

Integración de la información molecular y epidemiológica en la vigilancia del sarampión. Aplicación en el estudio de los brotes en España, 2017-2020

Camille Jacqueline

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain; European Public Health Microbiology Training Programme (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden.

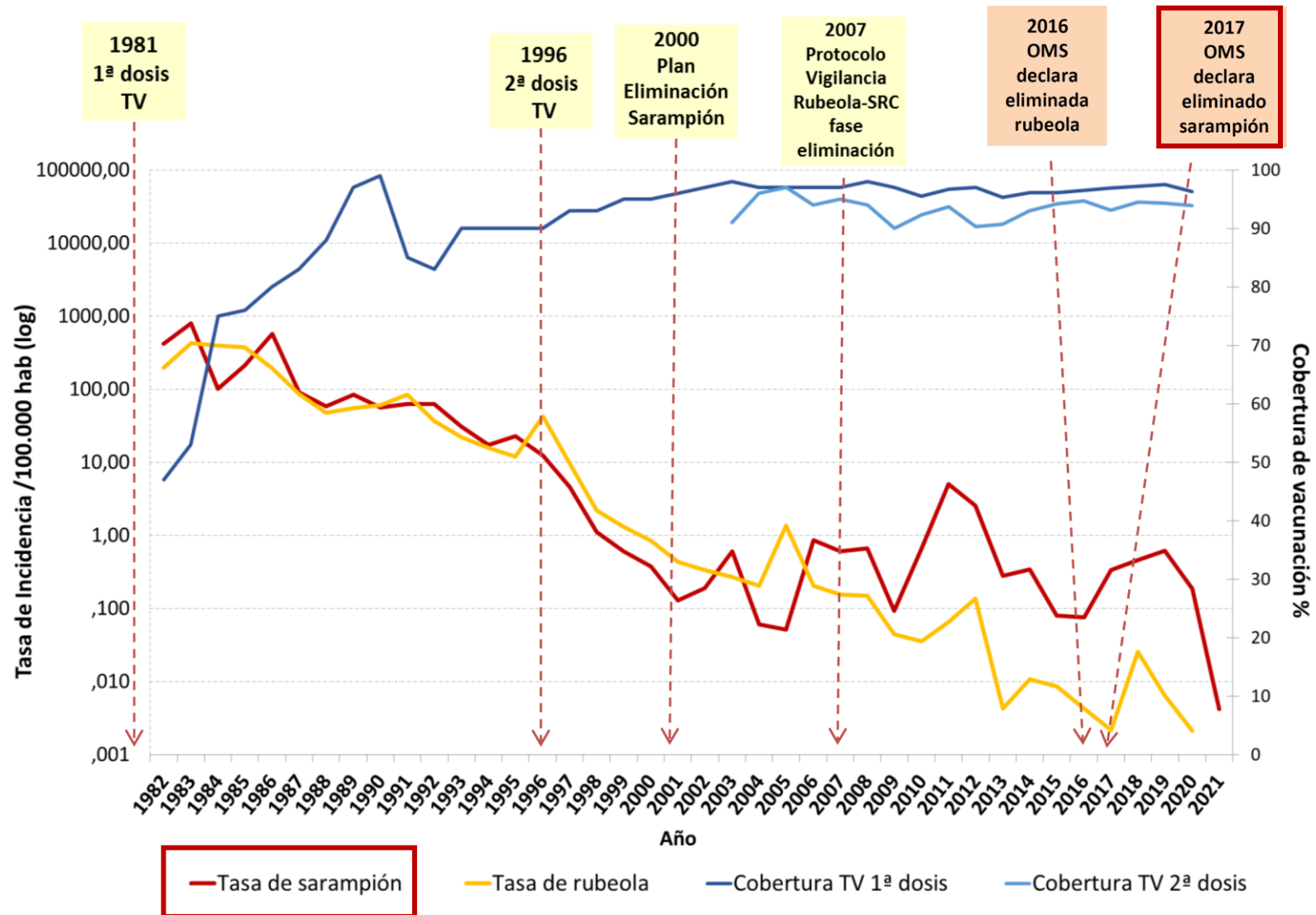
15 de junio de 2023

Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III).

Miembros del equipo de investigación: Camille Jacqueline^{1,2}, Ana María Gavilán^{1,4}, Noemí López-Perea^{3,4}, Ana Raquel Penedos⁵, Josefa Masa-Calles^{3,4}, Juan E. Echevarría^{1,4}, Aurora Fernández-García^{1,4}

1. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Spain.
2. European Public Health Microbiology Training Programme (EUPHEM), European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), Stockholm, Sweden.
3. Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain
4. CIBER de Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain
5. United Kingdom Health Security Agency, London, UK

Introducción – Situación epidemiológica en España



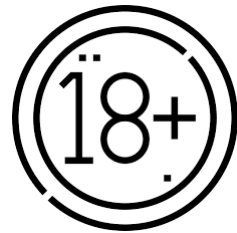
Fuentes: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII. Coberturas vacunación: Ministerio de Sanidad

Introducción – Situación epidemiológica en España

Fase de post - eliminación :



Casos importados o relacionados con la importación

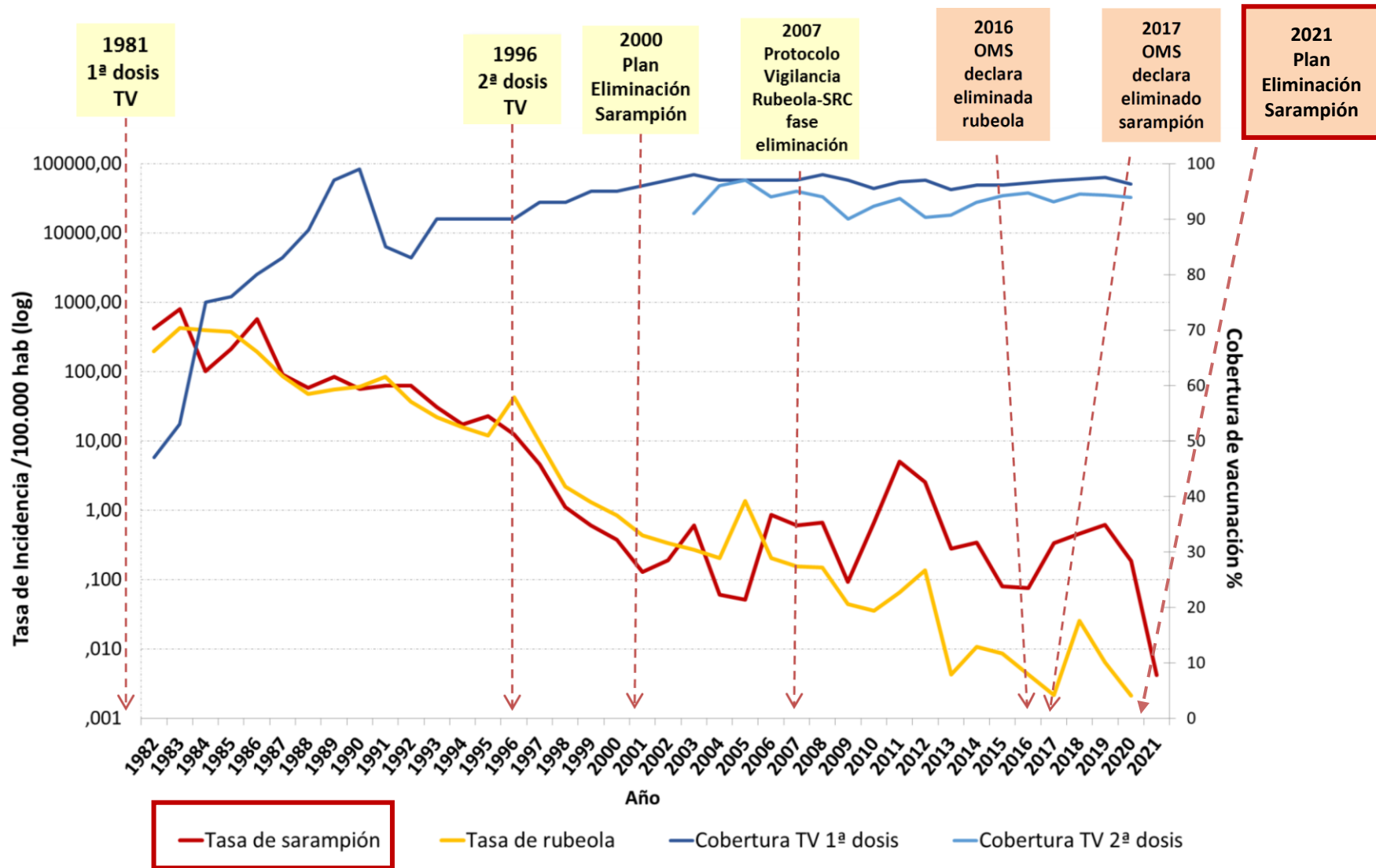


Casos se detectan predominantemente en adultos



Son asociados con entornos sanitarios

Introducción – Situación epidemiológica en España



Fuentes: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Centro Nacional de Epidemiología, ISCIII. Coberturas vacunación: Ministerio de Sanidad

Introducción – Situación epidemiológica en España

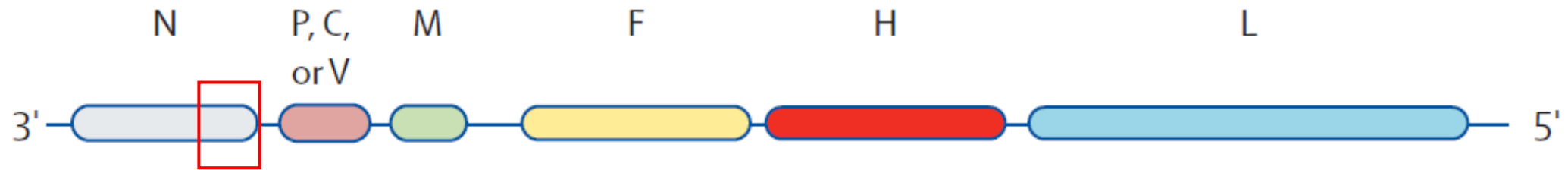
Plan estratégico para la eliminación del sarampión y la rubeola en España 2021-2025

- **Estrategia 2 – Fortalecer el sistema de vigilancia y la actuación en brotes**

- Objetivo 3 – Detectar, investigar y controlar los casos aislados y los brotes de sarampión y rubeola
- Objetivo 4 – Garantizar una investigación de laboratorio de calidad
- Objetivo 5 – Implementar de forma rápida las medidas de control de brotes que supongan un evento de salud pública e importancia nacional o internacional

