

Proyecto de Investigación

TÍTULO: INNUENDO: una plataforma intersectorial para la integración de la genómica en la vigilancia epidemiológica de patógenos transmitidos por los alimentos. INNUENDO: *a cross-sectorial platform for the integration of genomics in surveillance of food-borne pathogens*

INNENDO web: <https://sites.google.com/site/innuendocon/>

CENTROS PARTICIPANTES:

- Universidad de Helsinki
- Universidad de Lisboa
- Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea
- Universidad de Viena
- Centro Nacional de Referencia THL-Finlandia
- Centro Nacional de Referencia EVIRA-Finlandia
- Centro Nacional de Referencia INSA-Portugal
- Centro Nacional de Referencia BIOR-Letonia
- Centro Nacional de Referencia VFL- Estonia

DURACIÓN DEL PROYECTO: Enero de 2016 a Julio de 2018 (30 meses)

PRESUPUESTO DEL PROYECTO: Coste total de 1 M€, aportando la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) 0,5 M€, el Gobierno Vasco 25.000 € y los centros participantes el resto.

PARTICIPANTES DE LA UPV/EHU EN EL PROYECTO:

Dr. Javier Garaizar, Dr. Aitor Rementeria, Dr. Joseba Bikandi, Dra. Ilargi Martinez, Dra. Rosario San Millan y Dra. Marian Martinez. Dptos. Inmunología, Microbiología y Parasitología y Zoología y Biología celular Animal, Facultades de Farmacia, Medicina y Enfermería y Ciencia y Tecnología.

1. Introducción

El último brote epidémico de la infección por *E. coli* O104/H4 es un claro ejemplo de las amenazas multinacionales a la Salud Pública de los microorganismos transmitidos por los alimentos. Una parte de las lecciones aprendidas en este contexto incluyeron la necesidad de

potenciar un mayor nivel de cooperación entre las autoridades competentes locales, nacionales y de la UE, la necesidad de dedicar más esfuerzos a la formación, trabajar para obtener el objetivo de desarrollar una base de datos común y la necesidad de la validación de los nuevos enfoques en la evaluación de riesgos microbianos.

Las nuevas tecnologías diagnósticas de secuenciación están permitiendo el desarrollo de proyectos de secuenciación de genomas completos de microorganismos (en adelante WGS, de *Whole Genome Sequencing*), en pocos días y a un precio asequible. Las instituciones y agencias internacionales consideran necesario la evaluación de la utilidad de estas nuevas tecnologías en el control de las epidemias y la vigilancia epidemiológica de los microorganismos patógenos.

Entre otras, los WGS tiene la ventaja práctica sobre otros métodos de tipificación de ser universalmente aplicable a todos los patógenos bacterianos. Sin embargo, y aunque esta tecnología parece ser de gran utilidad tras su uso en algunos estudios, todavía debe demostrar su eficacia en el ámbito de la vigilancia epidemiológica y el control de brotes epidémicos de enfermedades transmitidas por los alimentos a nivel internacional. Cuanto mayor sea la optimización, calidad y resolución del WGS, mayor será su uso como método de genotipificación en los estudios epidemiológicos de las enfermedades infecciosas.

Por todo ello, la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (en adelante EFSA), realizó en el año 2015 una convocatoria de ayudas a la investigación, con la referencia GP/EFSA/AFSACO/2015/01 y con el título "*New approaches in identifying and characterizing microbiological and chemical hazards*". Este organismo oficial de la Unión Europea, fundado en 2004 y con sede en Parma, Italia, tiene como misión velar por la Seguridad Alimentaria de los países de la Unión Europea, a día de hoy 28, y que suman más de 500 millones de personas. El objetivo de la convocatoria fue seleccionar y financiar dos proyectos internacionales de investigación en el ámbito de los WGS asociados a los patógenos alimentarios, para aumentar la protección de la Salud Pública europea.

