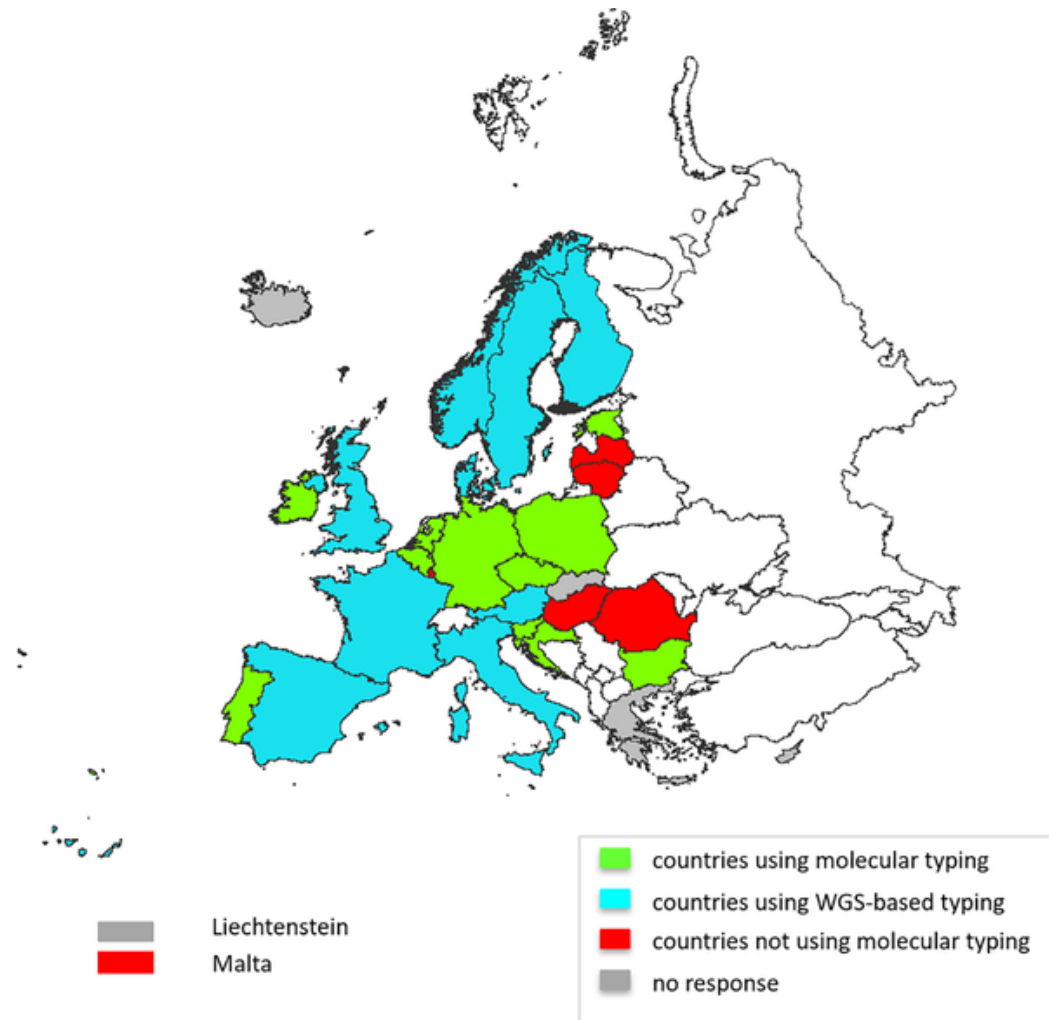
Profilen (MtbC15-9 type) uttrykkes i en tallkode

Rapporteres til TESSy (The European Surveillance System) for MDR isolat

Table 2. Cross-border molecular MDR TB clusters involving strains isolated in 2014, by MtbC15-9 type

MtbC15-9 type	Strains	Countries involved	Strain numbers by countries
100-32	182	11	Belgium (9), Estonia (114), Finland (3), France (15), Germany (13), Ireland (2), Italy (12), Norway (2), Spain (4), Sweden (2), United Kingdom (6)
94-32	73	14	Belgium (3), Bulgaria (1), Denmark (1), Estonia (10), Finland (2), France (17), Germany (22), Ireland (1), Italy (4), Netherlands (2), Norway (2), Spain (1), Sweden (3), United Kingdom (4)

Fig 1. Molecular typing for TB surveillance in European Union/European Economic Area countries in 2016.



