

## Sequenciação do genoma completo como ferramenta da epidemiologia molecular: caracterização de estirpes de *Neisseria meningitidis* do serogrupo W isoladas em Portugal

*Whole genome sequencing as a tool for molecular epidemiology: characterization of Neisseria meningitidis serogroup W strains isolated in Portugal*

Célia Bettencourt, Alexandra Nunes, Maria João Simões

M.Joao.Simoes@insa.min-saude.pt

Laboratório Nacional de Referência de *Neisseria meningitidis*. Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal.

### \_Resumo

*Neisseria meningitidis* é um comensal da nasofaringe que ocasionalmente causa doença invasiva. Os serogrupos são definidos com base nos antígenos capsulares e a similaridade genética, avaliada por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), permite agrupar as estirpes em complexos clonais (cc). Na Europa, os serogrupos B e C têm sido os mais prevalentes. Desde a epidemia com origem no Hajj em 2000, observa-se uma incidência crescente de doença invasiva meningocócica (DIM) por estirpes W (MenW), maioritariamente as designadas como a linhagem Hajj. Pertencendo ao cc11, estas estirpes dispersaram-se e evoluíram para várias sublinhagens, nomeadamente a sul-americana, à qual está associada DIM com apresentação clínica atípica e letalidade elevada. É objetivo deste estudo conhecer as características genómicas das estirpes MenW isoladas em Portugal e compreender a sua relação evolutiva entre estirpes cc11 do mesmo serogrupo, com uma distribuição geográfica e temporal diversa. Caracterizaram-se as estirpes invasivas MenW isoladas em Portugal entre 2012 e 2018, por MLST e por sequenciação do genoma completo (WGS). Para comparação genómica selecionaram-se os genomas MenWcc11 disponíveis na base de dados *Neisseria* PubMLST. A análise bioinformática foi realizada com o software chewBBACA e a possível relação evolutiva foi analisada aplicando o algoritmo GoeBURST na plataforma PHYLOViZ Online. No período em análise registaram-se 9 casos de DIM por MenW em Portugal, agrupadas apenas em dois genótipos cc22 e cc11. As estirpes MenW cc11 incluídas no estudo (4 invasivas e 2 de portadores) distribuíram-se nas sublinhagens *Original UK* e *Novel UK*, emergidas sequencialmente a partir das estirpes sul-americanas, e numa linhagem da região distal. Tal poder de diferenciação nunca teria sido possível utilizando a metodologia tradicional de caracterização do genótipo (sequenciação de Sanger). O cenário em Portugal é semelhante ao observado noutros países europeus, o que reforça a importância da vigilância da DIM, potencialmente com um quadro clínico atípico e letalidade elevada. A metodologia de WGS é uma ferramenta fundamental nesta vigilância e no estudo de surtos pelo seu poder de diferenciação.

### \_Abstract

*Neisseria meningitidis* is a commensal that colonises the nasopharynx and occasionally causes invasive disease. Capsular polysaccharides define the meningococci serogroups and *Multilocus Sequence Typing* (MLST) identifies genetic similarities gathering strains into clonal com-

plexes (cc). Serogroups B and C have been the most prevalent in Europe however, since the Hajj epidemics, in 2000, invasive meningococcal disease (IMD) due to W strains (MenW), mostly the referred as the Hajj lineage, are been increasing. Belonging to cc11, these strains spread and evolved into different sublineage, namely the South American that is associated to an atypical clinical presentation and high fatality rate. This study aims to characterize genetically Portuguese MenW strains and understand the evolutionary relationship with MenWcc11 with diverse geographic and temporal distribution. Invasive MenW strains isolated in Portugal from 2012 to 2018 were characterized by MLST and whole genome sequencing (WGS). For genomic comparison, MenWcc11 available genomes were selected from *Neisseria* PubMLST database. The software chewBBACA was used for bioinformatics analysis and the algorithm GoeBURST from the PHYLOViZ Online platform was used for analysis of evolutionary relationship between strains. Nine cases of IMD due to MenW were observed in Portugal in this 7 years study. Just two genotypes were identified belonging to cc22 and cc11. The MenWcc11 isolates included in this study (4 invasive and 2 from carriers) were clustered into the sublineages *Original UK* and *Novel UK*, that successively emerged from South American strains, and into a distal region lineage. Such differentiation power would never been possible using the traditional genotype characterization methodology (Sanger sequencing). The scenario in Portugal is quite similar to other European countries, which reinforces the importance of surveillance of IMD, potentially with an atypical clinical presentation and high fatality rate. WGS is an important tool in this surveillance and for outbreaks study due to its power to differentiate strains.