Como se señaló en el 20º Coloquio Científico de la EFSA sobre "El uso de la secuenciación del genoma completo (WGS) de patógenos transmitidos por los alimentos para la protección de la Salud Pública", celebrado en Junio de de 2014, el aumento de la cooperación entre científicos

universitarios y los adscritos a centros de investigación nacionales con responsabilidades en el control de los alimentos, tanto a nivel veterinario como humano, hace frente a los principales retos necesarios para la plena aplicación del WGS en el sector de la Salud Pública.

Los retos de futuro apuntados por la EFSA en relación a los WGS son los siguientes:

- (i) la necesidad de la adopción de medidas de aseguramiento de la calidad y medidas control de la calidad (QA/QC) de los WGS;
- (ii) el desarrollo y armonización de los procedimientos normalizados de trabajo del uso de los WGA; y
- (iii) el establecimiento de la infraestructura bioinformática de bases de datos que sea capaz de alojar de forma sostenible la información generada.

La UE debe garantizar el acceso lo más amplio y rápido posible a las nuevas metodologías diagnósticas, para lograr el fortalecimiento de la protección de los ciudadanos europeos en relación a la salud transfronteriza. El potencial del uso rutinario y generalizado del análisis mediante los WGS para la protección de la Salud Pública está limitado esencialmente por la falta de acceso a infraestructuras informáticas y porque los microbiólogos tienen competencias formativas limitadas en el manejo de estas nuevas metodologías bioinformáticas.

Atendiendo a este requerimiento, un grupo de investigadores pertenecientes a seis países europeos (Finlandia, Portugal, España, Austria, Estonia y Letonia), adscritos a cuatro universidades y a cinco centros nacionales de Microbiología encargados del control de la difusión de enfermedades transmitidas de alimentos a nivel humano y animal, hemos diseñado el presente proyecto.

Nuestro proyecto ha sido seleccionado para su financiación y desarrollará su actividad durante un total de 30 meses, a partir del mes de enero de 2016. El presupuesto total del proyecto es de 1 millón de euros, aportando la EFSA medio millón de euros. Los centros participantes se comprometen a aportar el resto del presupuesto, a través principalmente de la dedicación horaria del personal implicado. El Gobierno Vasco apoya este proyecto y se ha comprometido a aportar un total de 25.000 euros.

2. Objetivos del proyecto

El objetivo principal de nuestra propuesta es construir un marco estandarizado de referencia para el uso de las técnicas WGS en bacterias, con el fin de que pueda ser integrado en la vigilancia epidemiológica y el control de la transmisión de enfermedades por los alimentos a nivel internacional. Esto facilitará la disminución del número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos a nivel internacional.

Nuestro proyecto INNUENDO se alinea con la misión de la EFSA de promover el desarrollo y validación de nuevos enfoques en la caracterización microbiana, coordinando esfuerzos entre todos los agentes interesados en la Salud Pública y la Seguridad Alimentaria, incluyendo laboratorios de control alimentario y de sanidad animal y humana.

La implementación en la vigilancia epidemiológica de rutina de las WGS es un objetivo estratégico para muchas autoridades de Salud Pública de todo el mundo. Las diversas iniciativas piloto que se presentaron en el 20º Coloquio Científico de la EFSA son ejemplos de la complejidad del problema, las competencias multidisciplinares implicadas y la inversión necesaria para llevarlo a cabo. Particularmente, en este coloquio se demostró que los países con recursos limitados podrían no ser capaces de tener éxito en alcanzar esta meta, poniendo a varios de los estados miembros de la UE en dificultades para ejercer un adecuado control de la difusión de las enfermedades transmitidas por los alimentos a nivel internacional.

Para diseñar y evaluar una posible infraestructura informática y de diagnóstico asequible y sostenible, nuestro grupo investigador incluye centros gubernamentales y autoridades del control alimentario, de los sectores veterinario y humano, de países sin grandes recursos económicos, como Finlandia (THL y EVIRA), Estonia (VFL), Letonia (BIOR) y Portugal (INSA). Esto permitirá que las partes interesadas (centros de referencia) evalúen opciones de diseño del proyecto en la fase temprana de su ciclo de desarrollo. Esta colaboración multinacional, en el contexto internacional "*One-Health*", asegurará que la infraestructura bioinformática desarrollada aborde la integración de WGS en análisis de rutina y la vigilancia epidemiológica a lo largo de la cadena alimentaria, especialmente en el caso de los países con recursos limitados.