Introducción – Vigilancia molecular

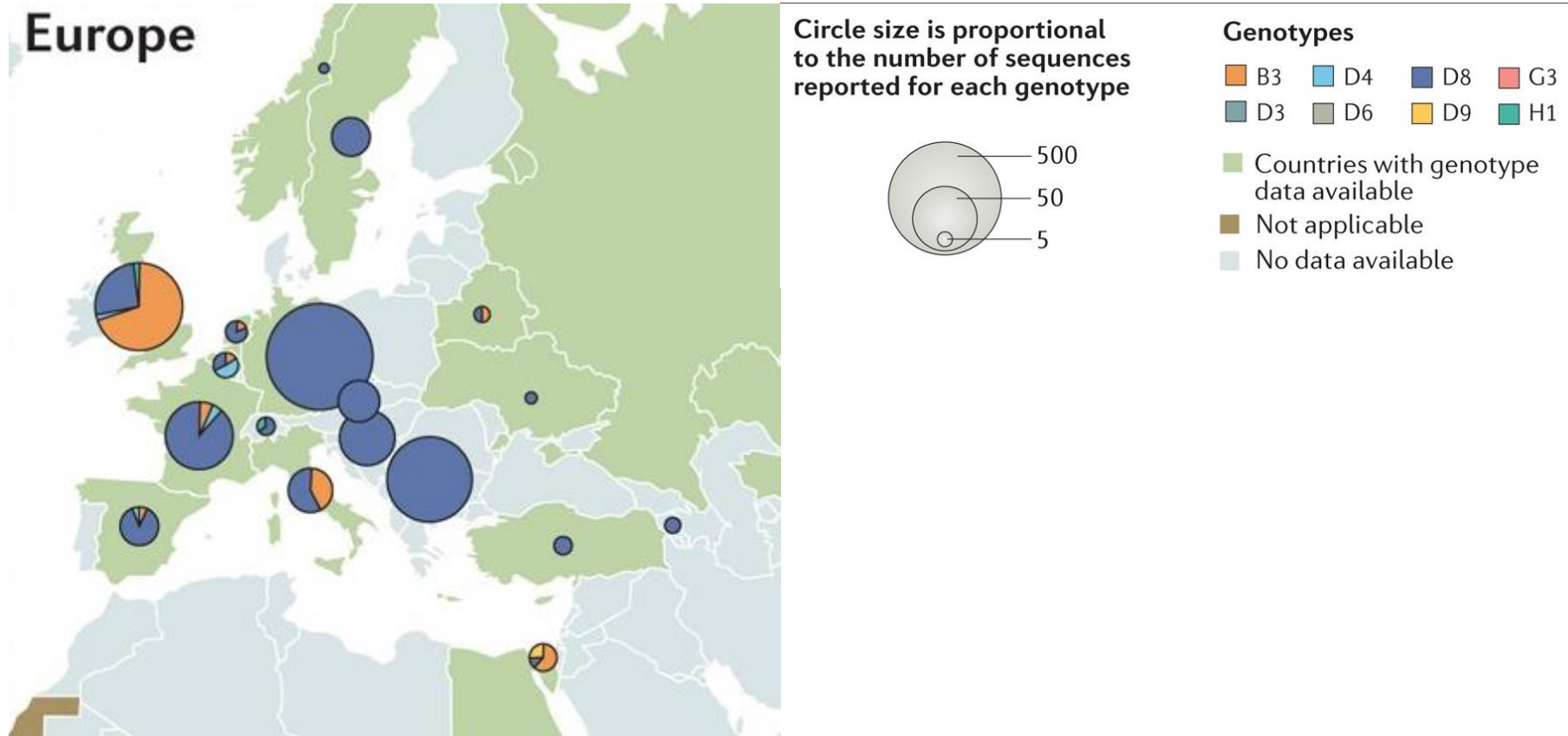
- El genotipo se basa en la secuenciación de la región N450 del genoma del virus del Sarampión (MeV) (recomendación de la OMS)



- El estudio de variantes: dentro de los genotipos, grupos de secuencias idénticas que presentan amplia distribución temporal y geográfica (MeaNS)
 - Evaluar la circulación mundial del virus
 - Permite establecer el origen de los casos (importado / endémico)
 - Ayuda a documentar cadenas de transmisión (genotipo/variante)
 - Ayuda a relacionar casos (mismo brote o no)
 - Ayuda a documentar la eliminación del virus (falta de circulación endémica)

Introducción – Vigilancia molecular

Data from 2019



- En España, 2 variantes dominantes desde 2017 (antes de la pandemia COVID-19):
 - Mvs/Dublin.IRL/8.16-variant (B3-Dublin)
 - MVs/Gir Somnath.IND/42.16-variant (D8- Gir Somnath)

Introducción – Vigilancia molecular



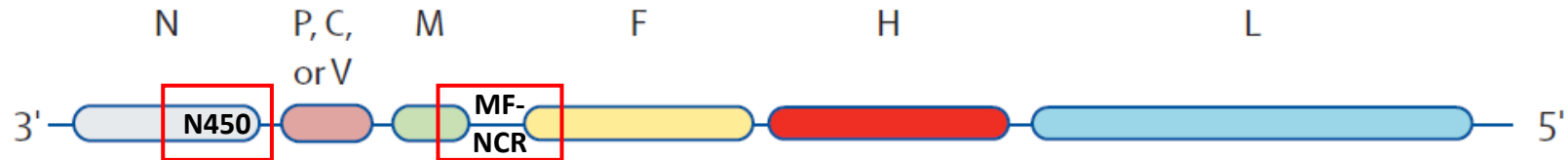
Reto : La variación genética de las secuencias N450 es limitada y el estudio de variantes es insuficiente en la fase de eliminación para distinguir las cadenas de transmisión y/o inferir el origen del caso.



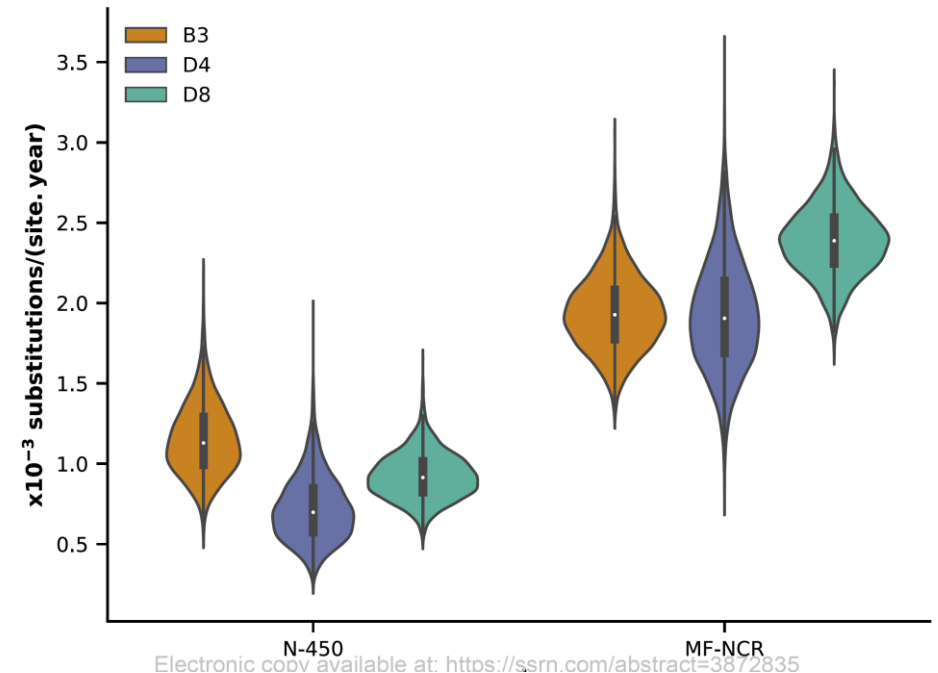
Solución: Recogida de información genómica adicional para aumentar la resolución molecular.

Introducción – Vigilancia molecular

- Región no-codificante entre los genes de las proteínas M y F (M-F NCR)



- Alto nivel de diversidad genética
- No existen estándares para :
 - El análisis de los datos de secuenciación
 - Establecer las cadenas de transmisión



Objetivos



Investigar si la región MF-NCR aumenta la resolución de la vigilancia del sarampión al mejorar :

- i) la discriminación entre MeV (virus del Sarampión) con secuencias N450 idénticas
- ii) la identificación de cadenas de transmisión e importaciones desconocidas.



Evaluar su potencia para identificar brotes y cadenas de transmisión frente a dos conjuntos de datos procedentes :

- i) Todas las secuencias disponibles de las variantes B3-Dublin y D8-Gir Somnath
- ii) Las secuencias de tres brotes nacionales bien descritos.

Muestras del CNM entre 2017 y 2020
con genotipo N450 (n=295)



Muestras de las variantes
B3-Dublin (n= 92) y
D8-GirSomnath (n=116)

Muestras del CNM entre 2017 y 2020
con genotipo N450 (n=295)

Muestras de las variantes
B3-Dublin (n= 92) y
D8-GirSomnath (n=116)

Extracción RNA
(B3: n= 92; D8: n=108)

Transformación cDNA

Nested PCR

Secuenciación
(B3: n= 55; D8: n=65)



Muestras del CNM entre 2017 y 2020
con genotipo N450 (n=295)

Muestras de las variantes
B3-Dublin (n= 92) y
D8-GirSomnath (n=116)

Extracción RNA
(B3: n= 92; D8: n=108)

