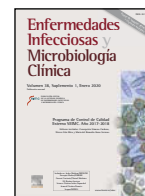


# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Uso de las tecnologías de secuenciación masiva para el diagnóstico y epidemiología de enfermedades infecciosas



Iñaki Comas<sup>a,b,\*</sup>, Irving Cancino-Muñoz<sup>a</sup>, Carla Mariner-Llicer<sup>a</sup>, Galo A. Goig<sup>a</sup>, Paula Ruiz-Hueso<sup>c</sup>, Carlos Francés-Cuesta<sup>c</sup>, Neris García-González<sup>c</sup> y Fernando González-Candelas<sup>b,c</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Biomedicina de Valencia, IBV-CSIC, Valencia, España

<sup>b</sup>CIBER en Epidemiología y Salud Pública, Valencia, España

<sup>c</sup>Unidad Mixta "Infección y Salud Pública" FISABIO-Universitat de València, Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, I2SysBio (CSIC-UV), Valencia, España

### RESUMEN

#### Palabras clave:

Secuenciación masiva  
Genoma  
Epidemiología  
Vigilancia  
Diagnóstico  
Resistencias

Por primera vez, la tecnología de secuenciación masiva permite acceder a la información genómica a un precio y a una escala tales, que se está implementado en la práctica clínica y epidemiológica rutinaria. Los obstáculos para dicha implementación son todavía muchos. Sin embargo, ya existen muchos ejemplos de las grandes ventajas que supone en comparación con métodos anteriores. Esto es, sobre todo, porque con una sola determinación podemos obtener simultáneamente información epidemiológica del microorganismo causante, así como de su perfil de resistencias, si bien estas ventajas están más o menos desarrolladas según el patógeno considerado. En esta revisión se repasan varios ejemplos del uso clínico y epidemiológico de la secuenciación masiva aplicada a genomas completos y microbiomas, y se reflexiona sobre su futuro en la práctica clínica.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. y Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Todos los derechos reservados.

### Use of next generation sequencing technologies for the diagnosis and epidemiology of infectious diseases

#### ABSTRACT

#### Keywords:

Next generation sequencing  
Genome  
Epidemiology  
Vigilance  
Diagnosis  
Resistance

For the first time, next generation sequencing technologies provide access to genomic information at a price and scale that allow their implementation in routine clinical practice and epidemiology. While there are still many obstacles to their implementation, there are also multiple examples of their major advantages compared with previous methods. Their main advantage is that a single determination allows epidemiological information on the causative microorganism to be obtained simultaneously, as well as its resistance profile, although these advantages vary according to the pathogen under study. This review discusses several examples of the clinical and epidemiological use of next generation sequencing applied to complete genomes and microbiomes and reflects on its future in clinical practice.

© 2020 Elsevier España, S.L.U. and Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. All rights reserved.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: icomas@ibv.csic.es (I. Comas).

## Secuenciación masiva: promesas y retos en enfermedades infecciosas

Durante décadas, los métodos moleculares han jugado un papel cada vez mayor en el diagnóstico, análisis epidemiológico y vigilancia de las enfermedades infecciosas. Muchas técnicas que inicialmente se desarrollaron en el campo de la investigación básica se han trasladado al campo clínico. Un caso paradigmático es el de la PCR cuantitativa (qPCR). Cuando se desarrolló a finales de 1980, pocos se atrevían a aventurar su papel como elemento diagnóstico, puesto que faltaba estandarización, facilidad de uso y estudios sobre cómo podía funcionar en el entorno clínico. Sin embargo, en 1989 se propusieron las primeras aplicaciones clínicas<sup>1,2</sup> y en 2019 ya forman parte del algoritmo diagnóstico de la mayoría de enfermedades causadas por microorganismos. La secuenciación masiva está exactamente donde la qPCR cuando empezó su aplicación clínica. En un entorno controlado, ha demostrado que para varias enfermedades tiene una sensibilidad y especificidad similares a las técnicas convencionales. Poco a poco se está desplegando para su uso rutinario en hospitales de todo el mundo, aunque a distintas velocidades. Países como Reino Unido lideran su implementación, no solo como complemento sino como reemplazo de procedimientos convencionales. Sin embargo, ni siquiera los grandes centros de referencia de muchos países desarrollados la han implementado. En los países en desarrollo, parece todavía una opción lejana, aunque aplicaciones más específicas, para resolver cuestiones complejas o urgentes<sup>3</sup>, han demostrado que estas técnicas se podrían implementar también allí.

Una situación similar se vive en el campo de la epidemiología y la vigilancia epidemiológica. Las técnicas moleculares, en este caso, se abrieron paso antes que en el campo clínico, pues rápidamente se vio el beneficio de unas técnicas que proveían mayor discriminación que las anteriores<sup>4</sup>. Del mismo modo, la secuenciación masiva del genoma completo (SGC) ha demostrado un poder de discriminación aún mayor. Sin embargo, al igual que en el entorno clínico, existen todavía obstáculos para su implementación<sup>5,6</sup>. El análisis bioinformático y filogenético posterior es más complejo y, generalmente, requiere trabajar sobre un cultivo, pues sobre muestra directa la aproximación experimental se vuelve más compleja y costosa. Sin embargo, la secuenciación masiva a partir de cultivo cada vez es más barata. En un sistema Illumina-MiSeq, que permite hasta 24 genomas de 4 Mb (similar al de *Mycobacterium tuberculosis* o *Legionella pneumophila*), el coste de reactivos y la secuenciación es de unos 100 euros por muestra. Esto la convierte en una técnica muy atractiva, dado que al obtener la secuencia del genoma, se puede diagnosticar la especie de interés, la presencia de factores de resistencia o virulencia y hacer epidemiología de alta resolución. Muchas de estas aplicaciones están más avanzadas para unos microorganismos que para otros. Por ejemplo, en el caso de la tuberculosis (TB), el campo está suficientemente avanzado como para hacer un uso total de la información, y ha reemplazado al cultivo en algunos países<sup>7</sup>. Todavía se tiene que desarrollar su implementación para otras especies bacterianas causantes de enfermedades más raras, o en las que no se conocen los determinantes genéticos de la resistencia, o donde es un consorcio y no una única bacteria patógena la que interviene<sup>8</sup>. En esta revisión, se presentan ejemplos de su uso clínico y epidemiológico para un amplio número de patógenos bacterianos y virales, así como se reflexiona sobre las direcciones que el campo pueda tomar en el futuro.