Una de las novedades de este proyecto es la planificación y el diseño de escenarios simulados de epidemias de enfermedades transmitidas por los alimentos tanto a nivel nacional como internacional. En esta parte del proyecto los centros de referencia de microbiología de Portugal, Letonia, Estonia y Finlandia colaboraran y evaluarán las herramientas informáticas generadas a lo largo del proyecto.

El proyecto incluye la participación de instituciones académicas con fuertes conexiones con las autoridades locales alimentarias de Finlandia (UH), Portugal (UL), la Comunidad Autónoma del País Vasco en España (UPV/EHU) y Austria (VETMEDUNI), ampliando la cobertura geográfica de nuestro consorcio y constituyendo un significativo número de estados miembros de la UE y de sus regiones autónomas. Los investigadores de estas universidades lideran el conocimiento básico en Microbiología molecular y genómica microbiana y tienen demostrada capacidad para transferir los mismos hacia la sociedad, en este caso, hacia los centros nacionales de investigación y de control alimentario.

La normalización de los datos, la calibración de proceso, la simplificación de los análisis de datos y de su interpretación son las condiciones necesarias que permitirán la transición del paradigma actual de estudio epidemiológico a un nuevo escenario de integración global de los WGS en el control de la difusión de los patógenos.

Estas condiciones solo serán alcanzables, sin embargo, mediante la integración de las competencias de diferentes disciplinas científicas y profesiones. Por ello, mediante la cooperación activa entre expertos en genómica y evolución microbiana, bioinformática, validación metodológica, epidemiología, salud pública y control de los alimentos, nuestro consorcio investigador utilizará un enfoque intersectorial en el desarrollo de un marco común, para maximizar el beneficio del uso futuro de los WGS en la seguridad alimentaria internacional.

En particular, es esencial que los avances en la Bioinformática y la Genómica bacteriana se encuentren con las necesidades de la Salud Pública y la Microbiología alimentaria. La falta de una infraestructura bioinformática sofisticada para el procesamiento e integración de datos sigue siendo uno de los principales obstáculos para la aplicación del WGS. Para hacer frente a esta limitación, el consorcio incluye dos socios (Universidad de Lisboa y la Universidad del País

Vasco UPV / EHU), con los conocimientos apropiados de bioinformática, principalmente en el análisis de datos de secuenciación de alto rendimiento y en el desarrollo de herramientas informáticas aplicadas a la tipificación microbiana.

Aunque se ha realizado una extensa investigación en la calibración de la evolución genética bacteriana dentro y fuera de los huéspedes humano o animal, aún existe la necesidad de traducir estos resultados en estándares para un uso generalizado. El líder del proyecto (Universidad de Helsinki) y otros miembros del consorcio propuesto (VETMEDUNI, EVIRA, THL, UPV/EHU) tienen un profundo conocimiento de la genética de poblaciones de varios patógenos transmitidos por alimentos (*Campylobacter*, *Yersinia*, *E. coli* y *Salmonella*) y utilizarán este conocimiento para promover el establecimiento de directrices para su uso en la vigilancia epidemiológica de las enfermedades infecciosas transmitidas por los alimentos.

Así mismo, y en consonancia con la misión de la EFSA, el consorcio tiene la experiencia necesaria para desarrollar normas, procedimientos y acciones especiales de formación que faciliten el intercambio de Buenas Prácticas entre las organizaciones y la delimitación de las competencias básicas necesarias para diseñar planes formativos para los interesados en aplicar los WGS al estudio de brotes epidémicos y la vigilancia epidemiológica. Varios miembros de consorcios son organizaciones con estándares internacionales (EVIRA, THL, BIOR, EVFL, INSA, UH), tienen una larga experiencia en la Normalización y Validación de métodos para la caracterización microbiana y en la aplicación de estos métodos en el control de los alimentos.