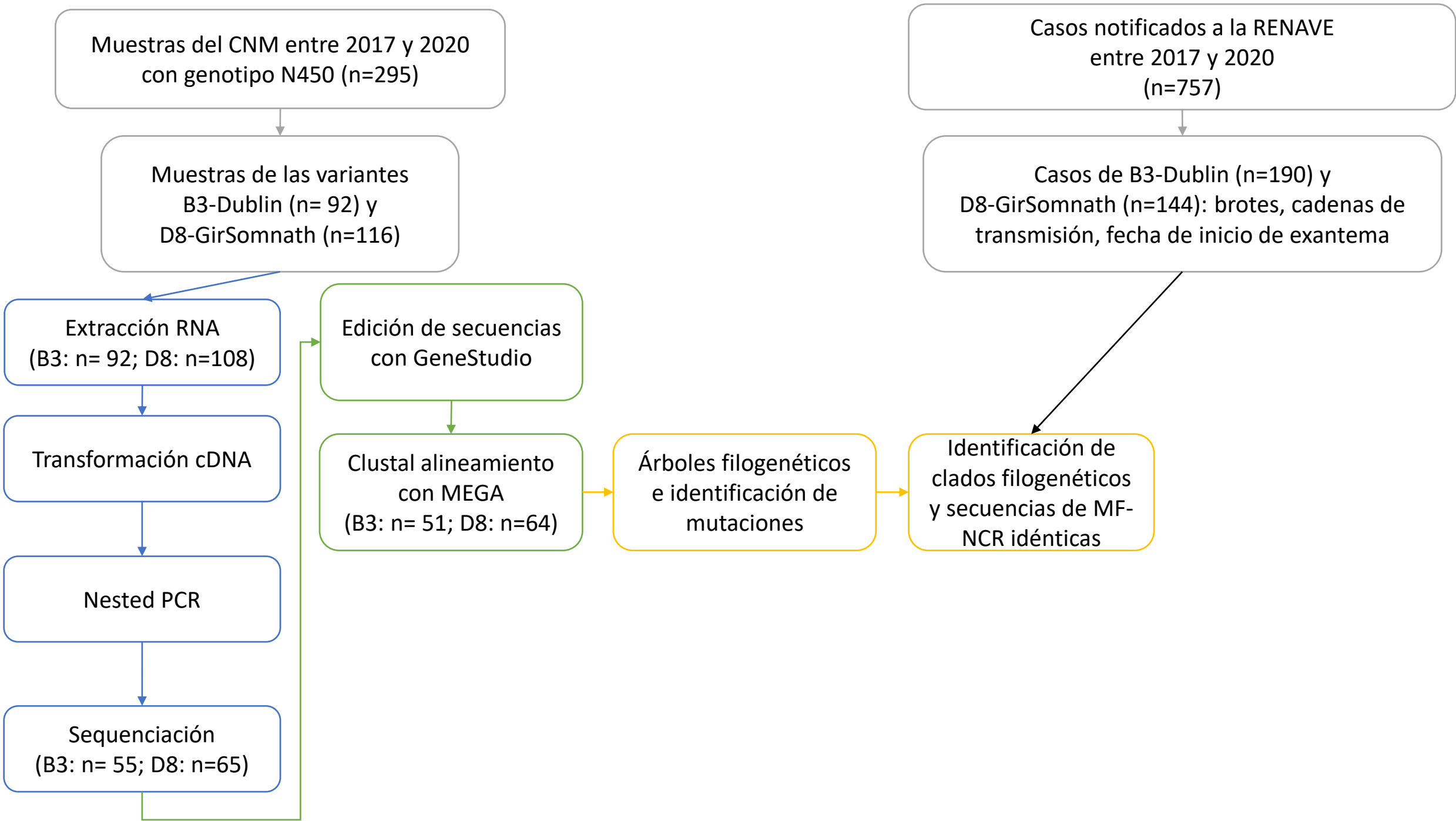
Transformación cDNA

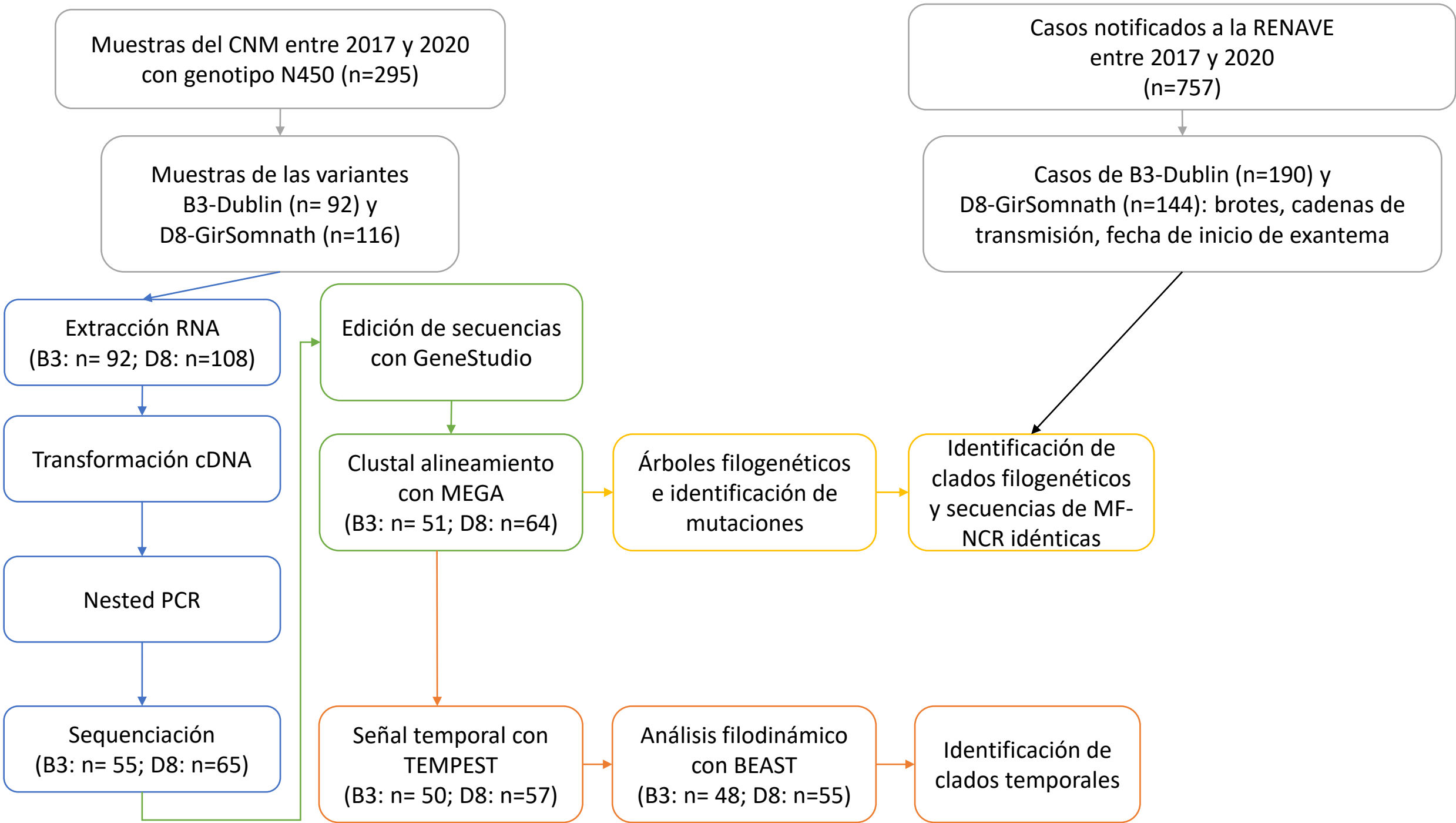
Nested PCR

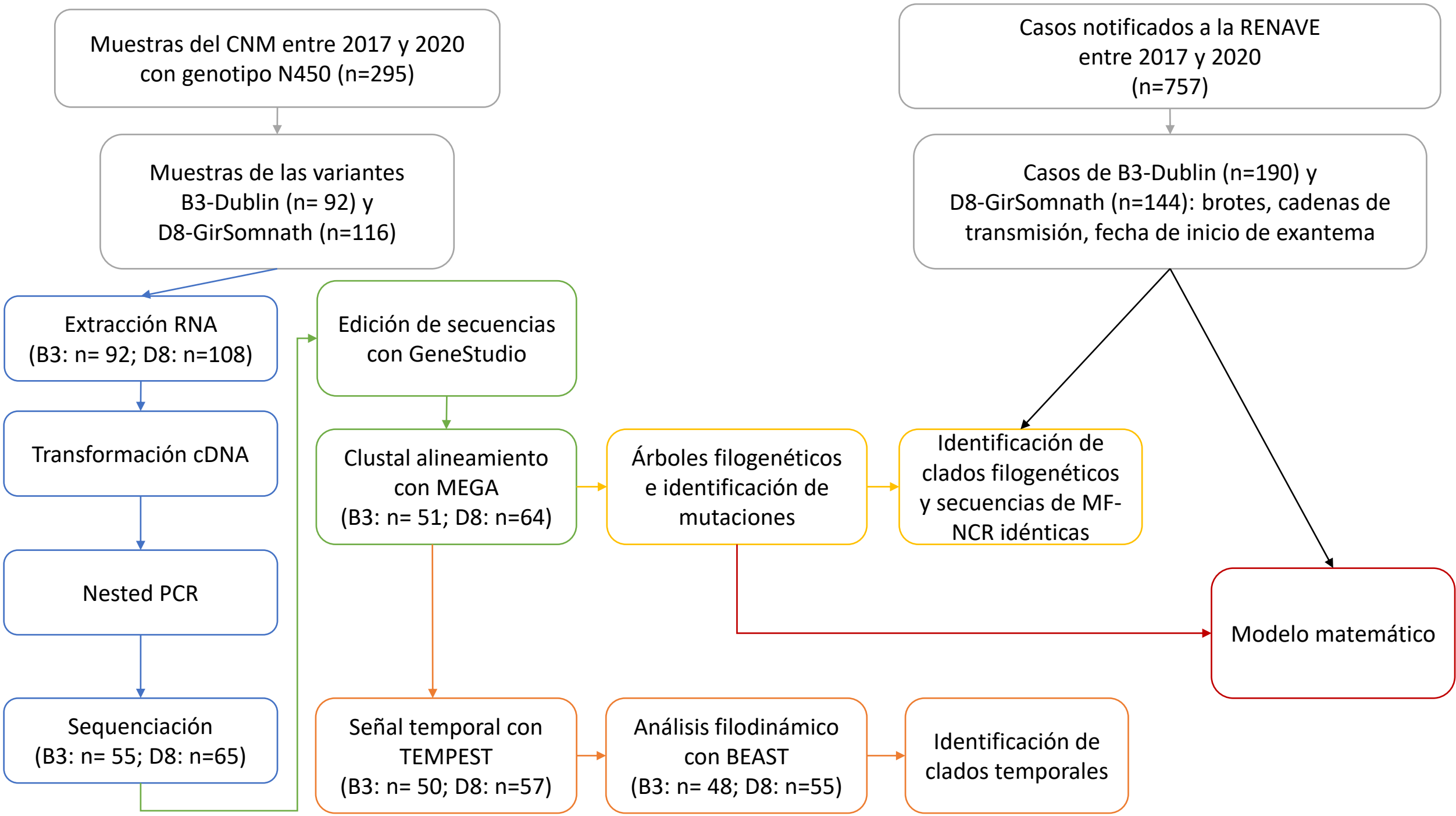
Secuenciación
(B3: n= 55; D8: n=65)

Edición de secuencias
con GeneStudio

Clustal alineamiento
con MEGA
(B3: n= 51; D8: n=64)







Metodología– Modelo matemático

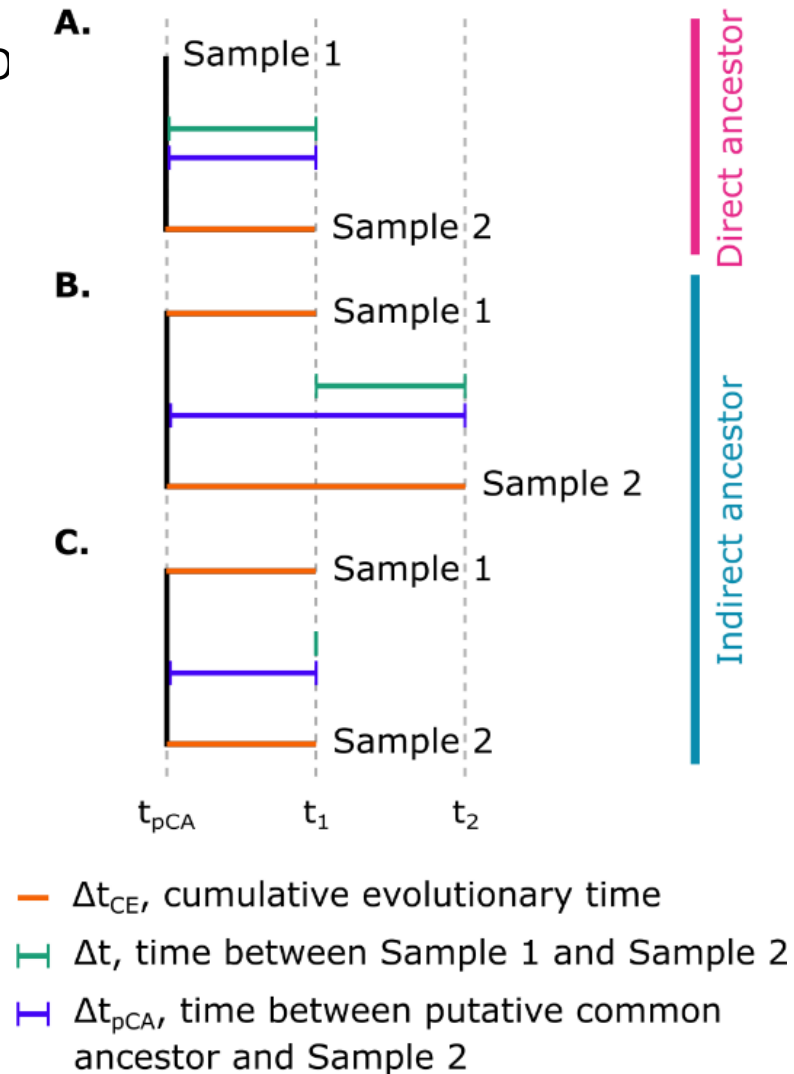
El modelo es muy conservativo entonces es util para asegurarse que los casos NO están relacionados.

Utilizamos las variables siguientes :

- Fechas de inicio de exantema de los dos casos investigados
- Fechas de inicio de exantema del caso índice

Calculamos el tiempo máx. de divergencia entre los dos casos desde el ancestro común :

$$\Delta t_{CE} = (t_1 - t_{pCA}) + (t_2 - t_{pCA})$$



Metodología– Modelo matemático

Utilizamos el Δt_{CE} y el número de sustituciones para leer la table (generada según la tasa evolutiva del genotipo) :

	number of substitutions												
Δt_{CE} (weeks)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	0.9274	0.9973	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
3	0.8931	0.9941	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
4	0.8601	0.9897	0.9995	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
5	0.8283	0.9843	0.9990	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
6	0.7976	0.9780	0.9984	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
7	0.7681	0.9708	0.9975	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
8	0.7397	0.9627	0.9964	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
9	0.7124	0.9540	0.9949	0.9996	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
10	0.6860	0.9445	0.9933	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
11	0.6606	0.9345	0.9913	0.9991	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
12	0.6362	0.9239	0.9890	0.9988	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
13	0.6127	0.9128	0.9864	0.9984	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
14	0.5900	0.9013	0.9834	0.9979	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
15	0.5682	0.8894	0.9802	0.9973	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
16	0.5472	0.8771	0.9766	0.9966	0.9996	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

