



Typage et comparaisons de souches : rôle et implications

BARON Sophie

MCU-PH

sophie.baron.2@univ-amu.fr

Plan du cours

Pré-requis : concept d'espèce bactérienne/ clonalité bactérienne

Méthodes phénotypiques

Méthodes génotypiques

- Méthode « gène par gène » : MLST et Dérivés

- Comparaison à une référence = Mapping

- Méthode comparaison 2 à 2 : k-mers

- Critère pour définir la clonalité

Séquençage génomique : les bases

Exemples pratiques

- Cas pratique n°1

- Cas pratique n°2

- Cas pratique n°3

Conclusion

Pré-requis : Concept d'espèce bactérienne

- **Espèce bactérienne basée sur le phénotype = Taxospecies (phenospecies)**

Ensemble d'individus ayant en commun la majorité de leurs caractères, et donc phénotypiquement plus ou moins semblables.

Choix des caractères :

Coloration de Gram

Morphologie

Mobilité

Capacité à sporuler

Température de croissance

Besoins nutritionnels

Mode respiratoire

Capacité de photosynthèse

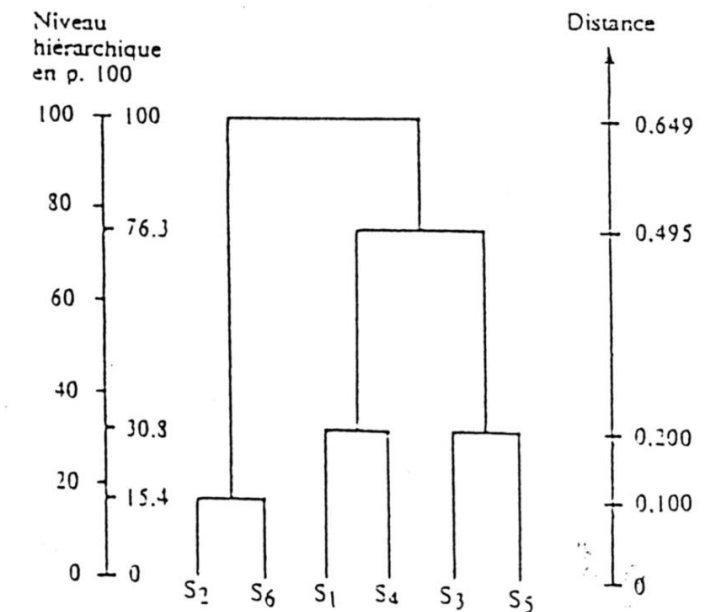
Utilisation des différentes sources de carbone ou d'azote

...

Codage

Souches	Réponses aux tests T1 à T20
	0: caractère négatif; 1: caractère positif
S1	001 001 011 111 101 000 00
S2	111 011 000 011 101 010 00
S3	001 001 011 101 011 000 10
S4	001 100 011 111 101 000 00
S5	010 001 011 101 011 000 10
S6	011 011 000 011 101 010 00

Dendrogramme



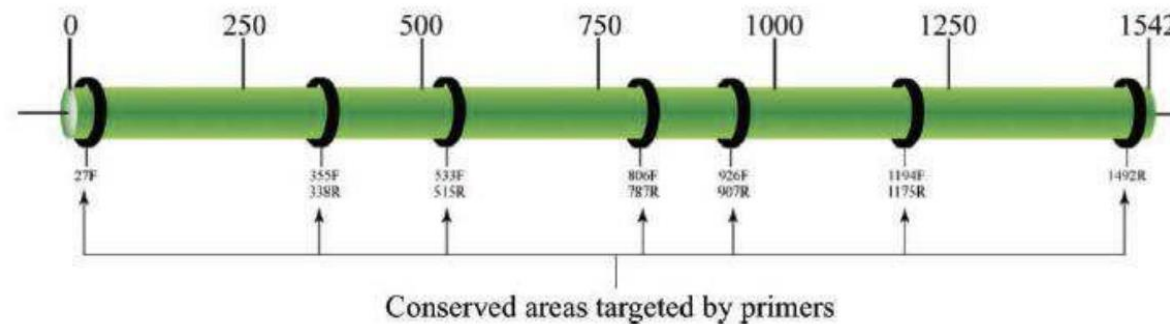
Pré-requis : Concept d'espèce bactérienne

- **La genospecies**: ensemble d'individus complètement ou partiellement identiques d'un point de vue génétique.