### \_Introdução

*Neisseria meningitidis* é uma bactéria estritamente humana, um comensal do trato respiratório superior, mas que é ainda uma importante causa de infeção invasiva no mundo inteiro, apesar dos enormes progressos alcançados com a utilização de vacinas na redução da morbilidade e mortalidade devidas a esta infeção (1). Dos 12 serogrupos conhecidos, definidos

com base nas características antigénicas dos polissacáridos capsulares, apenas seis (A, B, C, W, X e Y) são responsáveis pela quase totalidade dos casos de doença invasiva meningocócica (DIM) (1). Com base na similaridade genética avaliada por *Multilocus Sequence Typing* (MLST), as estirpes de meningococos são agrupadas em complexos clonais, alguns dos quais contendo estirpes reconhecidamente mais invasivas e híper virulentas (2).

Na Europa, estirpes dos serogrupos B e C têm sido as mais prevalentes, contudo, tem-se vindo a observar uma incidência crescente de DIM por estirpes do serogrupo W (MenW) (3). No Reino Unido, no ano epidemiológico 2008-2009, os casos de DIM por MenW corresponderam a 1,8% do total de casos confirmados, enquanto que em 2013-2014 os casos por MenW aumentaram em todos os grupos etários, correspondendo a 15% do total de casos confirmados (4).

A primeira epidemia global, documentada, causada por *Neisseria meningitidis* do serogrupo W teve origem no Hajj (peregrinação anual a Meca), em 2000, e foi causada por uma estirpe híper virulenta do complexo clonal ST11 (cc11), do subtipo P1.5.2, designada a partir de então como a linhagem Hajj (5). Devido à dispersão geográfica desta estirpe surgiram surtos em vários países africanos e sul-americanos.

O estudo do genoma completo das estirpes cc11 (todos os serogrupos) por sequenciação de nova geração (NGS) permitiu identificar duas linhagens diferentes: a linhagem 11.1, na qual estão incluídas todas as estirpes MenW cc11, e a linhagem 11.2, onde se incluem estirpes dos serogrupos B e C do cc11. A linhagem 11.1 evoluiu para várias sublinhagens, nomeadamente a sul-africana e a sul-americana, supostamente devido a diversificação genómica e expansão clonal (6). Da sublinhagem sul-americana, emergida na primeira década de 2000, emergiram, em 2009, a sublinhagem *original UK* e, em 2013, a sublinhagem *novel UK* (7).

O alerta para a apresentação clínica atípica e as altas taxas de letalidade associadas à DIM por estirpes MenW da sublinhagem sul-americana foi dado em 2013, pela análise de casos de DIM por MenW:cc11 registados no Chile em 2012 (8). Numa primeira avaliação, os principais sinais e sintomas nestes doentes foram a febre  $\geq 38^{\circ}\text{C}$  (60,3% dos doentes), síndrome

gripal (52,5% dos doentes), náuseas e vómitos (46,7%) e diarreia (35,6%). Apenas 8,7% dos doentes apresentavam sinais meníngeos. A taxa de letalidade foi de 31,7% (8). Não é claro se a letalidade tão elevada se ficou a dever a fatores de virulência bacterianos ou se ao atraso no diagnóstico, consequência de um quadro clínico atípico.

### \_Objetivo

Embora as estirpes invasivas MenW não sejam muito frequentes em Portugal, é importante conhecer a sua evolução genética, dado o histórico da doença nos seus aspetos clínicos e epidemiológicos. É objetivo deste estudo conhecer as características genómicas das estirpes MenW isoladas em Portugal e compreender a sua relação evolutiva entre estirpes do mesmo serogrupo e complexo clonal, o cc11, com uma distribuição geográfica e temporal diversa.

### \_Material e métodos

#### Seleção da amostra

As estirpes de *Neisseria meningitidis* dos casos reportados de DIM, isoladas nos laboratórios hospitalares, são enviadas ao Laboratório Nacional de Referência de *Neisseria meningitidis* no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

A identificação dos serogrupos foi realizada através da técnica de PCR em tempo real. Os restantes marcadores definidores do genótipo (subtipo, FetA e tipo de sequência e complexo clonal identificados por MLST), foram identificados por sequenciação completa do genoma (WGS, na sigla em inglês). A metodologia de WGS foi realizada como descrito num estudo nosso recentemente publicado (9).