Finalmente, toda la reflexión y la información científica que se genere a lo largo del proyecto serán comunicadas a la EFSA y a la sociedad en general mediante un Plan de Comunicación. Este plan, coordinado por la UPV/EHU y la Universidad de Helsinki, incluirá el diseño de cursos formativos en bioinformática on-line y presenciales asociados al estudio epidemiológico, así como la presentación de sus conclusiones y recomendaciones en congresos y simposios y mediante la redacción de publicaciones científicas.

3. Descripción del Proyecto

El proyecto se estructura en cinco paquetes de trabajo científicos (WP), cada uno de ellos en representación de las cuatro fases del proyecto y otro WP más general para la gestión, difusión y comunicación del mismo.

Como puede verse en la figura 1, el WP1 tiene que ver con la recogida de información sobre cuatro de los patógenos más importantes como agentes transmitidos por los alimentos: *Campylobacter*, *Yersinia enterocolítica*, *Escherichia coli* y *Salmonella*. El WP1 incluye, además, la secuenciación completa de 700 cepas de estas especies, junto con el acceso a la información disponible en la red para generar una base de datos, no sesgada, de información genómica de cada uno de estos patógenos. Así mismo, identificará los problemas de funcionamiento a la hora de compartir información y datos relativos a la investigación de epidemias transmitidas por los alimentos a nivel europeo, incluyendo los asuntos legales.

El WP2 trabajará sobre una calibración filogenética e identificará la contribución relativa de la Recombinación y la Mutación a nivel de las poblaciones de estos cuatro patógenos alimentarios, analizando los genes básicos (*core*) y los genes accesorios, identificando los límites de detección de los resultados de la tipificación molecular mediante el uso de los WGS y desarrollando un sistema predictivo para poder determinar la relación epidemiológica entre los aislamientos.

El WP3 desarrollará la plataforma informática INNUENDO y buscará desarrollar nuevos sistemas de control de calidad de la información en crudo suministrada por los sistemas comerciales de WGS. Así mismo, aportará soluciones sostenibles y económicas en red para el control de los patógenos alimentarios, validará un nuevo sistema de análisis preliminar y de clasificación de los aislamientos mediante el uso de la frecuencia de oligonucleótidos y desarrollará y pondrá en funcionamiento sistemas de clasificación y de ontología de genes.

En el WP4 pondrá en marcha la demostración práctica de la eficacia de las plataformas desarrolladas previamente, contado con la colaboración de los centros nacionales de referencia de Microbiología participantes y creará un marco común de vigilancia epidemiológica a nivel internacional. Así, se simularán epidemias locales e internacionales causadas por el consumo

de alimentos conteniendo alguno de los citados patógenos. Se pondrán entonces a prueba los sistemas y las plataformas bioinformáticas INNUENDO.

Por último, en el WP5 se desarrollará un Plan de Comunicación a lo largo de todo el proyecto, se organizarán sesiones y seminarios formativos para los participantes, se diseminará los resultados obtenidos entre la comunidad científica internacional mediante la presentación de comunicaciones a la prensa y a congresos, se generarán publicaciones científicas y se llevará a cabo el control de calidad del proyecto.