Andrés M, van der Werf MJ, Ködmön C, Albrecht S, Haas W, et al. (2019) Molecular and genomic typing for tuberculosis surveillance: A survey study in 26 European countries. PLOS ONE 14(3): e0210080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210080>
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210080>

Helgenomsekvensering

NGS: next generation sequencing
FHI

- Illumina teknologi/plattform
- Analyseverktøy
 - **SeqSphere+** (RIDOM) semi-komersiell programvare for overvåkning (cgMLST)
 - Kontinuerlig oppdatert intern database
 - Detaljert oversikt over slektskap som oppdateres fortløpende med nye isolater
 - Ingen resistenskartlegging
 - **Egen SNP-basert pipeline** for slektskapsanalyser og *in silico* resistens prediksjon utviklet ved FHI
 - Under implementering
- WGS har overlegen diskriminerende evne vs MIRU
 - MIRU er ofte nyttig men kan også være relativt misvisende
 - Kan spare ressurser ved å ikke igangsette unødvendigsmitteoppsporing
 - MIRU veldig praktisk for deling av data

Helgenomsekvensering

Intern pipeline

- Kartlegging av isolatets slektskap til tidligere sekvenserte Mtb isolat
 - Rådata blir mappet til referanseggenom H37Rv
 - Det blir deretter laget en helgenoms-alignment med alle hittil sekvenserte isolat med sine respektive forandringer
 - Fra dette alignmentet telles alle enkeltbasemutasjoner og alle parvise distanser mellom alle isolat.
 - De isolatene som er nærmest beslektet det gjeldende isolatet blir trukket ut, og programmet FastTree (Morgan *et al*, 2010) blir brukt til å lage et fylogenetisk tre.
- Slektskap mellom isolat kartlegges detaljert ved å identifisere forskjeller i enkelt nukleotider, SNP: singel nukleotid polymorfisme

Helgenomsekvensering

NGS: next generation sequencing

- Utfordringer

- Manglende standardisering av analyse pipelines
- Database for deling av data på globalt nivå/ integrasjon med ECDC
- Få bedre forståelse for genetisk distanse og definisjon av clustre
 - Hva skal grense for antall SNP være for å bekrefte/utelukke smittesammenheng?
 - 0-5 eller 0-12?
 - Sammenholde med andre data

- Påvist *M. tuberculosis* stammer i Norge med < 5 SNP (nukleotide forskjeller) siste 3 år
 - => smittesammenheng sannsynlig
 - => vurder utvidet smitteoppsporing
- Ved større utbrudd starter FHI utforskning, kommunene blir kontaktet

Rapport om smitteoppsporing ved tilfelle av tuberkulose

Skal i følge MSIS-forskriften § 1.7.4 sendes til Folkehelseinstituttet og tuberkulosekoordinator etter avsluttet smitteoppsporing, senest innen ett år. Skjemaet brukes også til å rapportere husholdsundersøkelse rundt barn. Husk å innhente resultater fra andre berørte kommuner/helseforetak før rapporten sendes. Det skal sendes inn ett skjema for hver pasient med lungetuberkulose. Hvis man finner andre med lungetuberkulose i smitteoppsporingen, må man forsøke å ikke rapportere kontaktene dobbelt. Hver kontakt skal kun meldes på skjemaet for den som mest sannsynlig er indekspasienten for ham/henne. Ved utbrudd kan Folkehelseinstituttet etterspørre informasjon om hver kontakt. Det er utarbeidet en mal for kontaktliste til bruk i kommunen, se www.fhi.no.