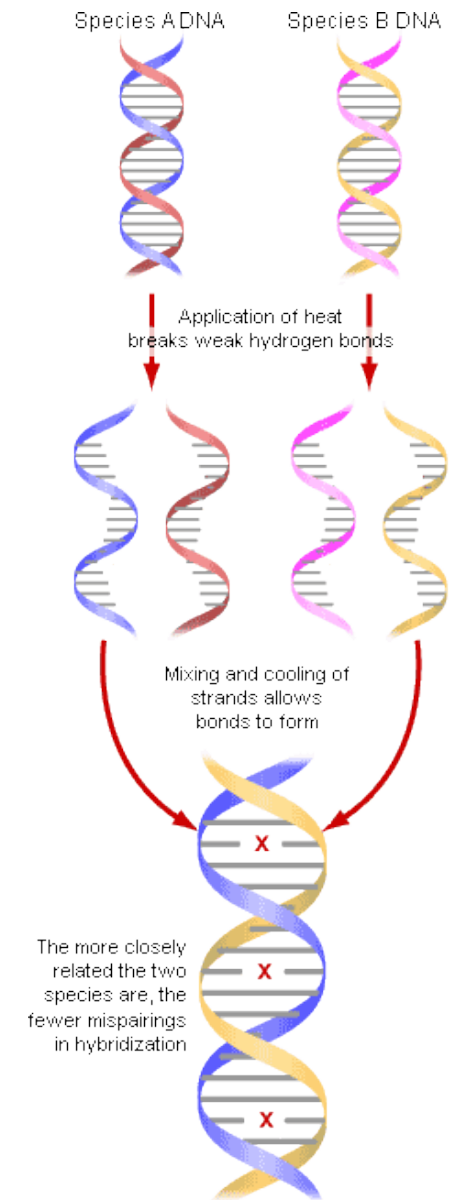
Définit en fonction :

- **GC%** ou coefficient de CHARGAFF
- La séquence de **l'ARN ribosomal 16S**
- Le taux d'**hybridation ADN/ADN (DDH)**

Structure ARNr 16S



Même espèce =
GC% identique
ARNr 16S similarité >97%
Hybridation ADN/ADN > 70%



Pré-requis : Concept d'espèce bactérienne

Division asexuée par mitose

MAIS

Plasticité génome bactérien

Mutations chromosomiques, réarrangements

Perte de matériel génétique

Acquisition de matériel génétique :