Neste estudo foram analisados os genótipos das estirpes invasivas do serogrupo W isoladas em Portugal no período de 2012 a 2018. Para comparação genómica foram selecionados os genomas das estirpes portuguesas MenW cc11, bem como todos os genomas das estirpes MenW cc11 disponíveis na base de dados *Neisseria* PubMLST (<http://PubMLST.org/neisseria>) (até 15 de novembro de 2018). Estes genomas foram categorizados de acordo com a literatura como Anglo-French\_Hajj\_strain, Burkina\_Faso-North\_African, Endemic South African strain

Lineage\_11.1\_distal\_region, South\_American-UK , Original UK e Novel UK (6,10).

A análise bioinformática foi realizada com o software de utilização livre chewBBACA (11) e assentou numa abordagem comparativa “gene-a-gene” de um conjunto de 1605 genes de *N. meningitidis*, que constituem o esquema de core-genoma MLST (cgMLST) v1.0 disponível na base de dados *Neisseria* PubMLST (12). Para analisar a possível relação evolutiva entre os isolados W cc11 aplicamos o algoritmo GoeBURST implementado na plataforma PHYLOVIZ Online (13).

## Resultados

Desde 2009, ano a partir do qual todas as estirpes invasivas foram caracterizadas pela técnica de MLST no laboratório nacional de referência de *Neisseria meningitidis*, e outubro de 2018 registaram-se 9 casos de DIM por serogrupo W em Portugal. A média de idade dos doentes foi de 56 anos, (6 a 88 anos). A caracterização de 8 destas estirpes invasivas (uma estirpe isolada em 2018 ainda em estudo) permite agrupá-las em apenas dois genótipos: W:P1.5,2:F1-1:cc11 (5 estirpes) e W:P1.18-1,3:F4-1:cc22 (3 estirpes), (tabela 1). Quatro estirpes do cc11 isoladas em 2017 e 2018 foram estudadas por WGS e incluídas neste estudo.

Para a análise filogenética selecionaram-se 1560 genomas das estirpes MenW cc11 disponíveis na base de dados *Neisseria* PubMLST, nas quais se incluem três genomas de estirpes isoladas de portadores em Portugal.

Utilizando a metodologia tradicional de caracterização do genótipo (sequenciação de Sanger), não é possível conhecer a diversidade genética das estirpes selecionadas, dado o seu caráter clonal e a fraca sensibilidade da metodologia para detetar evolução genética a partir de um ancestral comum (figura 1).

A utilização da metodologia de sequenciação de nova geração, com a sequenciação completa do genoma, permitiu distinguir duas sublinhagens, a *Original UK* e a *Novel UK*, emergidas sequencialmente a partir das estirpes sul-americanas, um ramo mais primitivo, próximo da linhagem Hajj, e um ramo na região designada como distal (figura 2).

As estirpes isoladas em Portugal foram incluídas na sublinhagem *Original UK* (uma estirpe de portador e as duas estirpes invasivas isoladas em 2017), na sublinhagem *Novel UK* (as duas estirpes invasivas isoladas em 2018) e duas das estirpes MenW isoladas de portadores (data de isolamento desconhecida) posicionaram-se na região distal (figura 2).