Personen som foranlediget smitteoppsporingen:

Etternavn	Fornavn	Fødselsnummer:	(- dersom ikke tilgjengelig; D-nummer: - dersom ikke tilgjengelig; DUF-nummer:)
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Bostedsadresse	Bostedskommune/Bydel	<input type="text"/>	
<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	

		Antall kontakter identifisert	-hvorav har svar på IGRA/mantoux	-hvorav er IGRA-positive	Antall henvist spesialist- helsetjeneste	Antall startet forebyggende behandling	Antall diagnostisert med tuberkulose
Særlig sårbare kontakter (immunsupprimerte og barn < 5 år)	Særlig smitteeksponerte*						
	Andre smitteeksponerte**						
	Tilfeldige kontakter***						
Øvrige kontakter	Særlig smitteeksponerte*						
	Andre smitteeksponerte**						
	Tilfeldige kontakter***						
TOTALT		0	0	0	0	0	0

*Særlig smitteeksponerte: Husstandsmedlemmer el. tilsvarende nære kontakter til pasient med smittsom lungetuberkulose¹⁾ i smittsom periode.

** Andre smitteeksponerte: Kontakter med over ca. 8 timer i taleavstand til pasient med «smittsom lungetuberkulose»¹⁾, eller over ca. 40 timer til pasient med «lite smittsom lungetuberkulose»²⁾, eller som har vært i særlig nær fysisk kontakt i smittsom periode.

*** Tilfeldige /perifer kontakter: Regnes normalt ikke som smitteeksponerte, og skal bare unntaksvis undersøkes.

Inndeling av smittsomhet av lungetuberkulose som er laboratoriebekreftet ved dyrkning eller PCR.

- 1) «Smittsom lungetuberkulose»: direkte mikroskopi av luftveismateriale (sputum eller bronkoalveolar lavage) positiv for tuberkulosebakterier. Smittsom periode: fra symptomer eller ca. tre måneder før diagnose.
- 2) «Lite smittsom lungetuberkulose»: direkte mikroskopi eller PCR negativ for tuberkulosebakterier i luftveismateriale. Pasienter med positiv PCR, men negativ direkte mikroskopi, klassifiseres også som lite smittsomme. Smittsom periode: opptil ca. en måned før diagnose.

Kommentarer til smitteoppsporingen:

Dato, navn, tittel, kommune (ev. bydel), adresse.

Svarbrev fra referanselaboratoriet

- Det er ved helgenomsekvensering påvist tilnærmet identisk (fra 0 til 5 nukleotid forskjeller) *M. tuberculosis*-stamme fra annen tuberkulosepasient i Norge siste 3 år. **Smittesammenheng med norsk(e) tilfelle(r) er sannsynlig og bør utforskes nærmere.** Smitteoppsporingen bør anlegges bredere enn man ellers ville gjort. For videre utbruddsetterforskning bes ansvarlig kommuneoverlege i pasientens bostedskommune kontakte Avdeling for tuberkulose, blod og seksuell smitte på e-post tuberkulose@fhi.no og oppgi sitt telefonnummer, så vil du bli kontaktet av dr Trude Arnesen.

[Whole genome sequencing of Mycobacterium tuberculosis for detection of recent transmission and tracing outbreaks: A systematic review.](#)

Nikolayevskyy V, Kranzer K, Niemann S, Drobniowski F.

Tuberculosis (Edinb). 2016 May;98:77-85. doi: 10.1016/j.tube.2016.02.009. Epub 2016 Mar 10. **Review.**

[Interpreting whole genome sequencing for investigating tuberculosis transmission: a systematic review.](#)

Hatherell HA, Colijn C, Stagg HR, Jackson C, Winter JR, Abubakar I.

BMC Med. 2016 Mar 23;14:21. doi: 10.1186/s12916-016-0566-x. Review.

[Clinical use of whole genome sequencing for Mycobacterium tuberculosis.](#)

Witney AA, Cosgrove CA, Arnold A, Hinds J, Stoker NG, Butcher PD.

BMC Med. 2016 Mar 23;14:46. doi: 10.1186/s12916-016-0598-2. Review.

[Whole genome sequencing: a new paradigm in the surveillance and control of human tuberculosis.](#)

Hasnain SE, O'Toole RF, Grover S, Ehtesham NZ.

Tuberculosis (Edinb). 2015 Mar;95(2):91-4. doi: 10.1016/j.tube.2014.12.007. Epub 2014 Dec 31. Review.

Takk for oppmerksomheten!