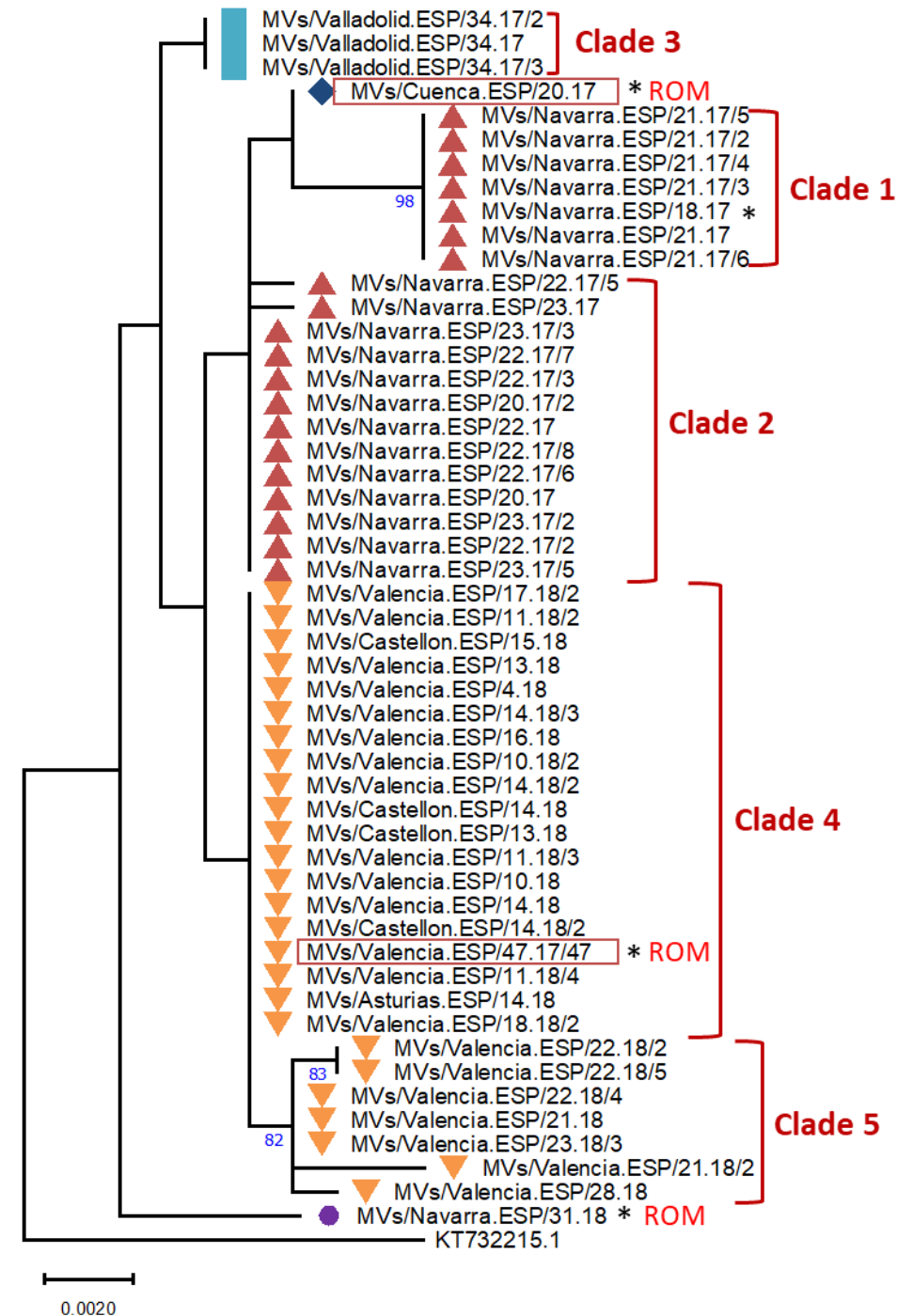
No relacionado

Relacionado

Resultados – Variante B3

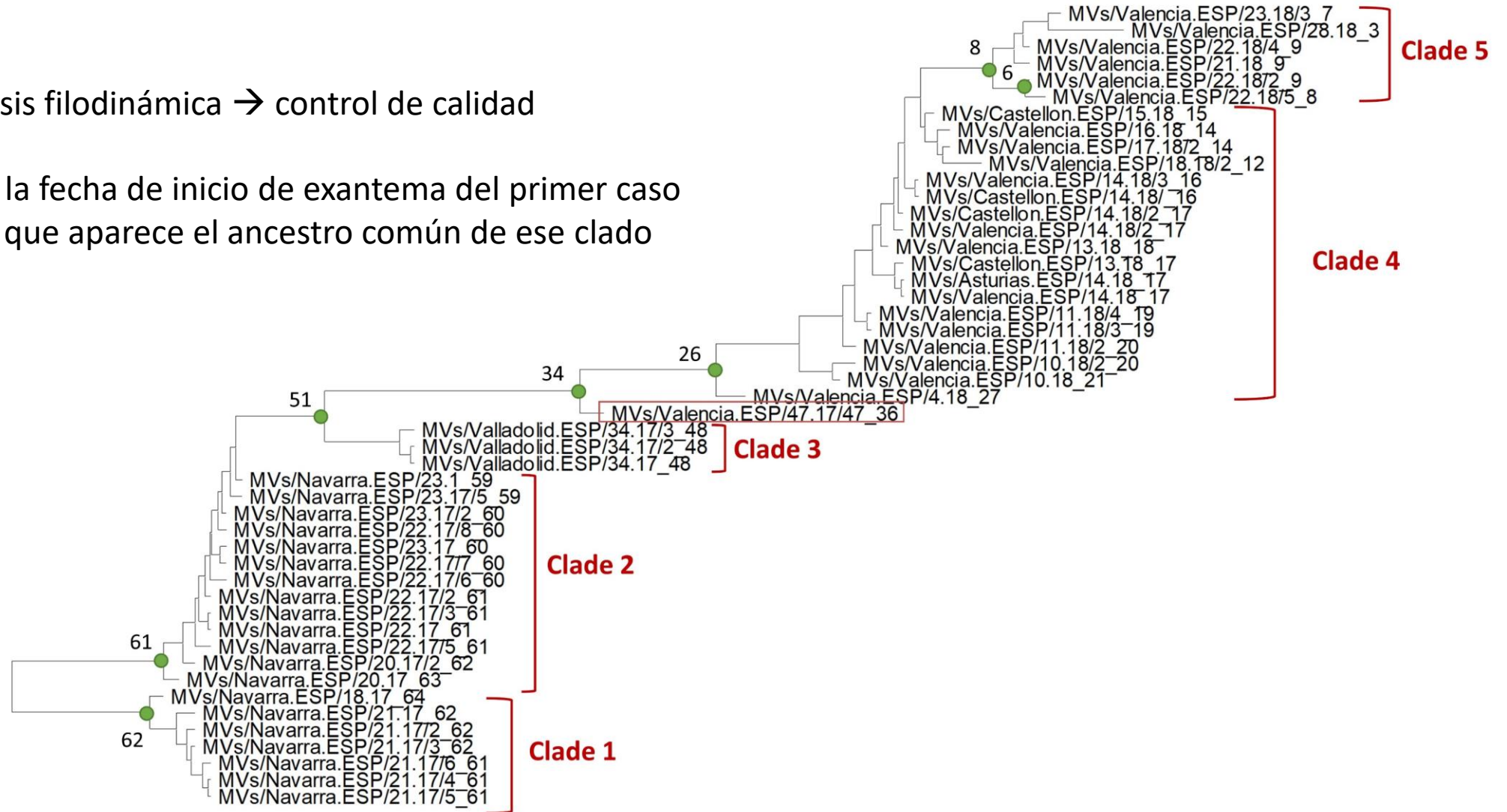
- 5 brotes asociados con B3
- El análisis filogenético permite diferenciar todos los brotes
 - 2 clados filogenéticos en el brote de Navarra
 - 2 clados filogenéticos en el brote de Valencia

Outbreaks:			
●	2018 NAV 011	◆	Cuenca2017
■	2017 VALLADOLID	▲	2017 NAV 24
		▼	2017 VAL 2755
		◻	Imported case



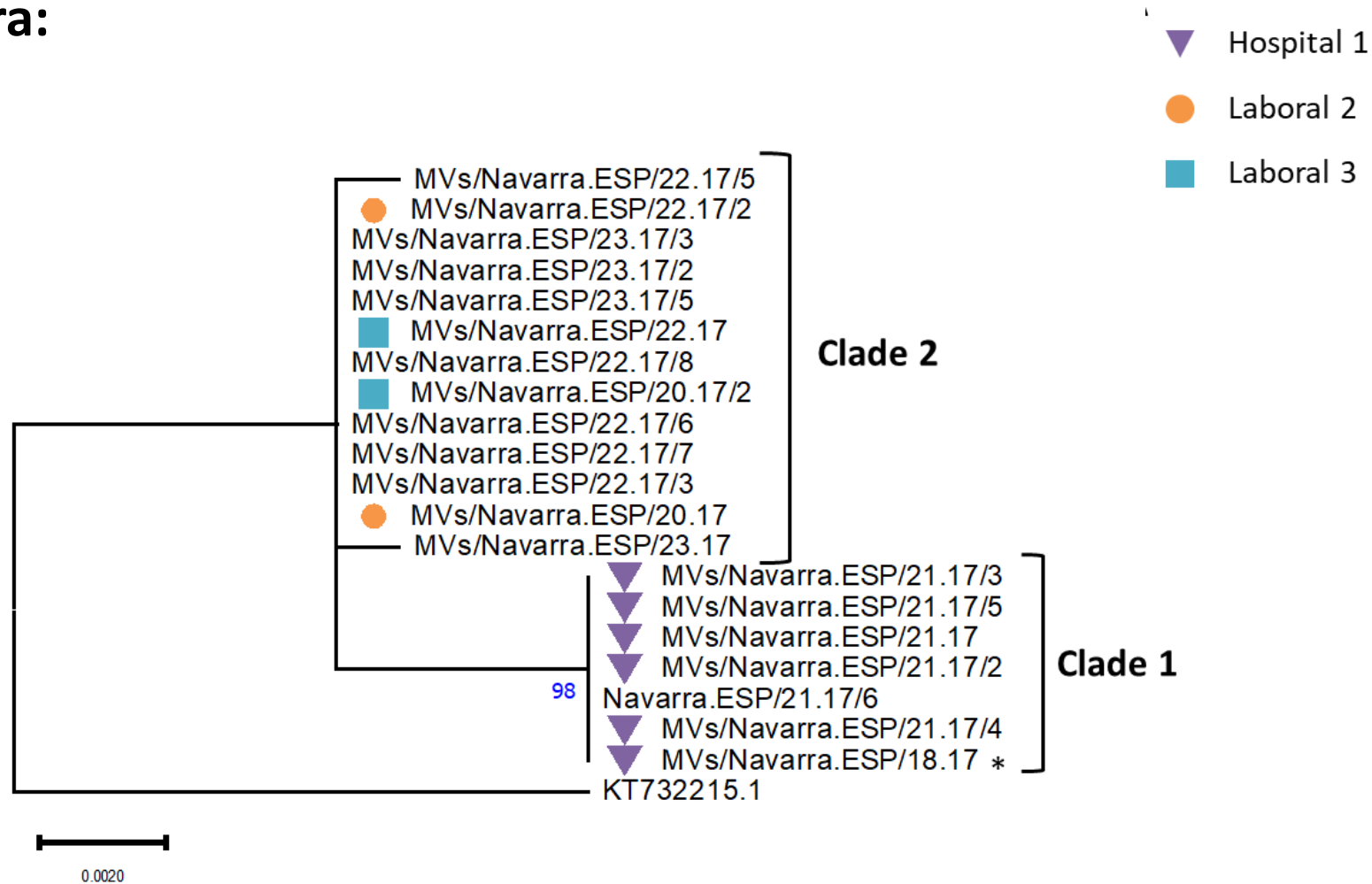
Resultados – Variante B3

- Confirma el análisis filodinámica → control de calidad
- Concuerda entre la fecha de inicio de exantema del primer caso y el tiempo en el que aparece el ancestro común de ese clado