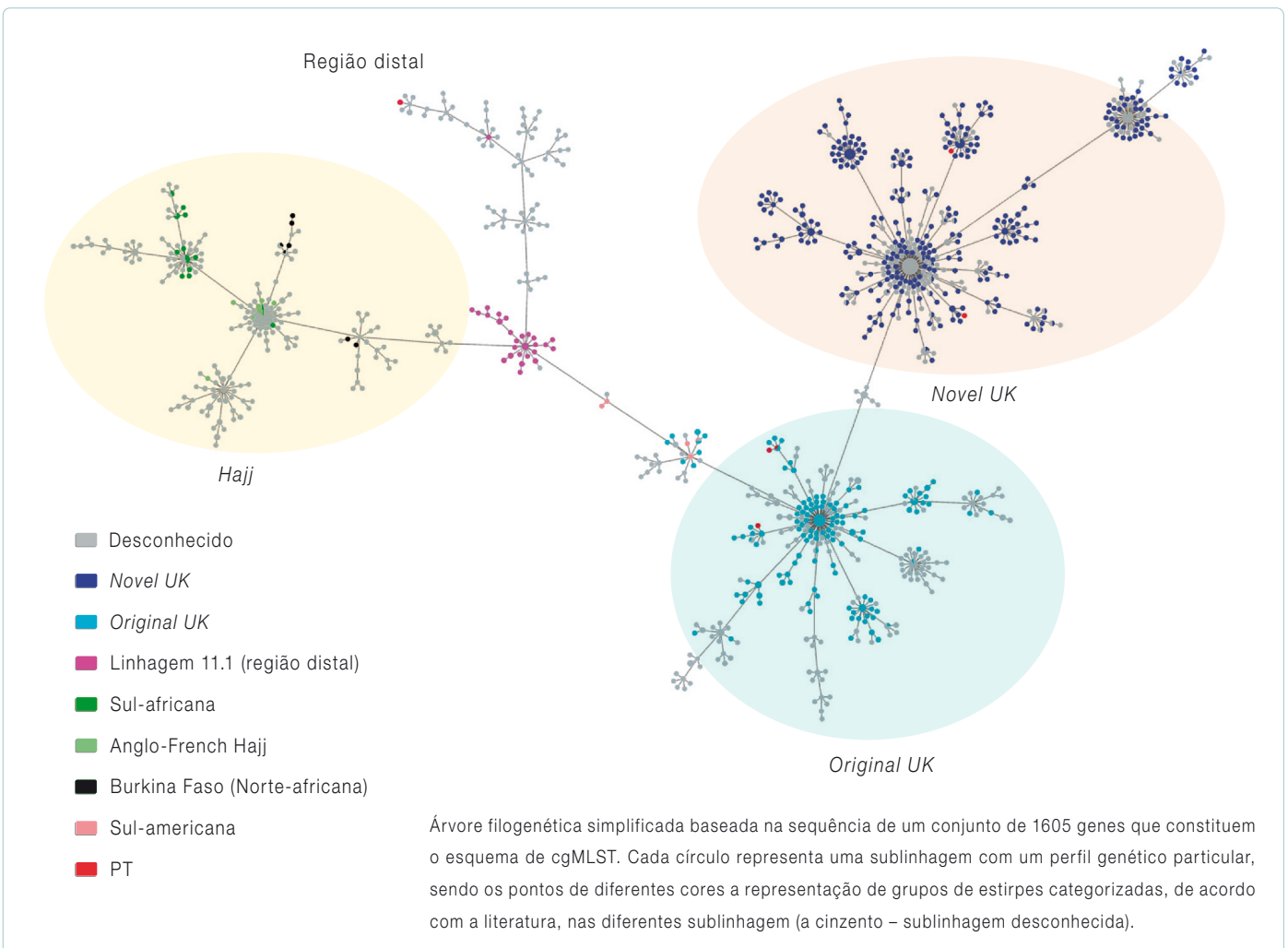
Tabela 1: Caracterização dos casos de DIM por serogrupo W registados em Portugal entre 2009 e 2018 e genótipo das respetivas estirpes invasivas.

| Ano de isolamento | Nº casos W | Idade (anos) | Local de isolamento | Genótipo da estirpe MenW    |
|-------------------|------------|--------------|---------------------|-----------------------------|
| 2009              | 0          | –            | –                   | –                           |
| 2010              | 0          | –            | –                   | –                           |
| 2011              | 0          | –            | –                   | –                           |
| 2012              | 1          | 88           | Hemocultura         | W:P1.18-1,3:F4-1:St184 cc22 |
| 2013              | 1          | 50           | LCR                 | W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11      |
| 2014              | 0          | –            | –                   | –                           |
| 2015              | 0          | –            | –                   | –                           |
| 2016              | 1          | 6            | Hemocultura         | W:P1.18-1,3:F4-1:St184 cc22 |
| 2017              | 2          | 88           | Hemocultura         | W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11      |
|                   |            | 62           | Hemocultura         | W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11      |
| 2018              | 4          | 47           | Hemocultura         | W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11      |
|                   |            | 70           | Hemocultura         | W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11      |
|                   |            | 97           | Hemocultura         | W:P1.5,2:F1-1:ST11cc11      |
|                   |            | 52           | Hemocultura         | (Em estudo)                 |

Figura 1: Proximidade genética de todas as 1564 estirpes MenW cc11 analisadas.



Figura 2: Proximidade genética de todas as 1564 estirpes MenW cc11 analisadas.