Acquisition de plasmides

Acquisition d'îlots génomiques au niveau du chromosome

Changements **stables ou transitoires**

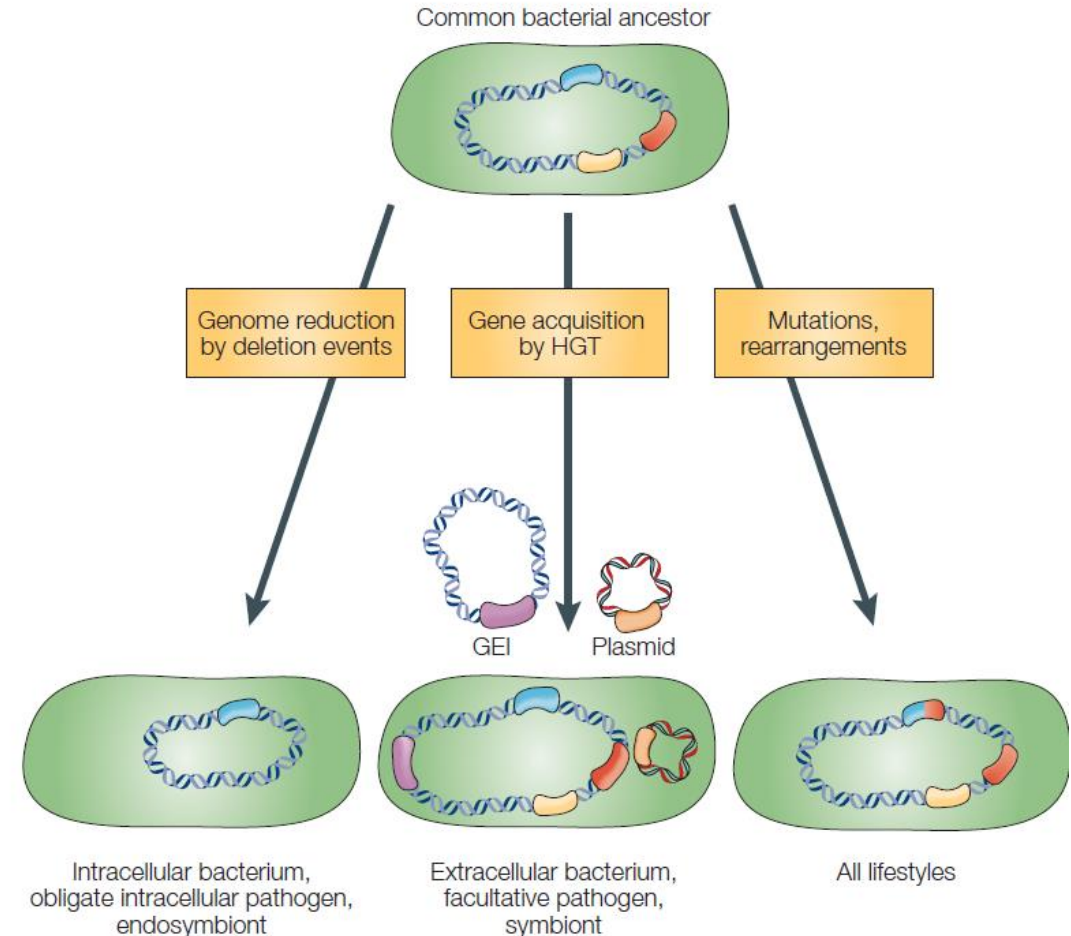
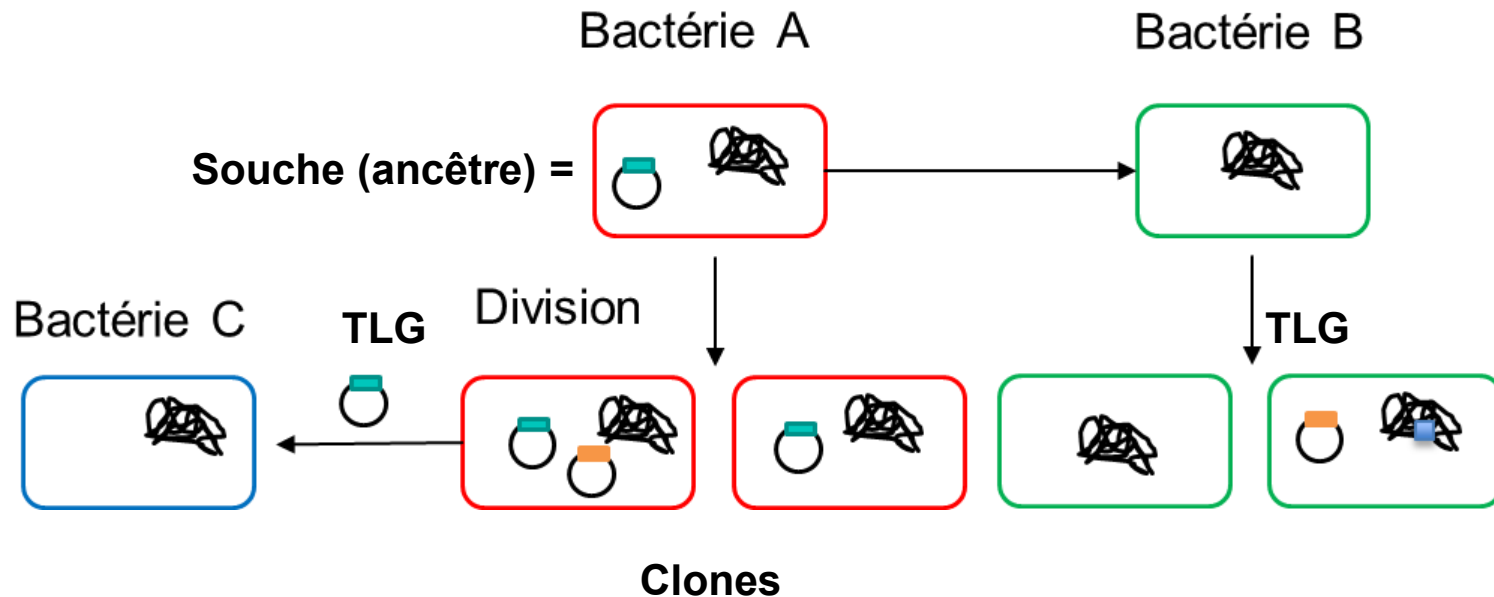