Resultados – Variante B3

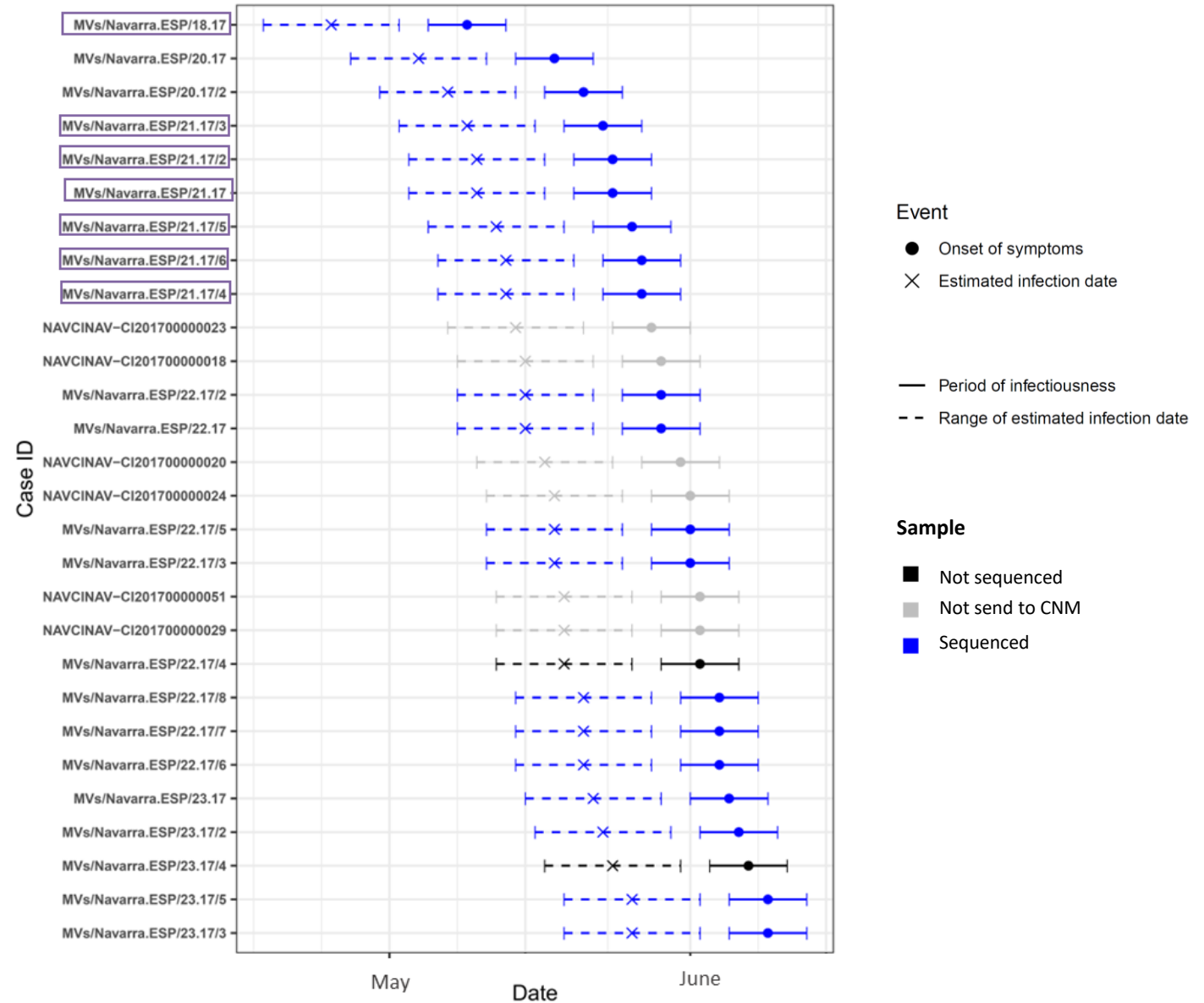
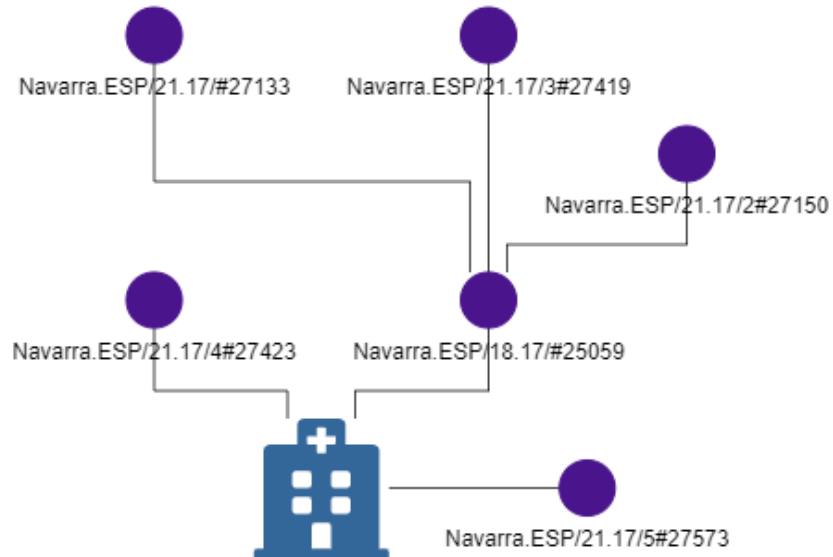
Brote de Navarra:



Resultados – Variante B3

Brote de Navarra:

Cluster analyses



Resultados – Variante B3

Brote de Navarra:

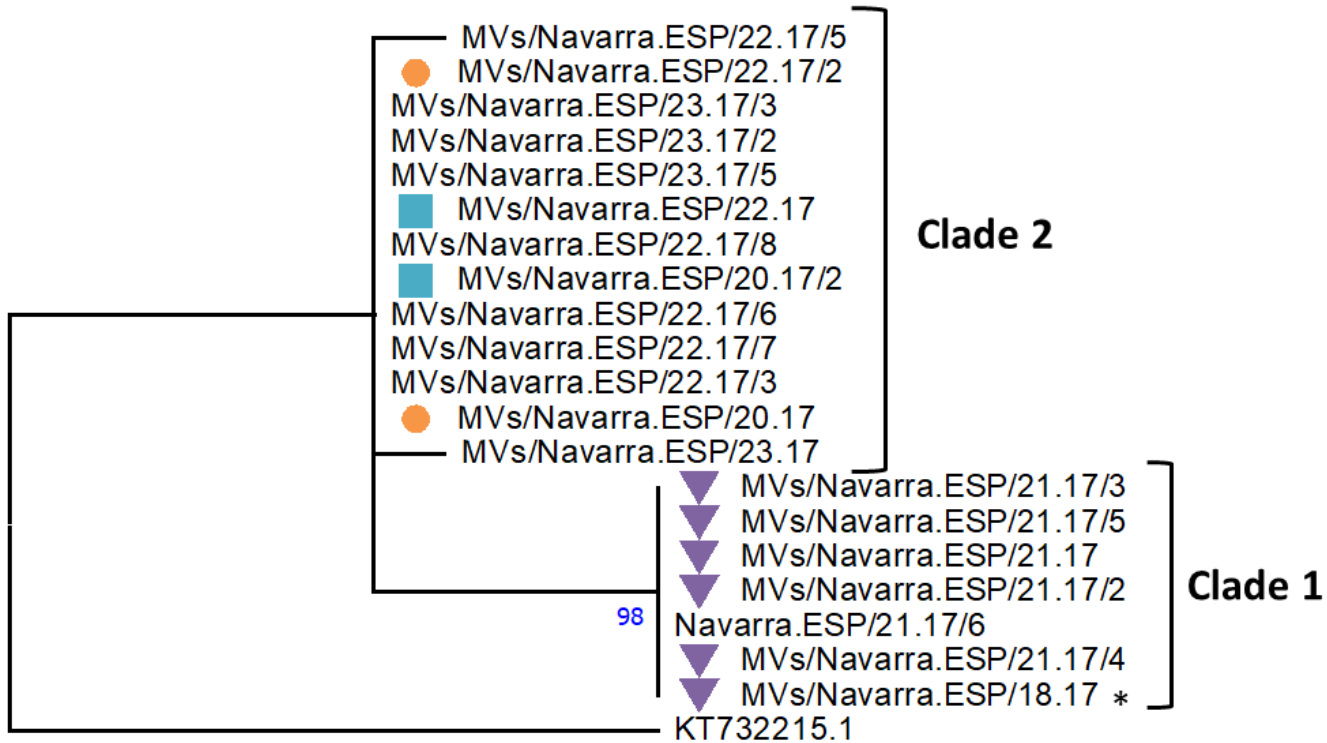
	number of substitutions													
Δt_{CE} (weeks)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
2	0.9274	0.9973	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
3	0.8931	0.9941	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
4	0.8601	0.9897	0.9995	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
5	0.8283	0.9843	0.9990	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
6	0.7976	0.9780	0.9984	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
7	0.7681	0.9708	0.9975	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
8	0.7397	0.9627	0.9964	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
9	0.7124	0.9540	0.9949	0.9996	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
10	0.6860	0.9445	0.9933	0.9994	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
11	0.6606	0.9345	0.9913	0.9991	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
12	0.6362	0.9239	0.9890	0.9988	0.9999	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
13	0.6127	0.9128	0.9864	0.9984	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
14	0.5900	0.9013	0.9834	0.9979	0.9998	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
15	0.5682	0.8894	0.9802	0.9973	0.9997	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
16	0.5472	0.8771	0.9766	0.9966	0.9996	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	

No relacionado

Resultados – Variante B3

Brote de Navarra:

- ▼ Hospital 1
- Laboral 2
- Laboral 3



Predicción del modelo : máx. 1 sustitución

Observación : 4 sustituciones

→ No es muy probable que estén relacionados

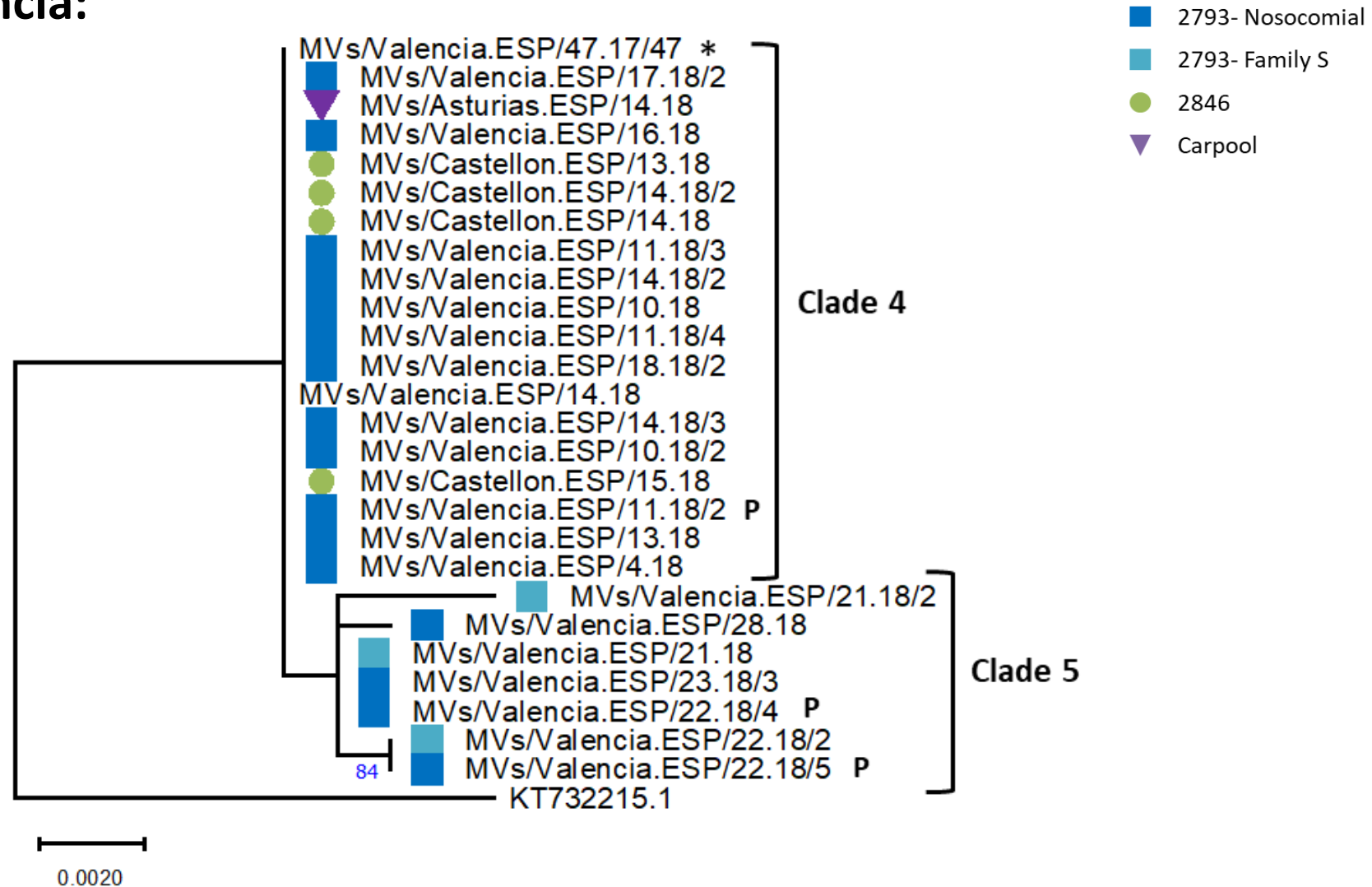
- No vínculo epidemiológico
- Clado 1 relacionado con importación de Portugal
- **Dos introducciones independientes** que dieron lugar a dos brotes al mismo tiempo