## Conclusões

Embora o número de estirpes invasivas MenW isoladas em Portugal e incluídas neste estudo seja baixo, o que prejudica o valor da análise, os dados indicam que o cenário em Portugal é semelhante ao que é observado noutros países europeus, nomeadamente no Reino Unido, país onde se tem observado o aumento do número de casos de DIM por MenW cc11 das linhagens emergentes da sul-americana, particularmente em adultos (14). Dadas as semelhanças, é importante ter em consideração o quadro clínico atípico e a taxa de letalidade particularmente elevada associados a estas estirpes.

Este estudo demonstra a importância da metodologia de WGS na compreensão da diversidade e evolução genéticas, e dispersão global de estirpes MenW, anteriormente todas caracterizadas num único tipo de sequência e complexo clonal, o ST11 do cc11. Esta é uma ferramenta fundamental no estudo de surtos e na monitorização das estirpes circulantes.

## Agradecimentos

Aos colegas da Unidade de Tecnologia e Inovação do INSA pela sua contribuição na sequenciação dos genomas e aos patologistas clínicos que colaboram na vigilância de base laboratorial da DIM.

À Doutora Cristina Furtado pela revisão do artigo.

## Referências bibliográficas:

- (1) Halperin SA, Bettinger JA, Greenwood B, et al. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. *Vaccine*. 2012;30 Suppl 2:B26-36. 12.032. Epub 2011 Dec 15. Review.
- (2) Yazdankhah SP, Kriz P, Tzanakaki G, et al. Distribution of serogroups and genotypes among disease-associated and carried isolates of *Neisseria meningitidis* from the Czech Republic, Greece, and Norway. *J Clin Microbiol*. 2004;42(11):5146-53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC525265/>
- (3) European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive meningococcal disease - Annual Epidemiological Report for 2016. Stockholm: ECDC, 2018. <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/invasive-meningococcal-disease-annual-epidemiological-report-2016>
- (4) Ladhani SN, Beebejaun K, Lucidarme J, et al. Increase in endemic *Neisseria meningitidis* capsular group W sequence type 11 complex associated with severe invasive disease in England and Wales. *Clin Infect Dis*. 2015;60(4):578-85. Epub 2014 Nov 10.
- (5) Mayer LW, Reeves MW, Al-Hamdan N, et al. Outbreak of W135 meningococcal disease in 2000: not emergence of a new W135 strain but clonal expansion within the electrophoretic type-37 complex. *J Infect Dis*. 2002;185(11):1596-605.
- (6) Lucidarme J, Hill DM, Bratcher HB, et al. Genomic resolution of an aggressive, widespread, diverse and expanding meningococcal serogroup B, C and W lineage. *J Infect*. 2015;71(5):544-52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4635312/>
- (7) Eriksson L, Hedberg ST, Jacobsson S, et al. Whole-Genome Sequencing of Emerging Invasive *Neisseria meningitidis* Serogroup W in Sweden. *J Clin Microbiol*. 2018;56(4). pii: e01409-17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5869829/>
- (8) Moreno G, López D, Vergara N, et al. [Clinical characterization of cases with meningococcal disease by W135 group in Chile, 2012]. *Rev Chilena Infectol*. 2013;30(4):350-60. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400002>
- (9) Macedo R, Nunes A, Portugal I, et al. Dissecting whole-genome sequencing-based online tools for predicting resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: can we use them for clinical decision guidance? *Tuberculosis (Edinb)*. 2018;110:44-51.
- (10) Lucidarme J, Scott KJ, Ure R, et al. An international invasive meningococcal disease outbreak due to a novel and rapidly expanding serogroup W strain, Scotland and Sweden, July to August 2015. *Euro Surveill*. 2016;21(45). pii: 30395. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5144941/>
- (11) Silva M, Machado MP, Silva DN, et al. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. *Microb Genom*. 2018; 4(3): e000166. [Epub ahead of print]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5885018/>
- (12) Bratcher HB, Corton C, Jolley KA, et al. A gene-by-gene population genomics platform: de novo assembly, annotation and genealogical analysis of 108 representative *Neisseria meningitidis* genomes. *BMC Genomics*. 2014;15:1138. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4377854/>
- (13) Ribeiro-Gonçalves B, Francisco AP, Vaz C, et al. PHYLOVIZ Online: web-based tool for visualization, phylogenetic inference, analysis and sharing of minimum spanning trees. *Nucleic Acids Res*. 2016 ;44(W1):W246-51. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987911/>
- (13) Bethea J, Makki S, Gray S, et al. Clinical characteristics and public health management of invasive meningococcal group W disease in the East Midlands region of England, United Kingdom, 2011 to 2013. *Euro Surveill*. 2016 Jun 16;21(24). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.24.30259>