### Secuenciación masiva en la práctica clínica

#### *Aplicaciones en resistencia a antibióticos en el entorno hospitalario*

Las bacterias resistentes a los antibióticos representan uno de los grandes desafíos para la salud pública en todo el mundo<sup>9</sup>. A día de hoy, se conocen bacterias resistentes a todos los antibióticos disponibles. Se ha estimado que el número de muertes anuales causadas

por la resistencia a antibióticos en Europa asciende a 23.000 personas y en el mundo a 700.000. Pero esta cifra aumenta continuamente; se ha estimado que en el año 2050, las infecciones por patógenos resistentes serán la primera causa de muerte, por encima del cáncer o las enfermedades del corazón, y causarán más de 10 millones de muertes anuales en todo el mundo<sup>10</sup>. Las resistencias a los antibióticos están codificadas por mutaciones puntuales en el cromosoma, en plásmidos y/u otros elementos genéticos móviles, incluyendo genes completos integrados en cualquiera de los anteriores. Sin embargo, no todas las bacterias adquieren o presentan las resistencias de igual manera. Existen grandes diferencias en cuanto a sus repercusiones clínicas, tanto individuales como a nivel general. Todo ello, ha llevado a diversas instituciones (ECDC, OMS, CDC) a elaborar listas de patógenos y resistencias para las que se precisa una vigilancia intensa e inmediata<sup>11,12</sup>.

Las ventajas que presenta la SGC sobre otras alternativas la hacen inmejorable para la vigilancia. Pero la pregunta es: ¿cabe adoptar la secuenciación genómica como técnica rutinaria para evaluar la sensibilidad a antibióticos de bacterias patógenas? Por ejemplo, en un estudio de nuestro grupo con 111 aislados de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE (betalactamasas de espectro extendido), se observó una coincidencia del 95,3% (1.469/1.542) de las pruebas en que se comparó la presencia de factores de resistencia en las lecturas de secuenciación masiva y los fenotipos de sensibilidad obtenidos con Vitek. Además, la mayoría de discrepancias correspondía a betalactámicos (6,1%, 62/1.018) y se concentraban en unos pocos aislados, lo que puede indicar la presencia de factores aún no bien caracterizados como responsables de resistencias a varios antibióticos.

Uno de los mayores obstáculos para su implementación en la práctica clínica es la necesidad de análisis bioinformáticos rigurosos y rápidos. Se están dando pasos en ese sentido. Por ejemplo, SRST2<sup>13</sup> o ARIBA<sup>14</sup> son programas que permiten la caracterización detallada de los aislados y las resistencias que presentan sin un análisis bioinformático muy pormenorizado. Esto quiere decir que pocos minutos después de acabar un experimento de secuenciación se puede tener información de la especie, el patrón de tipado (MLST) y la presencia de mutaciones o genes de resistencia conocidos. De hecho, es la doble utilidad de la información genómica, en clínica y en epidemiología, la que abre la posibilidad de una implantación paulatina de esta tecnología en los laboratorios de microbiología clínica. Mientras se producen los avances necesarios para emplear la secuenciación masiva como tecnología de rutina, la formación del personal, la adquisición de equipos y la familiarización con los procedimientos de preparación y análisis posterior pueden realizarse con objetivos de vigilancia. Esta es la estrategia seguida por la Red Valenciana de Vigilancia de Resistencias a Antimicrobianos que, partiendo de las recomendaciones del PRAN, está implementando en hospitales la secuenciación masiva de aislados de vigilancia especial (p. ej., aislados de *K. pneumoniae* productores de carbapenemasas), de forma que en ellos se puedan realizar todas las tareas necesarias tras la oportuna formación y actualización de conocimientos. El análisis de los resultados se realizará en 2 niveles, tanto en cada hospital como de forma integral para toda la comunidad autónoma, en conexión con la Dirección General de Salud Pública, como responsable directa del PRAN en la Comunitat Valenciana. El modelo, una vez implantado, puede extenderse a los demás microorganismos cuya vigilancia se considere necesario realizar mediante secuenciación masiva, facilitando así la futura adopción como tecnología de rutina en los hospitales, ya con aplicaciones directamente en la práctica clínica.

#### *Identificación de resistencias a antibióticos en tuberculosis*

Desde la década de 1990, la transmisión de cepas del *M. tuberculosis* complex (MTBC) resistentes a antibióticos se ha hecho más evidente cada año, convirtiéndose en un problema económico y de salud pública a nivel mundial<sup>15</sup>. Se estima que se producen alrededor

de medio millón de casos nuevos por año, por lo que resulta un grave problema en los esfuerzos para erradicar la enfermedad, ya que supone un reto para el diagnóstico y para el tratamiento<sup>16</sup>. Dado que *M. tuberculosis* es una especie clonal en la que no se produce recombinación ni transferencia horizontal de genes, el mecanismo de adquisición de resistencias suelen ser las mutaciones puntuales<sup>17</sup>. En cuanto a la sensibilidad y especificidad de la SGC frente a los ensayos de sensibilidad a antibióticos, varios estudios han demostrado que, para los dos antibióticos de primera línea más importantes (rifampicina e isoniácida), la detección de resistencias es tan buena o incluso mejor que el cultivo, obteniéndose una sensibilidad de 0,98 y especificidad de 0,98 para rifampicina, y unos valores de 0,97 y 0,93 para isoniácida, respectivamente<sup>18</sup>. Para el resto de antibióticos de primera línea y los de segunda línea, la sensibilidad y especificidad son más variables entre los distintos estudios. Desde 2017, centros de salud pública de Reino Unido, Países Bajos y Nueva York están empezando a reemplazar los tests fenotípicos por SGC, tanto para identificar MTBC como para obtener el perfil de resistencias<sup>7</sup>.

Sin embargo, una de las limitaciones de la técnica es la falta de estandarización en la parte del análisis bioinformático<sup>19</sup>, así como de catálogos completos de mutaciones. En otras palabras, se conocen las mutaciones más comunes, pero las más raras representan un desafío. Nuestro grupo ha publicado el caso de un paciente de TB que no respondía al tratamiento durante más de 2 años, a pesar de que todas las pruebas rutinarias (cultivo y moleculares) en el hospital no detectaron resistencias. Demostramos que el paciente en realidad era multi y extremadamente resistente (MDR-TB y XDR-TB) debido a una serie de mutaciones raras a rifampicina e isoniazida, que hacían que la bacteria creciera excesivamente lenta en el medio de cultivo<sup>20</sup>. El mismo estudio usa la información genómica para informar de la aparición de nuevas resistencias durante el tratamiento. A medida que se han ido realizando estudios como el comentado, y se han encontrado mutaciones en genes de MTBC asociadas a resistencia a antibióticos<sup>21</sup>, ha ido aumentando la necesidad de generar bases de datos que recopilen dichas mutaciones. Por un lado, están CASTB, TBProfiler y PhyReSE, que son bases de datos públicas con las mutaciones más frecuentes conocidas y permiten analizar las secuencias de forma automática<sup>22-24</sup>. Por otro lado, para avanzar en la identificación de nuevas mutaciones diagnósticas existen principalmente 2 consorcios, CRYPTIC ([www.crypticproject.org](http://www.crypticproject.org)) y ReSeqTB (<https://platform.reseqtb.org>). En un futuro, la mejora de los catálogos y la optimización y el uso correcto de SGC podría llegar a hacer posible la obtención de un diagnóstico completo y preciso para dar un tratamiento personalizado a cada paciente de MDR y XDR-TB<sup>25</sup>.