0.0020

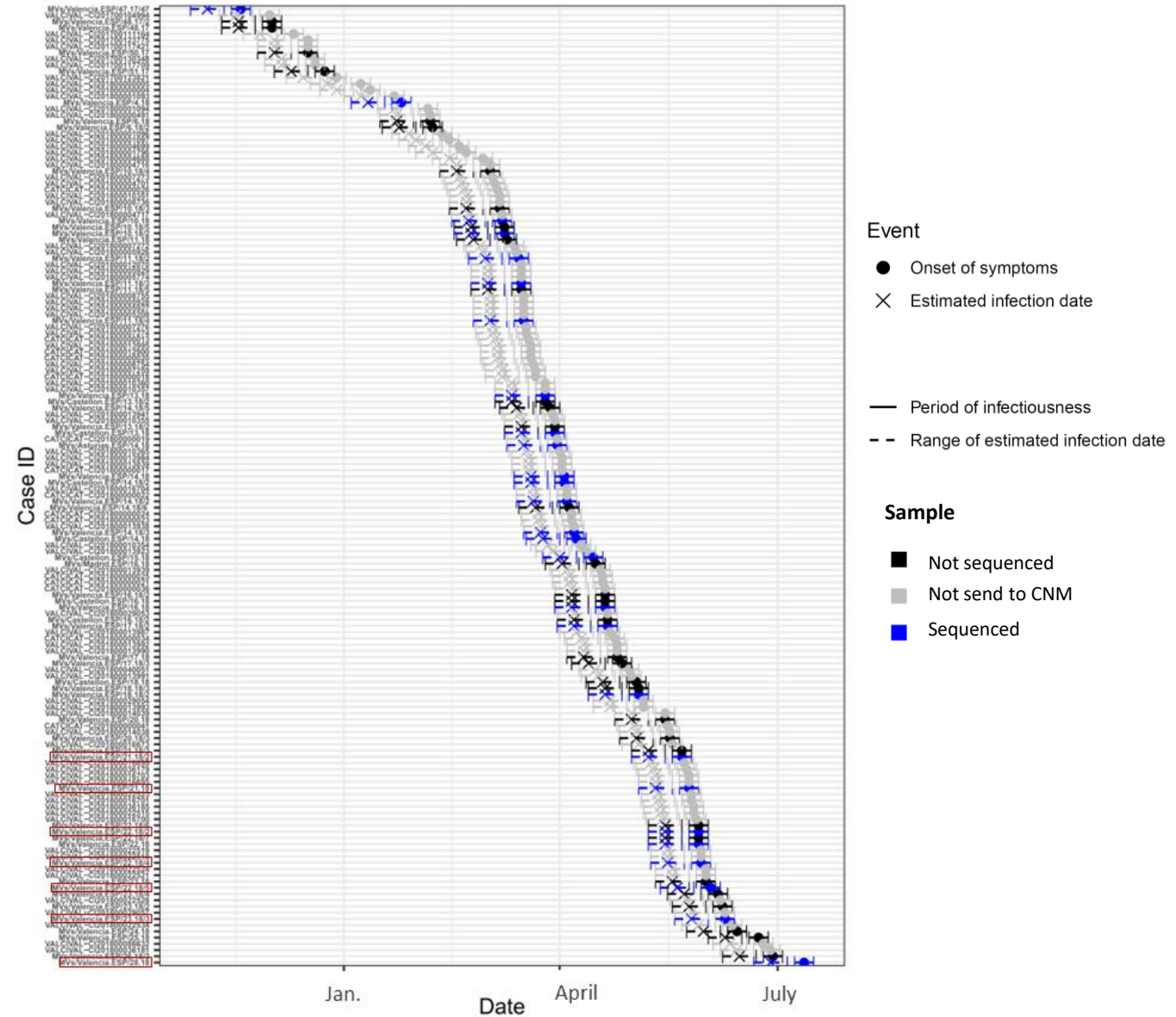
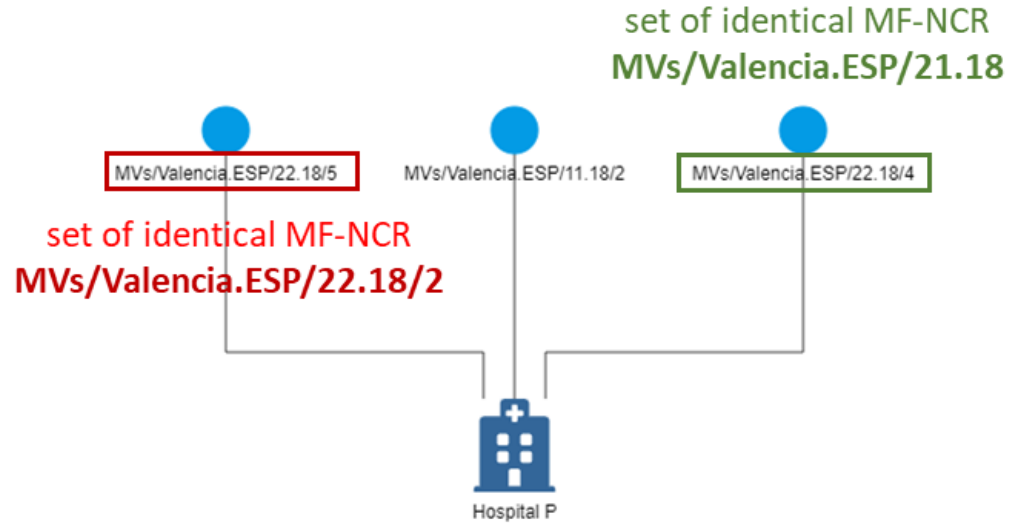
Resultados – Variante B3

Brote de Valencia:



Resultados – Variante B3

Brote de Valencia:



Resultados – Variante B3

Brote de Valencia:

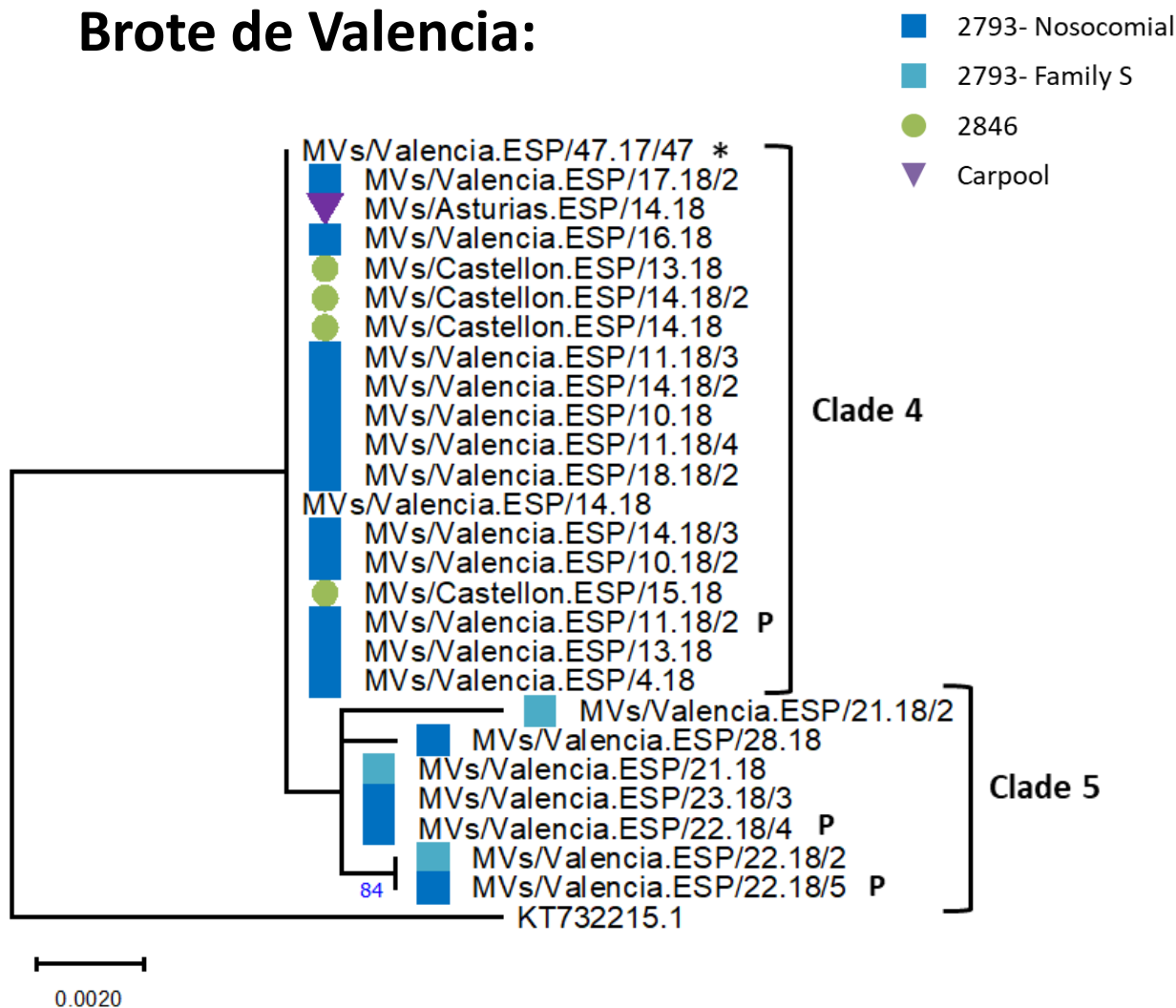
	number of substitutions												
Δt_{CE} (weeks)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
41	0,2133	0,5428	0,7974	0,9286	0,9792	0,9949	0,9989	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
42	0,2054	0,5305	0,7878	0,9235	0,9773	0,9943	0,9987	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
43	0,1978	0,5183	0,7780	0,9183	0,9752	0,9936	0,9986	0,9997	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
44	0,1905	0,5063	0,7682	0,9130	0,9730	0,9929	0,9984	0,9997	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
45	0,1834	0,4945	0,7583	0,9074	0,9706	0,9921	0,9981	0,9996	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
46	0,1766	0,4829	0,7483	0,9017	0,9682	0,9912	0,9979	0,9996	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
47	0,1701	0,4714	0,7383	0,8959	0,9656	0,9904	0,9976	0,9995	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
48	0,1638	0,4602	0,7282	0,8898	0,9629	0,9894	0,9974	0,9994	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
49	0,1578	0,4491	0,7181	0,8837	0,9601	0,9884	0,9970	0,9993	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
50	0,1519	0,4382	0,7079	0,8774	0,9572	0,9873	0,9967	0,9992	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
51	0,1463	0,4275	0,6978	0,8709	0,9541	0,9861	0,9963	0,9991	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
52	0,1409	0,4170	0,6876	0,8643	0,9509	0,9848	0,9959	0,9990	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
53	0,1357	0,4067	0,6774	0,8576	0,9476	0,9835	0,9955	0,9989	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

Máx. sustituciones

Relacionados

Resultados – Variante B3

Brote de Valencia:



Predicción del modelo : máx. 4-5 sustitución

Observación : 1-4 sustituciones

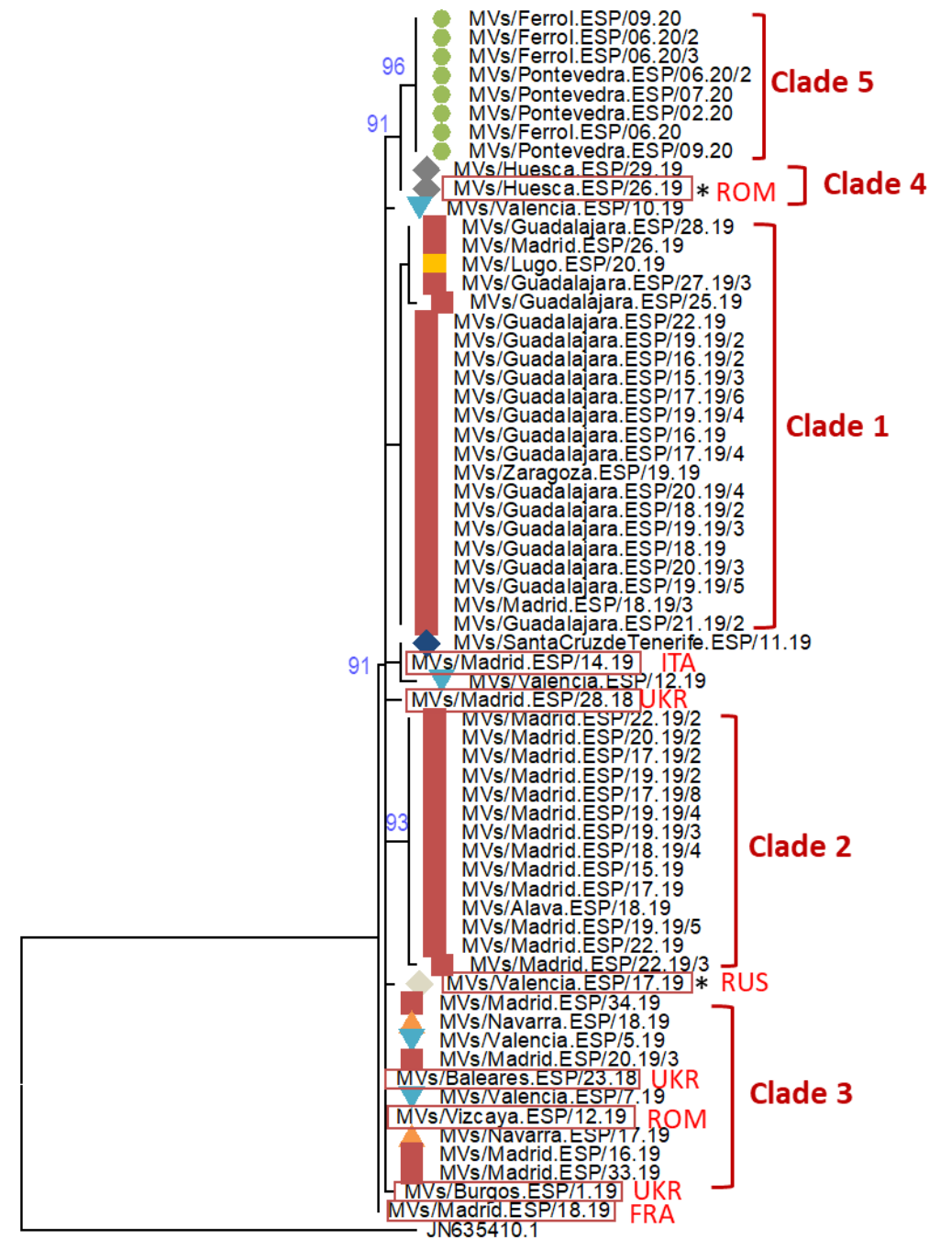
→ Es probable que **estén** relacionados

- Sucesión temporal : Caso índice → nosocomial → Castellón y Blablacar → Familia S
- Familia S relacionada con Hospital P
- **Evolución del virus**

Resultados – Variante D8

- 8 brotes asociados con D8
- Brotes 2019-CAT y 2019VAL-4693 NO están bien definidos
- 2 cladogramas filogenéticos en el brote de MAD-CLM

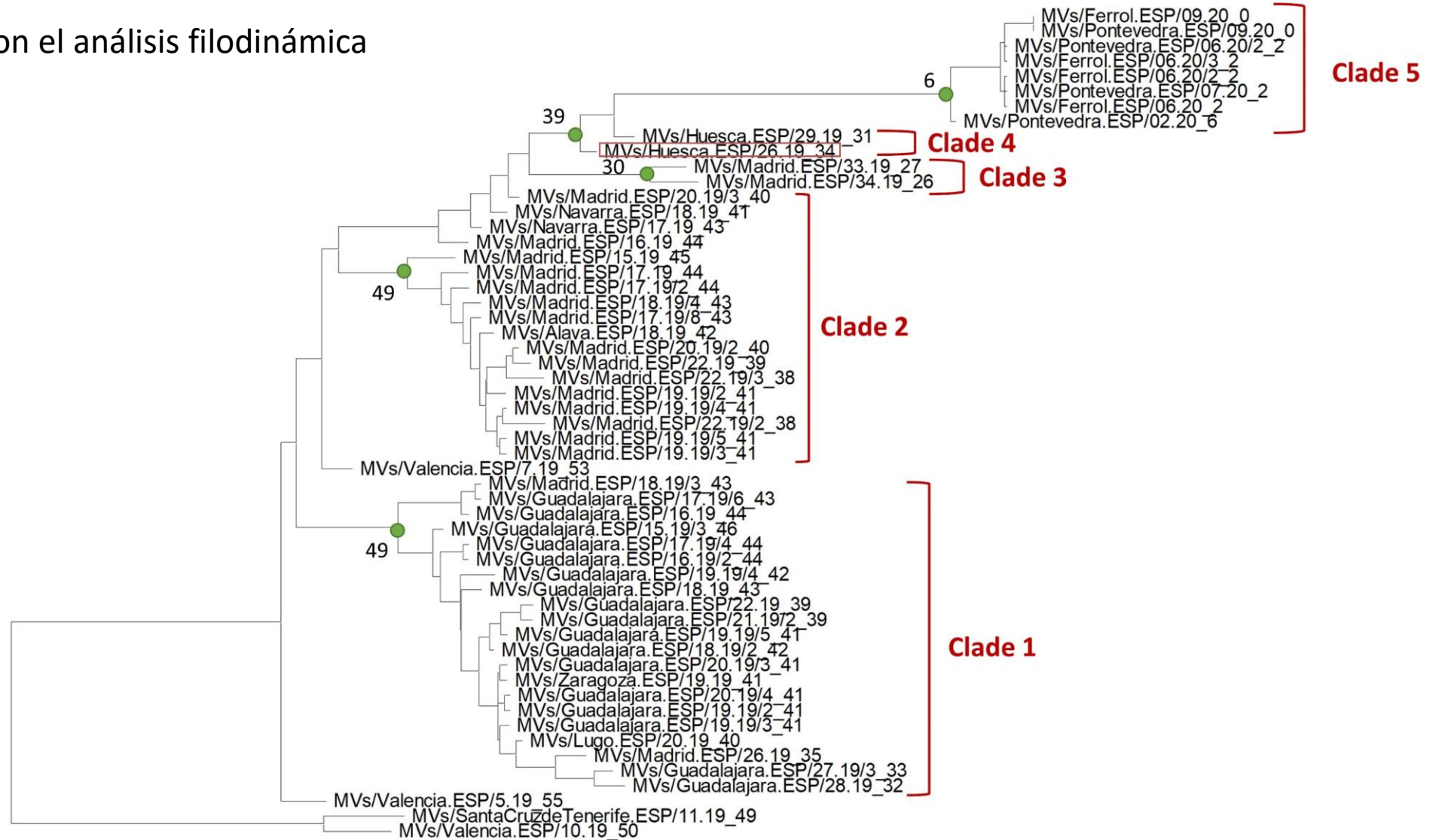
Outbreaks:		
● 2020 Gal 01	■ 2019 MAD-CLM	◆ 2019 CAN
◆ 2019 ARA	▲ 2019 CAT	■ 2019 Gal 01
▼ 2019 VAL 4693	◆ 2019 VAL 4797	□ Imported case



0.02

Resultados – Variante D8

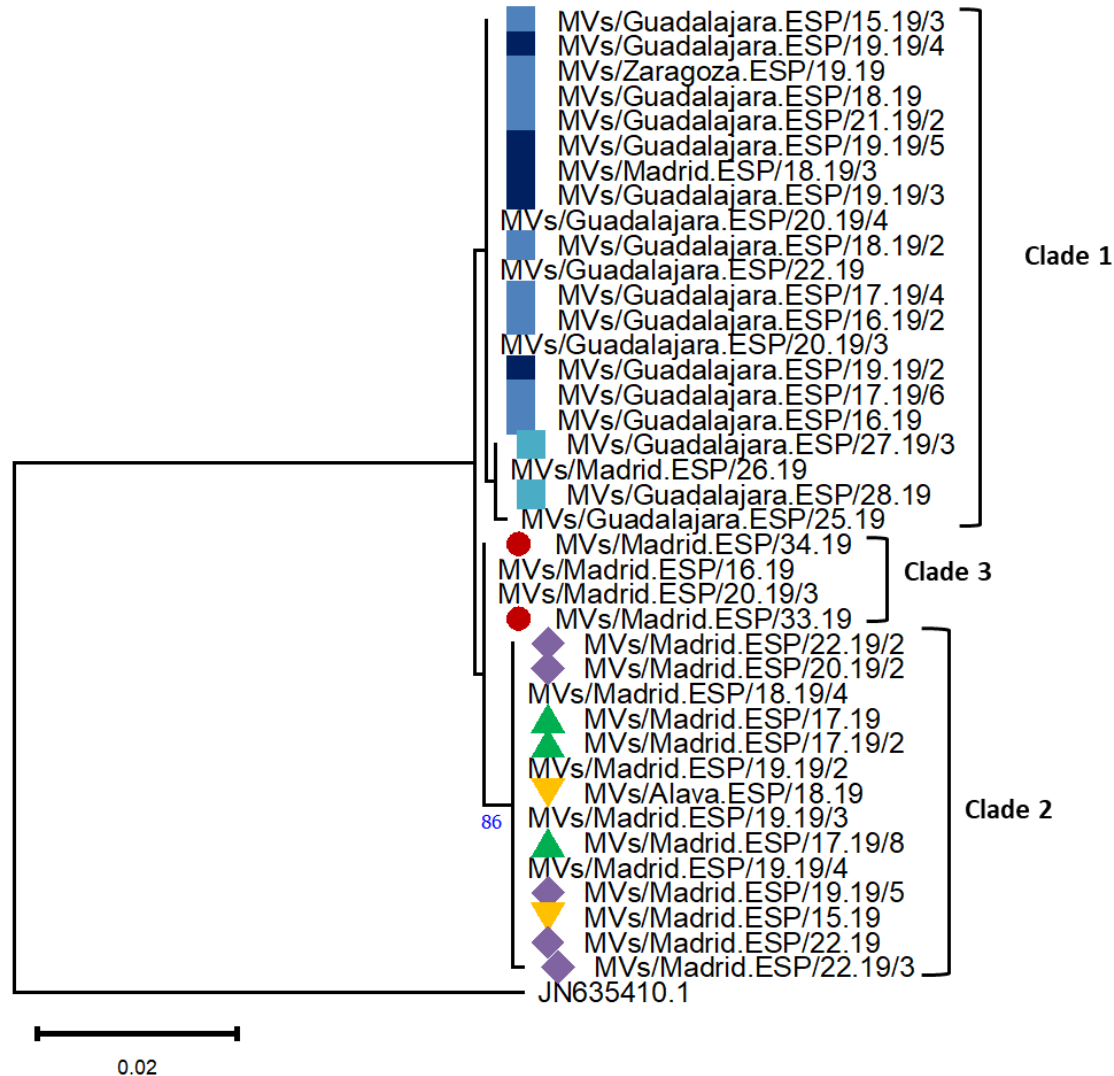
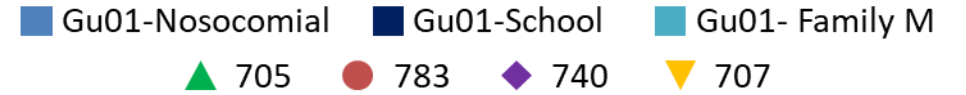
- Confirmado con el análisis filodinámica