Figure 1 | Evolution of bacterial variants by acquisition and loss of genetic information.

TLG : Transfert latéral de gène \approx reproduction sexuée

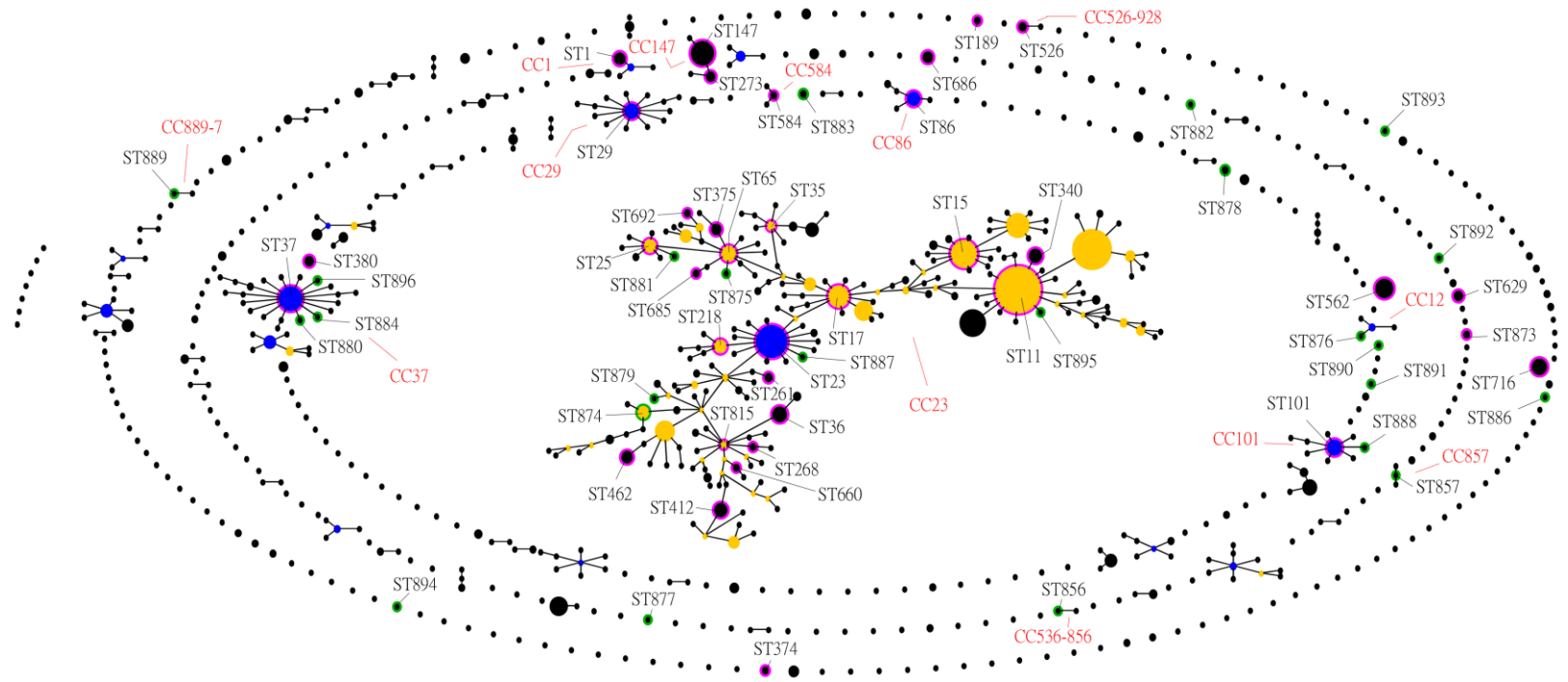
Comment définit-on la clonalité bactérienne ?