#### *Aplicaciones en virología clínica*

Una de las áreas en que la secuenciación masiva ha mostrado claras ventajas sobre técnicas convencionales es la identificación de los agentes infecciosos virales presentes en una muestra, incluyendo nuevos virus, pues no se necesita información previa sobre el genoma de una especie para su detección. El análisis de la microbiota tiene dificultades técnicas importantes para su uso rutinario, especialmente si estamos interesados en su fracción viral<sup>26</sup>; a las dificultades en la identificación inequívoca de los virus presentes en una muestra compleja, se puede añadir el problema de diferenciar entre colonización e infección, o la creciente información sobre contaminantes virales en los materiales y reactivos usados en estas técnicas<sup>27</sup>. Con todo, hay ejemplos concretos en los que la secuenciación masiva ha permitido la detección del virus de la parotiditis en líquido cerebroespinal<sup>28</sup> o el de la rubéola en un paciente con oftalmatitis<sup>29</sup>, cuando las técnicas habituales no habían logrado establecer el patógeno causante de las infecciones.

Son numerosos los casos en que la secuenciación masiva ha demostrado una capacidad muy superior a la secuenciación Sanger para detectar e identificar mutaciones de resistencia a antivirales, a

pesar de encontrarse estas en una baja frecuencia<sup>30</sup>. Aunque la aplicación mayoritaria de esta técnica se realiza con virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>31-33</sup>, también se emplea con otros virus, como el virus de la hepatitis C (VHC)<sup>34,35</sup>, citomegalovirus<sup>36</sup>, virus de la hepatitis B<sup>37</sup>, virus de la hepatitis A<sup>38</sup> o virus de la gripe<sup>39</sup>. Las recomendaciones actuales de evaluación de mutaciones de resistencia en VIH<sup>40</sup> no incluyen la determinación rutinaria de mutaciones minoritarias, que aún se encuadran en el marco de la investigación, si bien podrían considerarse para NNRTI (inhibidores no-análogos de nucleósidos de la transcriptasa inversa). La evidencia sobre su asociación con fallo terapéutico no parece ser lo bastante concluyente como para considerarse una prueba a realizar de forma rutinaria<sup>41-44</sup>. Sin embargo, su capacidad para transmitirse en un inóculo infeccioso parece fuera de duda<sup>33,45,46</sup>.

Un caso particular, pero de gran relevancia clínica y epidemiológica, lo ofrecen los virus de ARN que producen infecciones crónicas, como VIH y VHC. En ellos se unen unas elevadas tasas de mutación con tiempos prolongados de infección, lo que permite observar la evolución de la población viral a lo largo del tiempo. La compartimentalización<sup>47-50</sup>, unida a la mutación y diferente accesibilidad de los fármacos a distintos tejidos y órganos, puede contribuir al fallo terapéutico. En este caso, la posibilidad de analizar con detalle la población de virus presentes en un paciente a lo largo del tiempo, es un importante activo de la secuenciación masiva<sup>51</sup>. El análisis de esta diversidad intraindividual también puede revelar la existencia de coinfección o sobreinfección, frecuentemente asociada a grupos con elevadas tasas de prácticas de riesgo<sup>52</sup>. Esta misma aproximación se utiliza para analizar la transmisión del virus entre pacientes, si bien su sentido es difícil de inferir solo a partir del análisis de las secuencias y sin información clínica o epidemiológica adicional<sup>53</sup>.

Por último, la información derivada de la secuenciación masiva podría emplearse para analizar con detalle las cadenas de transmisión y brotes virales, tanto en un contexto epidemiológico como forense. Respecto al primero, la utilidad se ha demostrado en numerosos ejemplos, quizá los más llamativos son los análisis "sobre el terreno" de los brotes de virus Ebola<sup>54</sup>, Zika<sup>55,56</sup> o chikungunya<sup>57</sup> utilizando secuenciación de tercera generación. Sin embargo, la determinación inequívoca de la transmisión viral entre individuos concretos, así como su dirección, en su caso, exclusivamente a partir de la información obtenida mediante secuenciación masiva debe tomarse aún con precaución, y hay observaciones discrepantes al respecto<sup>58-60</sup>, a las que hay que añadir relevantes cuestiones metodológicas<sup>61,62</sup>.

#### *Aplicación en metagenómica clínica y microbioma*

La metagenómica consiste en la secuenciación masiva de todas las moléculas de ADN presentes en una muestra que, a su vez, provendrán de los organismos que están, o estuvieron, presentes en ella. La capacidad de detectar en un solo ensayo todos los patógenos potenciales de una muestra (incluyendo los viables no cultivables) supone una clara ventaja respecto a los métodos de diagnóstico tradicionales, que requieren de la acotación previa del patógeno que se pretende identificar. En la práctica clínica, la metagenómica se usó de manera efectiva por primera vez para el diagnóstico y tratamiento de un paciente de neuroleptospirosis en estado crítico<sup>63</sup>. El paciente había dado negativo en diversas baterías de tests microbiológicos, incluyendo ensayos clínicos para leptospirosis. Tras la identificación de tan solo un 0,016% de *Leptospira* mediante secuenciación masiva, el paciente fue puesto en tratamiento y mejoró rápidamente. En un reciente estudio con más de 200 pacientes de meningitis y encefalitis, en el que se comparó la metagenómica con tests diagnósticos convencionales, un 22% de los casos infecciosos se identificó únicamente mediante secuenciación masiva. Sin embargo, en un 45% de los casos solo los tests convencionales fueron capaces de detectar el agente infeccioso. Esto pone de manifiesto que, mientras la metagenómica es capaz de llegar a unos niveles de sensibilidad sin prece-

denes, es una técnica todavía inmadura y que requiere de mejoras antes de poder implementarse en su uso clínico rutinario. Sin embargo, el verdadero potencial de la metagenómica va mucho más allá de la mera detección de patógenos.