Resultados – Variante D8

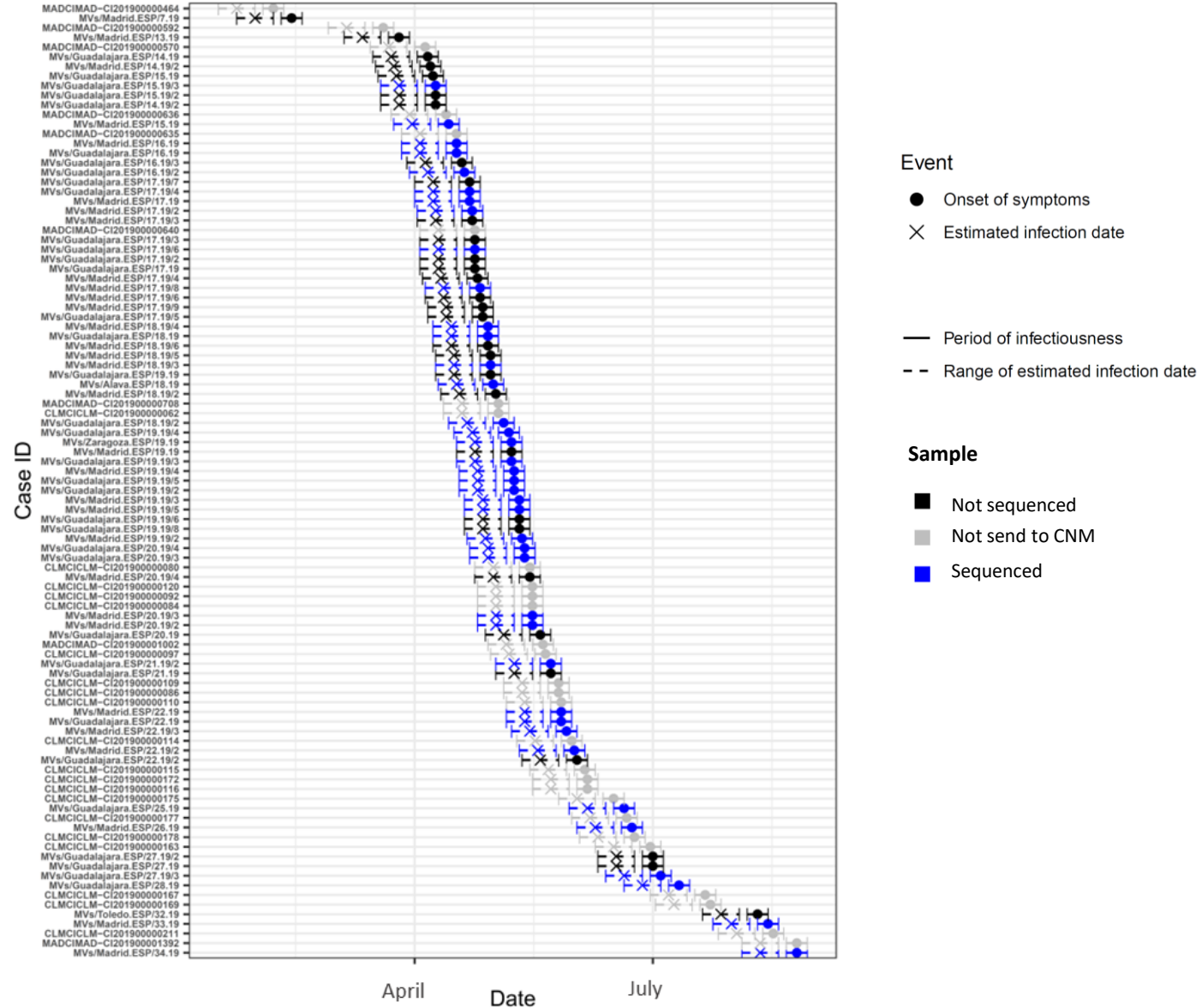
Brote de MAD-CLM:

Chains of transmission:



Resultados – Variante D8

Brote de MAD-CLM:



Resultados – Variante D8

Brote de MAD-CLM:

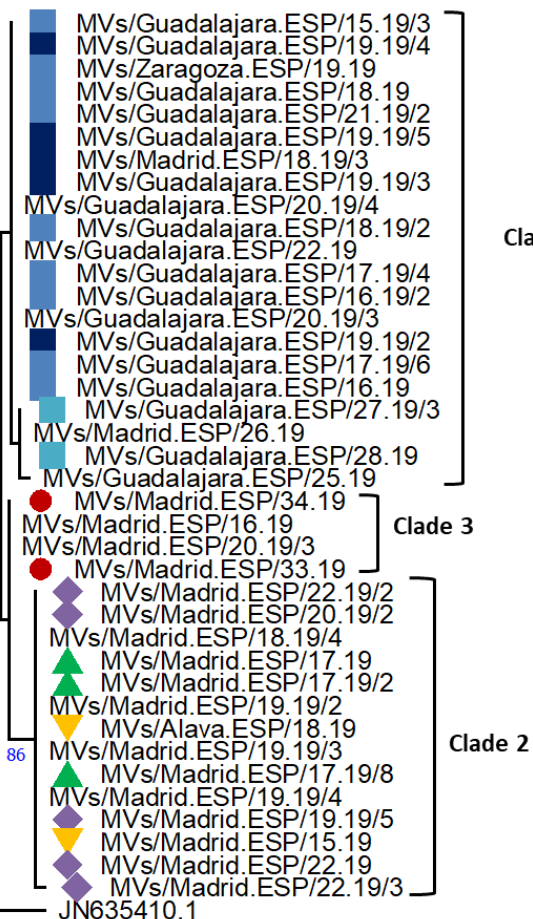
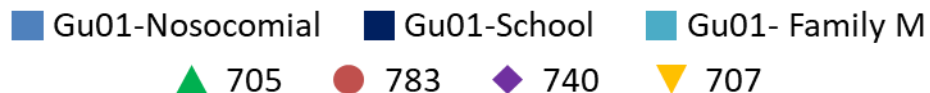
	number of substitutions												
Δt_{CE} (weeks)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20	0,3945	0,7614	0,9321	0,9850	0,9973	0,9996	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
21	0,3765	0,7443	0,9239	0,9824	0,9967	0,9995	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
22	0,3594	0,7272	0,9154	0,9796	0,9960	0,9993	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
23	0,3431	0,7101	0,9064	0,9764	0,9952	0,9992	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
24	0,3275	0,6931	0,8971	0,9730	0,9942	0,9990	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
25	0,3126	0,6761	0,8874	0,9694	0,9932	0,9987	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
26	0,2984	0,6593	0,8775	0,9654	0,9920	0,9984	0,9997	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
27	0,2848	0,6425	0,8672	0,9612	0,9907	0,9981	0,9997	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
28	0,2719	0,6260	0,8566	0,9567	0,9893	0,9977	0,9996	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
29	0,2595	0,6096	0,8457	0,9519	0,9877	0,9973	0,9995	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
30	0,2477	0,5934	0,8346	0,9468	0,9859	0,9968	0,9994	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
31	0,2365	0,5775	0,8233	0,9414	0,9840	0,9963	0,9993	0,9999	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
32	0,2257	0,5617	0,8117	0,9358	0,9820	0,9957	0,9991	0,9998	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000

No relacionado

Resultados – Variante D8

Brote de MAD-CLM:

Chains of transmission:



Clade 1

Clade 3

Clade 2

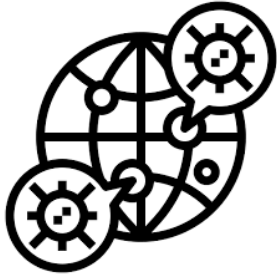
Predicción del modelo : máx. 3 sustitución

Observación : 5 sustituciones

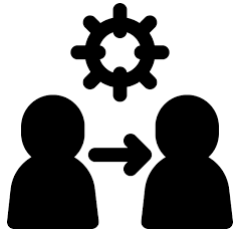
→ Es muy probable que no estén relacionados

- No vínculo epidemiológico
- **Dos introducciones independientes**, que dieron lugar a dos brotes circulando al mismo tiempo
- Clado 2 asociado con una importación de Ucrania

Discusión



El estudio de la región MF-NCR contribuye a la identificación de brotes junto con los estudios de contactos y el análisis de N-450

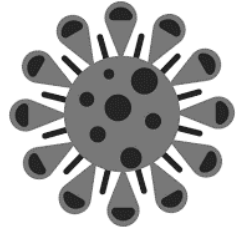


Permite descifrar los vínculos dentro de un brote incluyendo las cadenas de transmisión



Especialmente útil para las situaciones de importaciones simultáneas y en la misma región geográfica

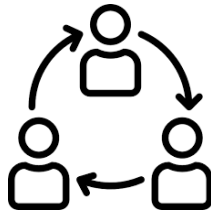
Conclusiones



Nuestro estudio apoya la ausencia de transmisión endémica en España



Recomendamos que la region MF-NCR sea incluida en los protocolos de la OMS para la vigilancia molecular de sarampión en países en eliminación



Esfuerzos al nivel internacional para compartir datos genómicos para poder identificar el origen del caso.

Publicación in Frontiers in Microbiology



TYPE Original Research
PUBLISHED 22 May 2023
DOI 10.3389/fmicb.2023.1143933



OPEN ACCESS

EDITED BY

Wafa Achour,
Centre National de Greffe de Moelle Osseuse,
Tunisia

REVIEWED BY

Mick N. Mulders,
World Health Organization (Switzerland),
Switzerland
Sabine Santibanez,
Robert Koch Institute, Germany

*CORRESPONDENCE

Aurora Fernández-García
✉ aurorafg@isciii.es

Utility of MF-non coding region for measles molecular surveillance during post-elimination phase, Spain, 2017–2020

Camille Jacqueline^{1,2}, Ana María Gavilán^{1,3},
Noemí López-Perea^{3,4}, Ana Raquel Penedos⁵,
Josefa Masa-Calles^{3,4}, Juan E. Echevarría^{1,3},
Aurora Fernández-García^{1,3*} and on behalf of the MMR Study
Group

Gracias!

1. Santibanez S, Hübschen JM, Ben Mamou MC, Muscat M3, Brown KE, Myers R, Donoso Mantke O, Zeichhardt H, Brockmann D, Shulga SV, Muller CP, O'Connor PM, Mulders MN, Mankertz A. Molecular surveillance of measles and rubella in the WHO European Region: new challenges in the elimination phase. *Clinical Microbiology and Infection* 23 (2017) 516e523.
2. Gardy JL, Naus M, Amlani A, Chung W, Kim H, Tan M, Severini A, Krajden M, Puddicombe D, Sahni V, Hayden AS, Gustafson R, Henry B, Tang P (2015) Whole-Genome Sequencing of Measles Virus Genotypes H1 and D8 During Outbreaks of Infection Following the 2010 Olympic Winter Games Reveals Viral Transmission Routes. *J Infect Dis* 212: 1574-1578.
3. Penedos AR, Myers R, Hadeif B, Aladin F, Brown KE (2015) Assessment of the Utility of Whole Genome Sequencing of Measles Virus in the Characterisation of Outbreaks. *PLoS One* 10: e0143081.
4. Gil H, Fernandez-Garcia A, Mosquera MM, Hübschen JM, Castellanos AM, de OF, Masa-Calles J, Echevarria JE (2018) Measles virus genotype D4 strains with non-standard length M-F non-coding region circulated during the major outbreaks of 2011-2012 in Spain. *PLoS One* 13: e0199975.
5. Harvala H, Wiman A, Wallensten A, Zakikhany K, Englund H, Brytting M (2016) Role of Sequencing the Measles Virus Hemagglutinin Gene and Hypervariable Region in the Measles Outbreak Investigations in Sweden During 2013-2014. *J Infect Dis* 213: 592-599.
6. Kim J-M, Park S, Kim S, Park KR, Wang J-S and Chung Y-S (2021) Genetic Analysis of the Measles Virus From the Outbreaks in South Korea, 2019. *Front. Microbiol.* 12:763107. doi: 10.3389/fmicb.2021.763107
7. Penedos, Ana Raquel and Fernández-García, Aurora and Lazar, Mihaela and Ralh, Kajal and Williams, David and Brown, Kevin, Mind Your Ps: Using Probability in the Interpretation of Molecular Epidemiology Data (May 16, 2021).