- La clonalité bactérienne désigne un ensemble de bactéries **génétiquement identiques**, **descendantes d'une seule cellule ancestrale**, formant ainsi un groupe **homogène** au sein d'une espèce.
- Bactéries clonales = lignée cellulaire complètement ou partiellement identique au sens génétique et issue d'une même souche (ancêtre)



Comment définit-on la clonalité bactérienne ?

- Différences **phénotypiques** au sein d'une même espèce bactérienne : **clone particulier induisant une pathologie ou présentant des différences phénotypiques.**
- Différences de **pathogénicité** : souches/clones pathologiques vs portage asymptomatique de nombreuses bactéries (*S. aureus*, *Vibrio*....)



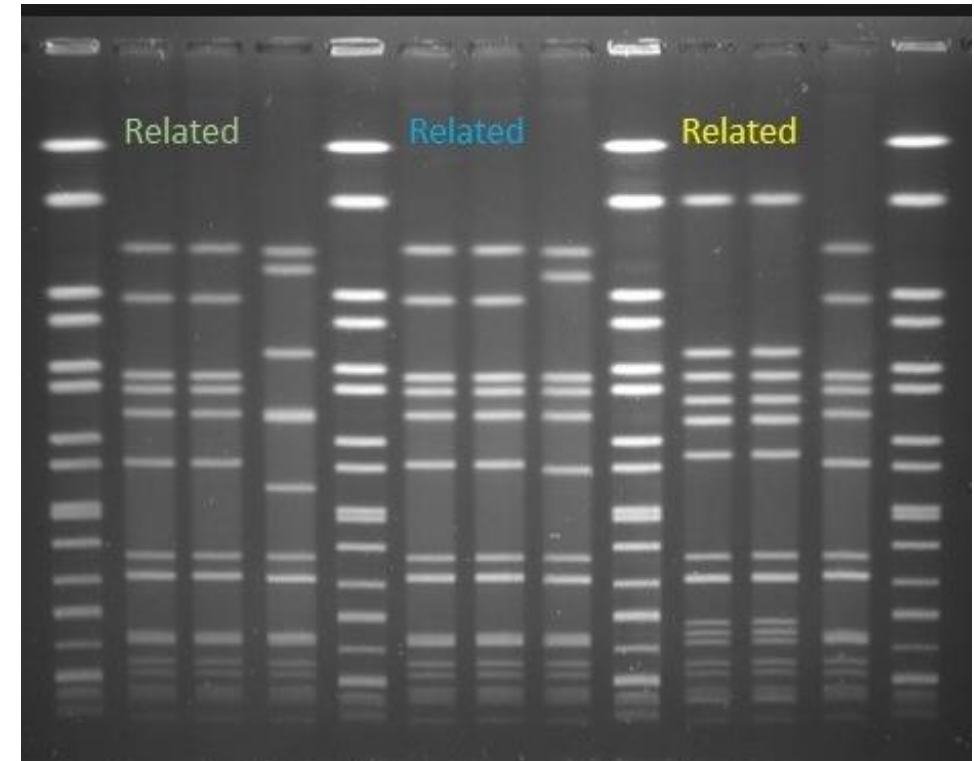
Snapshot de la population de *Klebsiella pneumoniae*