Acceder al genoma de los patógenos permite identificar la cepa (o cepas) involucradas en la infección y detectar mutaciones y genes de resistencia además de otros factores de virulencia. Asimismo, la metagenómica se ha usado en el estudio de brotes bacterianos como el de la fiebre de Lassa de 2018 en Nigeria, brotes nosocomiales de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos o brotes de origen alimentario, y es capaz de identificar el origen y los eventos de transmisión entre pacientes<sup>64-66</sup>. Pero, probablemente, la aplicación más conocida sea la caracterización de los microbiomas, es decir, de las comunidades bacterianas que habitan en los distintos órganos y tejidos humanos y que pueden estar asociadas a enfermedades tanto agudas como crónicas<sup>67</sup>. Se ha demostrado que las alteraciones del microbioma normal, conocidas como disbiosis, están relacionadas con enfermedades como la diabetes, la enfermedad de Crohn o la enfermedad de Alzheimer<sup>68,69</sup>. Esto sitúa a la metagenómica como una herramienta ideal para el tratamiento y seguimiento de estas enfermedades. Un ejemplo claro son las infecciones causadas por el patógeno oportunista *Clostridium difficile*, para las cuales la metagenómica ha demostrado que el trasplante fecal es un tratamiento con una alta tasa de éxito<sup>70</sup>.

Sin embargo, la implementación de la metagenómica continúa siendo demasiado difícil y costosa para su uso rutinario en la práctica clínica. La mayor parte de la metagenómica se lleva a cabo en laboratorios de investigación, con herramientas que están en constante desarrollo y cambian cada poco tiempo, especialmente en la parte del análisis computacional. Este ambiente de constante cambio supone una barrera para su implementación en un sistema de salud pública que necesita de procedimientos estandarizados que se puedan validar para un uso clínico por los organismos competentes. No obstante, en comparación a los métodos tradicionales, la metagenómica provee una cantidad de información microbiológica sin parangón y es de esperar que, conforme se solventen sus limitaciones técnicas, y dada su utilidad clínica, sustituya a muchas de las técnicas microbiológicas actuales en un futuro próximo<sup>71</sup>.

## Secuenciación masiva en epidemiología y vigilancia

### *Aplicación a brotes hospitalarios*

La utilización de genomas completos en el contexto de análisis de brotes epidemiológicos es una metodología de aplicación muy reciente<sup>72,73</sup>. En nuestro grupo, el trabajo realizado por Ruiz-Hueso et al<sup>74</sup> analiza genomas completos de aislados de *Pseudomonas aeruginosa* en 3 contextos de transmisión nosocomial de características muy diferentes, lo que refleja el grado de utilidad de esta tecnología en todo tipo de circunstancias. El caso más sencillo fue un posible brote localizado en el área de hematología del hospital A. Ante la elevada tasa de mortalidad entre los posibles afectados y su posible asociación con la patología de base que padecían, se requirió su confirmación. Solo se disponía de 12 muestras de 6 pacientes de un brote que podría estimarse en alrededor de 20 afectados. Se procedió a la secuenciación de sus genomas y el análisis filogenético confirmó que se trataba del mismo tipo de aislado en todos los casos, con unas diferencias mínimas entre los genomas completos de los 12 aislados. Los resultados por MLST indicaron que se trataba del ST175, un secuenciotipo de amplia distribución a nivel mundial<sup>75</sup>, por lo que, aunque la sospecha fue grande, no se pudo asumir un mismo origen sobre la base de tan solo esta información. La utilización de varias muestras por paciente en este contexto es útil también para tratar de determinar si pudieran existir infecciones por varios clones diferentes. En nuestro estudio, los resultados respaldaron la idea de un único clon, ya que el número de diferencias nucleotídicas entre los genomas de las muestras de *P. aeruginosa* a nivel intrapaciente era 0 o 1.

En situaciones más complejas, el análisis filogenómico (estudio filogenético de la totalidad del genoma) permite no solo confirmar la presencia de un brote y discriminar a los pacientes que forman parte de este sino también establecer su grado de extensión, así como posibles fuentes de infección. El siguiente caso trató de un brote extenso, en el que podían estar involucrados 64 pacientes. Inicialmente se planteó como un brote localizado en el servicio de nefrología del hospital B, pero se fueron incorporando muestras de pacientes localizados en otras zonas a medida que el número de infecciones por *P. aeruginosa* fue aumentando en dicho hospital. Gracias al uso de la misma metodología se confirmó el brote y la dispersión del patógeno a otras áreas, pero la estructura evolutiva de los aislados era mucho más compleja de la esperada para un solo brote. De hecho, reveló la presencia de pequeños brotes, en contraposición a un único brote detectado por marcadores convencionales.

El tercer caso tratado por Ruiz-Hueso et al tenía como objetivo estudiar la evolución de la bacteria en pacientes de un mismo hospital (hospital C) que hubieran tenido infecciones prolongadas y/o en distintas partes de su organismo. Lo único que estos pacientes tenían en común eran infecciones repetidas y de larga duración, además de no padecer fibrosis quística. Las muestras de 16 pacientes, 92 en total, tomadas a lo largo de 3 años, dieron lugar en un árbol filogenético a la estructura particular de un brote infeccioso que contenía más del 80% de estas. La estructura era muy similar al caso anterior, y en ella se observan distintas agrupaciones debidas a diferencias genéticas suficientemente grandes para poder hablar de varios brotes, o cadenas de transmisión, simultáneos de *P. aeruginosa* del mismo secuenciotipo. Gracias a este resultado, y al cruce con datos de las estancias de los pacientes involucrados, se pudo localizar un posible foco inicial.

### *Aplicación a brotes comunitarios: tuberculosis*

El uso del genoma completo como marcador epidemiológico está revolucionando la epidemiología molecular de la TB<sup>76</sup>. Se ha comprobado que la SGC ayuda resolver brotes de transmisión que aparentan idénticos con las técnicas de tipado convencionales. Por ejemplo, Wyllie et al<sup>77</sup> demostraron que la técnica MIRU-VNTR sobrestima la transmisión reciente en Reino Unido, especialmente, en individuos extranjeros. La SGC también ha demostrado una mayor congruencia con las investigaciones epidemiológicas<sup>78</sup> o para detectar brotes de transmisión que circulan entre diferentes países<sup>79</sup>.