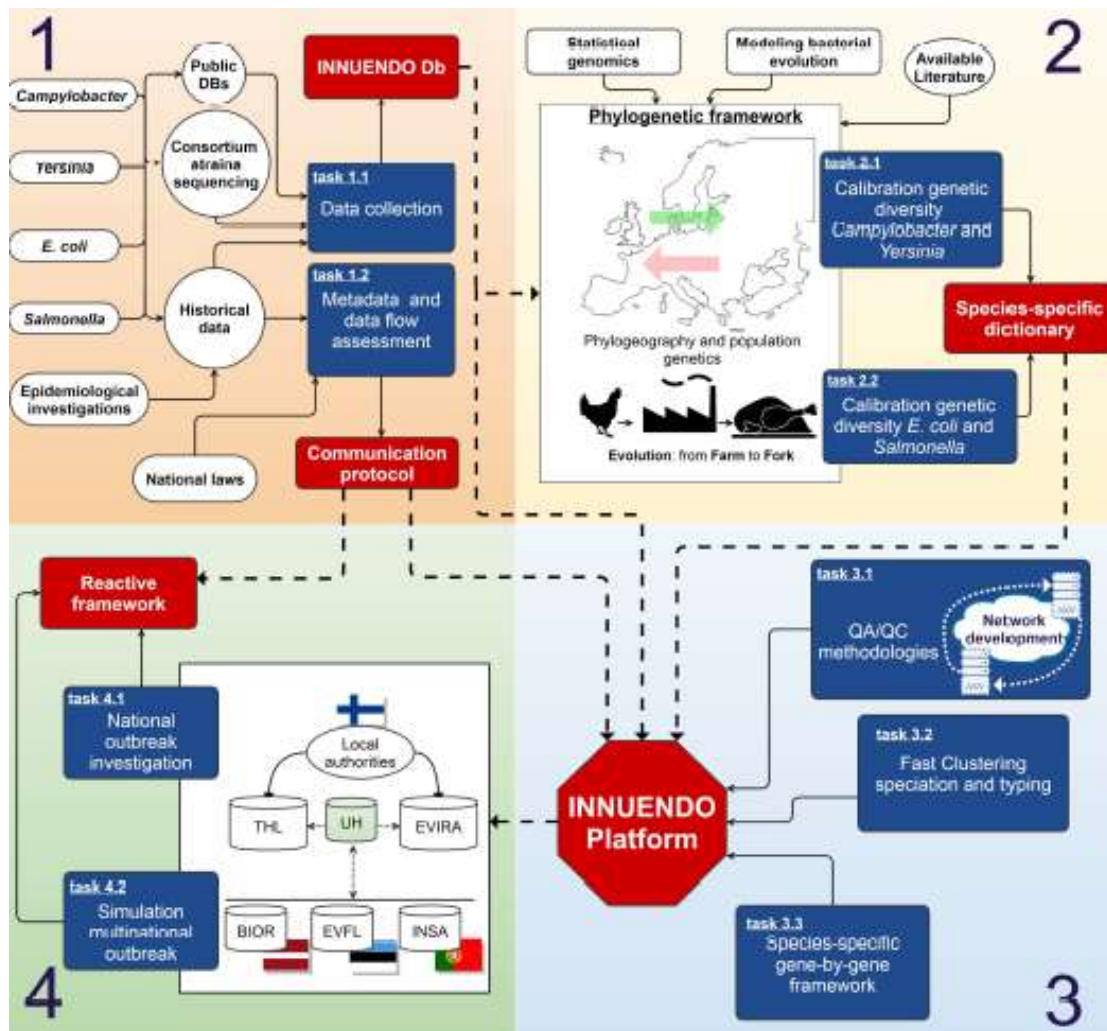


Figura 1: Paquetes de trabajo (WP) 1 a 4.

4. Gestión del Proyecto de Investigación

La gestión del proyecto se muestra en la Figura 2. Se asegurará la igualdad de género en todos los paquetes de trabajo del proyecto, mediante la participación adecuada en todos los comités de trabajo. Se buscará el consenso en las tomas de decisiones a lo largo del desarrollo del proyecto.

La persona responsable del proyecto, el profesor Mirko Rossi, de la Universidad de Helsinki, Finlandia, actuará como facilitador en el grupo, tomando parte activa en las decisiones claves del proceso y dinamizando el proceso participativo.

La gestión de la red se realizará por el Comité Directivo, integrado y presidido por los líderes de los cinco WPS y por el responsable del proyecto. Cada WP será administrado por un Comité compuesto por cada uno de los jefes de equipo y presidido por el líder del WP. Cada comité se reunirá cuatro veces por año. Todos los participantes se reunirán en el mes de Enero del año 2016 para el inicio del proyecto y en Junio de 2018 para la reunión final y sumario del proyecto. En una reunión celebrada en la sede de la EFSA en Parma, los días 14 y 15 de enero de 2016 se reunieron los integrantes del proyecto para planificar la gestión de la red y se firmó el acuerdo de consorcio para la cooperación de este proyecto.