Nuestro grupo de investigación ha estado trabajando en diferentes aplicaciones de la SGC de TB en la Comunidad Valenciana. Como parte de un proyecto que incorporar a la Dirección General de Salud Pública, así como a la mayor parte de hospitales públicos de la Comunidad Valenciana, hemos secuenciando la gran mayoría de casos de cultivo positivos desde 2014. Los datos preliminares que se presentan se refieren al período 2014-2016. En total se aplicó SGC en 785 aislados clínicos que provenían de 18 hospitales diferentes. Utilizando los datos obtenidos por SGC, se identificó que el 35% de los aislados estaban relacionados a transmisión reciente. Este porcentaje es mucho mayor que en otras áreas del espacio europeo y sugiere que la transmisión todavía juega un papel importante en el número de casos todos los años. Por otra parte, las técnicas epidemiológicas convencionales (estudio de contactos) solo identificaron algún tipo de transmisión en el 10% de todos los aislados. Utilizando los brotes de transmisión obtenidos por SGC, y con ayuda de investigaciones epidemiológicas, en algunos casos se logró confirmar la transmisión detectada por el estudio de contactos mientras que en otros, se realizaron investigaciones de campo para detectar el vínculo epidemiológico entre los diferentes individuos de un grupo de transmisión.

Se presentan 3 ejemplos:

- El primero es la “confirmación retrospectiva de un brote conocido”. Ocurrió en una residencia de ancianos donde hubo 4 ca-

sos de TB; aquí, la concordancia entre epidemiología convencional y genómica fue evidente.

- El segundo es la “exclusión durante un brote prospectivo”. Ocurrió en un colegio privado donde en 2 meses se diagnosticaron 4 contagios en un aula infantil (todos con 3 años). Tres meses después se diagnosticó un nuevo caso de TB, un alumno de 17 años perteneciente a un aula para mayores, el cual no tenía vinculación directa con los niños pequeños. El análisis genómico desvinculó este último caso del brote en el aula de infantil y se asoció con otro brote de 5 casos entre adultos de la ciudad.
- El tercer ejemplo es lo que se puede llamar “ampliación plausible de un brote y alerta”. Ocurrió entre población extranjera sin techo, que vive en los asentamientos periurbanos y albergues sociales de la ciudad. El estudio de contactos identificó 2 casos con vínculo epidemiológico bien establecido. Gracias a la SGC, se detectaron 2 casos adicionales, que presentaban un perfil sociodemográfico muy similar. Cabe mencionar que estos 4 casos alcanzaron la cifra de 7 ingresos por TB, contando episodios iniciales y recaídas.

#### *Aplicación de la secuenciación genómica a la microbiología forense*

El establecimiento de la microbiología forense como disciplina<sup>80</sup> se produjo a raíz de los ataques bioterroristas con carbunco ocurridos en 2001 en Estados Unidos, también conocidos como amerithrax. En este caso, se aplicó la SGC<sup>81,82</sup>, aunque no mediante las tecnologías de secuenciación masiva actuales. De hecho, ya sea por razones legales o, simplemente, por no haberse aplicado todavía esta tecnología en este tipo de estudios, hasta muy recientemente no se había publicado ningún trabajo que emplease la secuenciación masiva en una transmisión bacteriana dentro del campo de la microbiología forense.

El primer estudio publicado en este contexto implica un posible caso de abuso sexual a una menor con transmisión de la bacteria *Neisseria gonorrhoeae* sucedido en España en 2017<sup>83</sup>. Se decidió usar la SGC de las cepas aisladas del presunto agresor, la víctima y 3 controles locales, porque las técnicas moleculares habituales, como el MLST<sup>4</sup> y la electroforesis en gel de campo pulsante (PFGE), no proporcionaron suficiente resolución. De hecho, en este estudio el MLST no pudo discriminar entre las cepas del caso y los controles, ya que todos poseían el mismo ST9363, mientras que la PFGE, a pesar de tender a ser más discriminativa que el MLST<sup>4,84</sup>, no pudo diferenciar entre las cepas del caso y uno de los controles.

El trabajo de Francés-Cuesta et al<sup>83</sup> combina estrategias de mapeo de las secuencias frente a un genoma de referencia lo más próximo genéticamente posible. Con esta metodología se pudo comprobar que las cepas aisladas del sospechoso y la víctima eran completamente idénticas, mientras que el control que no pudo ser diferenciado de las cepas del caso mediante PFGE difería en 2 nucleótidos. Dado que este paciente control no tenía relación conocida con los individuos implicados en el caso, los autores sugieren la posibilidad de una fuente de infección común para el control y el sospechoso, con el fin de explicar la casi perfecta identidad entre los genomas gonocócicos de este control y los del caso. Respecto a la dirección de la transmisión, aunque la obtención de la secuencia genómica no permite determinarla, dadas las características del propio caso, esta es bastante obvia. Este primer ejemplo de aplicación de la secuenciación masiva a la microbiología forense abre las puertas al establecimiento de unas bases metodológicas aplicables al análisis de transmisiones bacterianas en un contexto pericial forense.

#### **Conclusiones. El futuro de la tecnología y su papel en la práctica clínica y epidemiológica**

La secuenciación masiva ha alcanzado un alto grado de madurez para la investigación, pero aún se halla a diferentes niveles de uso

en la práctica clínica y epidemiológica. A nivel epidemiológico, ya es la herramienta recomendada para genotipado por la ECDC y otras agencias, si bien su utilización dista de ser sistemática excepto en algunos países (p. ej., Reino Unido) o aplicaciones (brotes de patógenos asociados a alimentos) (<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/monitoring-use-whole-genome-sequencing-infectious-disease-surveillance-europe>). A nivel de la microbiología clínica, si bien su penetración es desigual según enfermedades, cada vez tiene un rol más predominante<sup>6</sup>. A esto se une la llegada de los secuenciadores de tercera generación. Por ejemplo, los secuenciadores de nanoporos (MinION, GridION, etc., de Oxford Nanopore Technologies) que permiten la generación de la información genómica desde una única molécula, sin requerir pasos previos de amplificación por PCR y, además, la lectura en tiempo real, lo que lleva a una mayor rapidez en el diagnóstico. Sin embargo, estos secuenciadores todavía llevan asociados mayores niveles de error en la lectura, aunque mejoran con cada actualización. Secuenciadores con tecnologías similares o totalmente nuevas están cerca de ser lanzados al mercado. Sin embargo, tanto unas tecnologías como las otras requieren mejorar los resultados sobre muestras complejas en comparación con los avances hechos sobre cultivos puros<sup>71</sup>.

A la vista de los ejemplos expuestos, está claro que la secuenciación de genomas completos es el presente para muchas aplicaciones como la vigilancia y la epidemiología. Su instauración como método rutinario en microbiología clínica dependerá mucho de la resolución de obstáculos para su implementación rutinaria<sup>6</sup>, las enfermedades a tratar y, sobre todo, del beneficio y rendimiento obtenidos<sup>85</sup>. Hay microorganismos que se pueden diagnosticar rápidamente con métodos fenotípicos o con los métodos moleculares disponibles y no necesitan de información adicional. Sin embargo, para los agentes causantes de muchas enfermedades, incluidos todos los microorganismos “fastidiosos”, escenarios como la detección de resistencias mediadas por plásmidos y la posibilidad de la caracterización completa es un salto adelante significativo. Dicho salto probablemente se de en los países desarrollados en los próximos 5 años, posiblemente acompañado de soluciones globales para la preparación de las muestras y el análisis de los resultados<sup>86</sup>. Los hospitales, por lo menos los de referencia, probablemente potenciarán la presencia de soporte bioinformático e incluso los más pequeños tendrán acceso a aplicaciones web para los análisis más rutinarios y estandarizados<sup>87</sup>. Muchos de estos avances ya están disponibles localmente en algunos países del mundo desarrollado. En el mundo en vías de desarrollo, donde estas técnicas tienen un gran potencial para enfermedades endémicas de alta incidencia, el conjunto de problemas es similar pero a diferente escala, incluyendo limitaciones en el acceso a internet, el mantenimiento de la cadena de frío o el apoyo bioinformático<sup>19</sup>.

#### **Financiación**

El trabajo en el laboratorio del Dr. Iñaki Comas está financiado por MICIU (SAF2016-77346-R), Generalitat Valenciana (AICO/2018/113) y el European Research Council StG 638553. El trabajo en el laboratorio del Dr. Fernando González-Candelas está financiado por MICIU (proyecto BFU2017-89594R), Generalitat Valenciana (PROMETEO206-122) y Conselleria de Sanitat Universal i Salut Pública.

#### **Conflicto de intereses**

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### **Bibliografía**

1. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
2. Lomeli H, Tyagi S, Pritchard CG, Lizardi PM, Kramer FR. Quantitative assays based on the use of replicatable hybridization probes. *Clin Chem.* 1989;35:1826-31.

3. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, et al. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*. 2016;530:228-32.
4. Maiden MCJ. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2006;60:561-88.
5. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol*. 2019;14:319-338.
6. Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J; ESCMID Study Group for Genomic and Molecular Diagnostics (ESGMD). Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24:355-60.
7. CryPTIC Consortium and the 100,000 Genomes Project, Allix-Béguec C, Arandjelovic I, Bi L, Beckert P, Bonnet M, Bradley P, et al. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N Engl J Med*. 2018;379:1403-15.
8. Greninger AL. The challenge of diagnostic metagenomics. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18:605-15.
9. Pires D, De Kraker MEA, Tartari E, Abbas M, Pittet D. 'Fight Antibiotic Resistance—It's in Your Hands': Call From the World Health Organization for 5th May 2017. *Clin Infect Dis*. 2017;64:1780-3.
10. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance. WHO; 2014.
11. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. *Microbe Magazine*. 2015;10:354-5.
12. Govindaraj Vaithinathan AG, Vanitha A. WHO global priority pathogens list on antibiotic resistance: an urgent need for action to integrate One Health data. *Perspect Public Health*. 2018;138:87-8.
13. Inouye M, Dashnow H, Raven L-A, Schultz MB, Pope BJ, Tomita T, et al. SRST2: Rapid genomic surveillance for public health and hospital microbiology labs. *Genome Med*. 2014;6:90.
14. Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, et al. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microb Genom*. 2017;3:e000131.
15. Pablos-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. World Health Organization-International Union against Tuberculosis and Lung Disease Working Group on Anti-Tuberculosis Drug Resistance Surveillance. *N Engl J Med*. 1998;338:1641-9.
16. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2018. WHO; 2018.
17. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:9869-74.
18. Papaventsis D, Casali N, Kontseva I, Drobniowski F, Cirillo DM, Nikolayevskyy V. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis* for detection of drug resistance: a systematic review. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:61-8.
19. Meehan CJ, Goig GA, Kohl TA, Verboven L, Dippenaar A, Ezewudo M, et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. *Nat Rev Microbiol*. 2019;17:533-45.
20. Cancino-Muñoz I, Moreno-Molina M, Furió V, Goig GA, Torres-Puente M, Chiner-Oms A, et al. Cryptic Resistance Mutations Associated With Misdiagnoses of Multidrug-Resistant Tuberculosis. *J Infect Dis*. 2019;220:316-20.
21. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, Hedge J, Del Ojo Elias C, Bradley P, et al; Modernizing Medical Microbiology (MMM) Informatics Group. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2015;15:1193-202.
22. Iwai H, Kato-Miyazawa M, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. CASTB (the comprehensive analysis server for the *Mycobacterium tuberculosis* complex): A publicly accessible web server for epidemiological analyses, drug-resistance prediction and phylogenetic comparison of clinical isolates. *Tuberculosis*. 2015;95:843-4.
23. Coll F, McNerney R, Preston MD, Guerra-Assunção JA, Warry A, Hill-Cawthorne G, et al. Rapid determination of anti-tuberculosis drug resistance from whole-genome sequences. *Genome Med*. 2015;7(1):51.
24. Feuerriegel S, Schleusener V, Beckert P, Kohl TA, Miotto P, Cirillo DM, et al. PhyResSE: a Web Tool Delineating *Mycobacterium tuberculosis* Antibiotic Resistance and Lineage from Whole-Genome Sequencing Data. *J Clin Microbiol*. 2015;53:1908-14.
25. Gröschel MI, Walker TM, Van der Werf TS, Lange C, Niemann S, Merker M. Pathogen-based precision medicine for drug-resistant tuberculosis. *PLoS Pathog*. 2018;14:e1007297.
26. Brussel A, Brack K, Muth E, Zirwes R, Cheval J, Hebert C, et al. Use of a new RNA next generation sequencing approach for the specific detection of virus infection in cells. *Biologicals*. 2019;59:29-36.
27. Asplund M, Kjartansdóttir KR, Mollerup S, Vinner L, Fridholm H, Herrera JAR, et al. Contaminating viral sequences in high-throughput sequencing viromics: a linkage study of 700 sequencing libraries. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:1277-85.
28. Kawada J-I, Okuno Y, Torii Y, Okada R, Hayano S, Ando S, et al. Identification of Viruses in Cases of Pediatric Acute Encephalitis and Encephalopathy Using Next-Generation Sequencing. *Sci Rep*. 2016;6:33452.
29. Doan T, Wilson MR, Crawford ED, Chow ED, Khan LM, Knopp KA, et al. Illuminating uveitis: metagenomic deep sequencing identifies common and rare pathogens. *Genome Med*. 2016;8:90.
30. Mohamed S, Penaranda G, Gonzalez D, Camus C, Khiri H, Boulmé R, et al. Comparison of ultra-deep versus Sanger sequencing detection of minority mutations on the HIV-1 drug resistance interpretations after virological failure. *AIDS*. 2014;28:1315-24.
31. Tzou PL, Ariyaratne P, Varghese V, Lee C, Rakhmanaliev E, Villy C, et al. Comparison of an Diagnostic Next-Generation Sequencing Assay with Sanger Sequencing for HIV-1 Genotypic Resistance Testing. *J Clin Microbiol*. 2018;56:00105-18.
32. Raymond S, Nicot F, Carcenac R, Lefebvre C, Jeanne N, Saune K, et al. HIV-1 genotypic resistance testing using the Vela automated next-generation sequencing platform. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:1152-7.
33. Mbisa JL, Kirwan P, Tostevin A, Ledesma J, Bibby DF, Brown A, et al; UK HIV Drug Resistance Database. Determining the Origins of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Drug-resistant Minority Variants in People Who Are Recently Infected Using Phylogenetic Reconstruction. *Clin Infect Dis*. 2019;69:1136-43.
34. Abdelrahman T, Hughes J, Main J, McLauchlan J, Thurst M, Thomson E. Next-generation sequencing sheds light on the natural history of hepatitis C infection in patients who fail treatment. *Hepatology*. 2015;61:88-97.
35. Abe H, Hayes CN, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Miki D, et al. A translational study of resistance emergence using sequential direct-acting antiviral agents for hepatitis C using ultra-deep sequencing. *Am J Gastroenterol*. 2013;108:1464-72.
36. Garrigue I, Moulinas R, Recordon-Pinson P, Delacour ML, Essig M, Kaminski H, et al. Contribution of next generation sequencing to early detection of cytomegalovirus UL97 emerging mutants and viral subpopulations analysis in kidney transplant recipients. *J Clin Virol*. 2016;80:74-81.
37. Lowe CF, Merrick L, Harrigan PR, Mazzulli T, Sherlock CH, Ritchie G. Implementation of Next-Generation Sequencing for Hepatitis B Virus Resistance Testing and Genotyping in a Clinical Microbiology Laboratory. *J Clin Microbiol*. 2016;54:127-33.
38. Watanabe S, Morimoto N, Miura K, Takaoka Y, Nomoto H, Tsukui M, et al. Full-genome characterization of the RIVM-HAV16-090-like hepatitis A virus strains recovered from Japanese men who have sex with men, with sporadic acute hepatitis A. *Hepatol Res*. 2019;49:521-30.
39. Goldhill DH, Langat P, Xie H, Galiano M, Miah S, Kellam P, et al. Determining the Mutation Bias of Favipiravir in Influenza Virus Using Next-Generation Sequencing. *J Virol*. 2019;93:e01217-18.
40. Günthard HF, Calvez V, Paredes R, Pillay D, Shafer RW, Wensing AM, et al. Human Immunodeficiency Virus Drug Resistance: 2018 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *Clin Infect Dis*. 2019;68:177-87.
41. Cozzi-Lepri A, Noguera-Julian M, Di Giallonardo F, Schuurman R, Däumer M, Aitken S, et al; CHAIN Minority HIV-1 Variants Working Group. Low-frequency drug-resistant HIV-1 and risk of virological failure to first-line NNRTI-based ART: a multicohort European case-control study using centralized ultrasensitive 454 pyrosequencing. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70:930-40.
42. Metzner KJ, Rauch P, Von Wyl V, Leemann C, Grube C, Kuster H, et al. Efficient suppression of minority drug-resistant HIV type 1 (HIV-1) variants present at primary HIV-1 infection by ritonavir-boosted protease inhibitor-containing antiretroviral therapy. *J Infect Dis*. 2010;201:1063-71.
43. Metzner KJ, Scherrer AU, Von Wyl V, Böni J, Yerly S, Klimkait T, et al; Swiss HIV Cohort Study. Limited clinical benefit of minority K103N and Y181C-variant detection in addition to routine genotypic resistance testing in antiretroviral therapy-naïve patients. *AIDS*. 2014;28:2231-9.
44. Li JZ, Paredes R, Ribaldo HJ, Svarovskaia ES, Metzner KJ, Kozal MJ, et al. Low-frequency HIV-1 drug resistance mutations and risk of NNRTI-based antiretroviral treatment failure: a systematic review and pooled analysis. *JAMA*. 2011;305:1327-35.
45. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, Decker JM, Pham KT, Salazar MG, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:7552-7.
46. Rieder P, Joos B, Scherrer AU, Kuster H, Braun D, Grube C, et al. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) diversity and tropism in 145 patients with primary HIV-1 infection. *Clin Infect Dis*. 2011;53:1271-9.
47. Blackard JT, Ma G, Sengupta S, Martin CM, Powell EA, Shata MT, et al. Evidence of distinct populations of hepatitis C virus in the liver and plasma of patients co-infected with HIV and HCV. *J Med Virol*. 2014;86:1332-41.
48. Brown RJP, Peters PJ, Caron C, Gonzalez-Perez MP, Stones L, Ankghumbomb C, et al. Intercompartmental recombination of HIV-1 to env intrahost diversity and modulates viral tropism and sensitivity to entry inhibitors. *J Virol*. 2011;85:6024-37.
49. Mabvukure BM, Lambson BE, Ramdayal K, Masson L, Kitchin D, Allam M, et al. Evidence for both Intermittent and Persistent Compartmentalization of HIV-1 in the Female Genital Tract. *J Virol*. 2019;93:e00311-19.
50. Pérez PS, Di Lello FA, Mullen EG, Galdame OA, Livellara BI, Gadano AC, et al. Compartmentalization of hepatitis C virus variants in patients with hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog*. 2017;56:371-80.
51. Capoferri AA, Bale MJ, Simonetti FR, Kearney MF. Phylogenetic inference for the study of within-host HIV-1 dynamics and persistence on antiretroviral therapy. *The Lancet HIV*. 2019;6:e325-33.
52. Caro-Pérez N, Martínez-Rebollar M, Gregori J, Quer J, González P, Gambato M, et al. Phylogenetic analysis of an epidemic outbreak of acute hepatitis C in HIV-infected patients by ultra-deep pyrosequencing. *J Clin Virol*. 2017;92:42-7.
53. Wu J, Hu Z, Yao H, Wang H, Lei Y, Zhong P, et al. The inference of HIV-1 transmission direction between HIV-1 positive couples based on the sequences of HIV-1 quasi-species. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):566.
54. Gire SK, Goba A, Andersen KG, Sealfon RS, Park DJ, Kanneh L, et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science*. 2014;345:1369-72.
55. Faria NR, Sabino EC, Nunes MRT, Alcantara LCJ, Loman NJ, Pybus OG. Mobile real-time surveillance of Zika virus in Brazil. *Genome Med*. 2016;8:97.
56. Faria NR, Quick J, Claro IM, Théze J, de Jesus JG, Giovanetti M, et al. Establishment and cryptic transmission of Zika virus in Brazil and the Americas. *Nature*. 2017;546:406-10.
57. Stapleford KA, Moratorio G, Henningsson R, Chen R, Matheus S, Enfissi A, et al. Whole-Genome Sequencing Analysis from the Chikungunya Virus Caribbean Out-