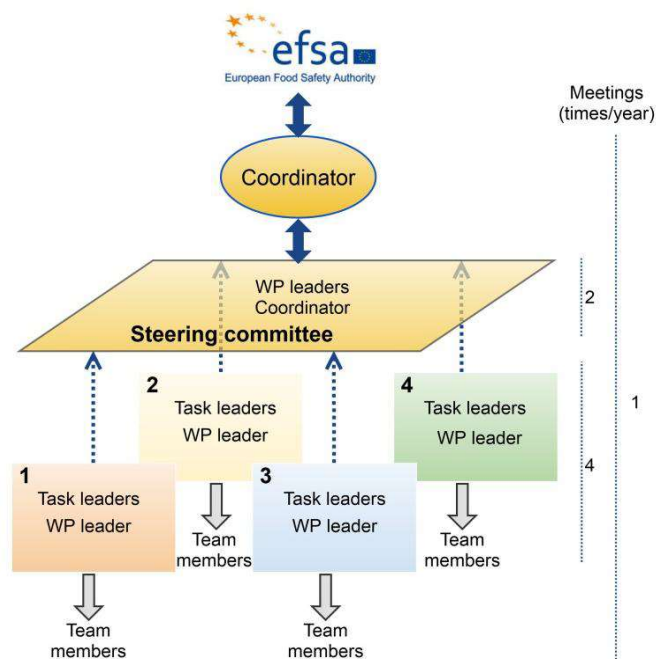


Figura 2: Gestión del proyecto

5. Bibliografía relevante

- Bryant J.M., Grogono D.M., Greaves D., Foweraker J., Roddick I., et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: A retrospective cohort study (2013) *The Lancet*, 381 (9877), pp. 1551-1560.
- Walker T.M., Lalor M.K., Broda A., Ortega L.S., Morgan M., et al. Assessment of *Mycobacterium tuberculosis* transmission in Oxfordshire, UK, 2007-12, with whole pathogen genome sequences: An observational study (2014) *The Lancet Respiratory Medicine*, 2 (4), pp. 285-292.
- Eyre D.W., Cule M.L., Wilson D.J., Griffiths D., Vaughan A., et al. Diverse sources of *C. difficile* infection identified on whole-genome sequencing (2013) *New England Journal of Medicine*, 369 (13), pp. 1195-1205.
- Didelot X., Nell S., Yang I., Woltemate S., Van Der Merwe S., Suerbaum S. Genomic evolution and transmission of *Helicobacter pylori* in two South African families (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (34), pp. 13880-13885.
- Harris S.R., Cartwright E.J.P., Török M.E., Holden M.T.G., Brown N.M., et al. Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A descriptive study (2013) *The Lancet Infectious Diseases*, 13 (2), pp. 130-136.
- Worby C.J., Lipsitch M., Hanage W.P. Within-Host Bacterial Diversity Hinders Accurate Reconstruction of Transmission Networks from Genomic Distance Data (2014) *PLoS Computational Biology*, 10 (3), art. no. e1003549,
- Jombart T., Cori A., Didelot X., Cauchemez S., Fraser C., Ferguson N. Bayesian Reconstruction of Disease Outbreaks by Combining Epidemiologic and Genomic Data (2014) *PLoS Computational Biology*, 10 (1), art. no. e1003457,
- Nübel U., Nachtnebel M., Falkenhorst G., Benzler J., Hecht J. T. et al. MRSA Transmission on a Neonatal Intensive Care Unit: Epidemiological and Genome-Based Phylogenetic Analyses (2013) *PLoS ONE*, 8 (1), art. no. e54898
- Grad Y.H., Lipsitch M., Feldgarden M., Arachchi H.M., Cerqueira G.C., et al. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe, 2011 (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (8), pp. 3065-3070.
- Grad Y.H., Godfrey P., Cerquiera G.C., Mariani-Kurkdjian P., Gouali M., et al. Comparative genomics of recent Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: short-term evolution of an emerging pathogen. (2013) *mBio*, 4 (1), pp. e00452-00412.
- Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J., Tyler S., Antonova E.S., et al. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti (2013) *mBio*, 4 (4), e00398-13
- Ypma R.J.F., van Ballegooijen W.M., Wallinga J. Relating phylogenetic trees to transmission trees of infectious disease outbreaks (2013) *Genetics*, 195 (3), pp. 1055-1062.
- Comas I., Coscolla M., Luo T., Borrell S., Holt K.E., et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans (2013) *Nature Genetics*, 45 (10), pp. 1176-1182.

- Yahara K., Furuta Y., Oshima K., Yoshida M., Azuma T., et al. Chromosome painting in silico in a bacterial species reveals fine population structure (2013) *Molecular Biology and Evolution*, 30 (6), pp. 1454-1464.
- Nasser W., Beres S.B., Olsen R.J., Dean M.A., Rice K.A., et al. Evolutionary pathway to increased virulence and epidemic group A *Streptococcus* disease derived from 3,615 genome sequences (2014) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (17), pp. E1768-E1776.
- Holden M.T.G., Hsu L.-Y., Kurt K., Weinert L.A., Mather A.E., et al. A genomic portrait of the emergence, evolution, and global spread of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pandemic (2013) *Genome Research*, 23 (4), pp. 653-664.
- Uhlemann A.-C., Hafer C., Miko B.A., Sowash M.G., Sullivan S.B., et al. Emergence of sequence type 398 as a community- and healthcare-associated methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in Northern Manhattan (2013) *Clinical Infectious Diseases*, 57 (5), pp. 700-703.
- He M., Miyajima F., Roberts P., Ellison L., Pickard D.J., Martin M.J., et al. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile* (2013) *Nature Genetics*, 45 (1), pp. 109-113.
- Holt K.E., Nga T.V.T., Thanh D.P., Vinh H., Kim D.W., et al. Tracking the establishment of local endemic populations of an emergent enteric pathogen (2013) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (43), pp. 17522-17527.
- Croucher N.J., Finkelstein J.A., Pelton S.I., Mitchell P.K., Lee G.M., et al. Population genomics of post-vaccine changes in pneumococcal epidemiology (2013) *Nature Genetics*, 45 (6), pp. 656-663.
- Bart M.J., Harris S.R., Advani A., Arakawa Y., Bottero D., et al. Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination (2014) *mBio*, 5 (2), art. no. e01074-14, .
- Grad Y.H., Kirkcaldy R.D., Trees D., Dordel J., Harris S.R., et al. Genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* with reduced susceptibility to cefixime in the USA: A retrospective observational study (2014) *The Lancet Infectious Diseases*, 14 (3), pp. 220-226.
- Mather A.E., Reid S.W.J., Maskell D.J., Parkhill J., Fookes M.C., et al. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella* typhimurium DT104 in different hosts (2013) *Science*, 341 (6153), pp. 1514-1517.
- Reuter S., Ellington M.J., Cartwright E.J.P., Köser C.U., Török M.E., et al. Rapid bacterial whole-genome sequencing to enhance diagnostic and public health microbiology (2013) *JAMA Internal Medicine*, 173 (15), pp. 1397-1404.
- Flores A.R., Sahasrabhojane P., Saldaña M., Galloway-Peña J., Olsen R.J., et al. Molecular characterization of an invasive phenotype of group a *Streptococcus* arising during human infection using whole genome sequencing of multiple isolates from the same patient (2014) *Journal of Infectious Diseases*, 209 (10), pp. 1520-1523.

- Golubchik T., Batty E.M., Miller R.R., Farr H., Young B.C., et al. Within-Host Evolution of *Staphylococcus aureus* during asymptomatic Carriage (2013) PLoS ONE, 8 (5), art. no. e61319,
- Croucher N.J., Mitchell A.M., Gould K.A., Inverarity D., Barquist L., et al. Dominant role of nucleotide substitution in the diversification of serotype 3 *Pneumococci* over decades and during a single infection (2013) PLoS Genetics, 9 (10), art. no. e1003868,
- Reuter S., Harrison T.G., Köser C.U., Ellington M.J., Smith G.P., et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak (2013) BMJ Open, 3 (1), art. no. A36,