- break Reveals Novel Evolutionary Genomic Elements. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10(1):e0004402.
58. Rose R, Hall M, Redd AD, Lamers S, Barbier AE, Porcella SF, et al. Phylogenetic Methods Inconsistently Predict the Direction of HIV Transmission Among Heterosexual Pairs in the HPTN 052 Cohort. *J Infect Dis.* 2019;220:1406-13.
  59. Siljic M, Salemovic D, Cirkovic V, Pesic-Pavlovic I, Ranin J, Todorovic M, et al. Forensic application of phylogenetic analyses - Exploration of suspected HIV-1 transmission case. *Forensic Sci Int Genet.* 2017;27:100-5.
  60. Yu F, Wen Y, Wang J, Gong Y, Feng K, Ye R, et al. The Transmission and Evolution of HIV-1 Quasispecies within One Couple: a Follow-up Study based on Next-Generation Sequencing. *Sci Rep.* 2018;8:1404.
  61. Todesco E, Wirden M, Calin R, Simon A, Sayon S, Barin F, et al. Caution is needed in interpreting HIV transmission chains by ultradeep sequencing. *AIDS.* 2019;33:691-9.
  62. Abecasis AB, Pingarilho M, Vandamme A-M. Phylogenetic analysis as a forensic tool in HIV transmission investigations. *AIDS.* 2018;32:543-54.
  63. Wilson MR, Naccache SN, Samayoa E, Biagtan M, Bashir H, Yu G, et al. Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing. *N Engl J Med.* 2014;370:2408-17.
  64. Kafetzopoulou LE, Pullan ST, Lemey P, Suchard MA, Ehichioya DU, Pahlmann M, et al. Metagenomic sequencing at the epicenter of the Nigeria 2018 Lassa fever outbreak. *Science.* 2019;363:74-7.
  65. Mu A, Kwong JC, Isles NS, Gonçalves da Silva A, Schultz MB, Ballard SA, et al. Reconstruction of the Genomes of Drug-Resistant Pathogens for Outbreak Investigation through Metagenomic Sequencing. *mSphere.* 2019;4:e00529-18.
  66. Casto AM, Adler AL, Makhsous N, Crawford K, Qin X, Kuypers JM, et al. Prospective, Real-time Metagenomic Sequencing During Norovirus Outbreak Reveals Discrete Transmission Clusters. *Clin Infect Dis.* 2019;69:941-8.
  67. Young VB. The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ.* 2017;356:j831.
  68. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome Med.* 2016;8(1):42.
  69. Haran JP, Bhattacharai SK, Foley SE, Dutta P, Ward DV, Bucci V, et al. Alzheimer's Disease Microbiome Is Associated with Dysregulation of the Anti-Inflammatory P-Glycoprotein Pathway. *MBio.* 2019;10:e00632-19.
  70. Van Nood E, Vrieeze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, De Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2013;368:407-15.
  71. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24:335-41.
  72. Sherry NL, Porter JL, Seemann T, Watkins A, Stinear TP, Howden BP. Outbreak investigation using high-throughput genome sequencing within a diagnostic microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1396-401.
  73. Harris SR, Feil EJ, Holden MTG, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, et al. Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread. *Science.* 2010;327:469-74.
  74. Ruiz-Hueso P. Epidemiología molecular y genómica de aislados resistentes a *Pseudomonas aeruginosa* de origen hospitalario. Tesis Doctoral. Universitat de Valencia; 2019.
  75. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist Updat.* 2015;21-22:41-59.
  76. Comas I. Genomic Epidemiology of Tuberculosis. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1019:79-93.
  77. Wyllie DH, Davidson JA, Grace Smith E, Rathod P, Crook DW, Peto TEA, et al. A Quantitative Evaluation of MIRU-VNTR Typing Against Whole-Genome Sequencing for Identifying Mycobacterium tuberculosis Transmission: A Prospective Observational Cohort Study. *EBioMedicine.* 2018;34:122-10.
  78. Stucki D, Ballif M, Egger M, Furrer H, Altpeter E, Battegay M, et al. Standard Genotyping Overestimates Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* among Immigrants in a Low-Incidence Country. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1862-70.
  79. Fiebig L, Kohl TA, Popovici O, Mühlenfeld M, Indra A, Homorocean D, et al. A joint cross-border investigation of a cluster of multidrug-resistant tuberculosis in Austria, Romania and Germany in 2014 using classic, genotyping and whole genome sequencing methods: lessons learnt. *Euro Surveill.* 2017;22:30439.
  80. Budowle B, Murch R, Chakraborty R. Microbial forensics: the next forensic challenge. *Int J Legal Med.* 2005;119:317-30.
  81. Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, et al; National Anthrax Epidemiologic Investigation Team. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1019-28.
  82. Hoffmaster AR, Fitzgerald CC, Ribot E, Mayer LW, Popovic T. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis* and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak, United States. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:1111-6.
  83. Francés-Cuesta C, De la Caba I, Idigoras P, Fernández-Rodríguez A, Del Valle Pérez D, Marimón JM, et al. Whole-genome sequencing of *Neisseria gonorrhoeae* in a forensic transmission case. *Forensic Sci Int Genet.* 2019;42:141-6.
  84. Unemo M, Dillon J-AR. Review and international recommendation of methods for typing *neisseria gonorrhoeae* isolates and their implications for improved knowledge of gonococcal epidemiology, treatment, and biology. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24:447-58.
  85. Köser CU, Ellington MJ, Cartwright EJP, Gillespie SH, Brown NM, Farrington M, et al. Routine use of microbial whole genome sequencing in diagnostic and public health microbiology. *PLoS Pathog.* 2012;8:e1002824.
  86. Gwinn M, MacCannell D, Armstrong GL. Next-Generation Sequencing of Infectious Pathogens. *JAMA.* 2019;321:893-4.
  87. Gardy JL, Loman NJ. Towards a genomics-informed, real-time, global pathogen surveillance system. *Nat Rev Genet.* 2018;19:9-20.