Quelles sont les méthodes utilisées pour détecter une clonalité ?

METHODES PHENOTYPIQUES

- Méthodes **phénotypiques** basée sur les caractères :
 - Biochimiques (classification en biotypes ou biovars)
 - Antigéniques (classification en sérotypes ou sérovars)
 - De sensibilité aux antibiotiques (classification en antibiotypes)
 - De sensibilité aux bactériophages (classification en lysotypes ou lysovars)...
- Méthodes **phénotypiques moléculaires** :
 - Electrophorèse multilocus des isoenzymes (MLEE)
 - Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)
 - Electrophorèse en champs pulsé (PFGE)
 - Amplification aléatoire d'ADN polymorphe (RAPD)...

**Niveau local ++
Fastidieux**



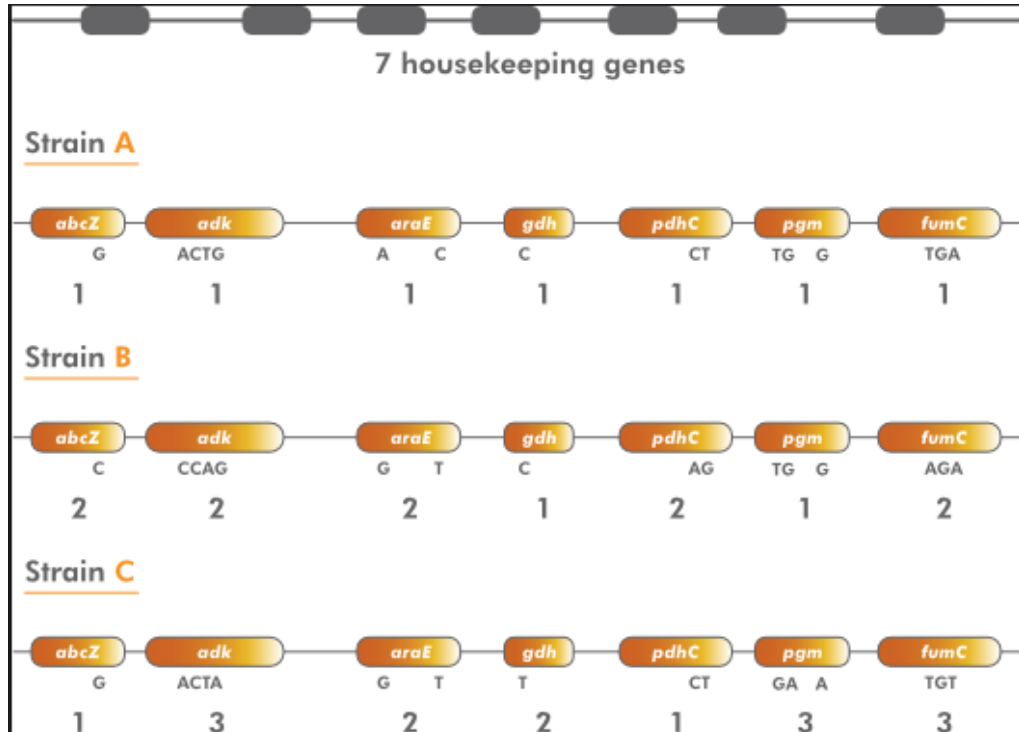
Quelles sont les méthodes utilisées pour détecter une clonalité ?

METHODES GENOMIQUES

3 grands types d'approches :

- **Approche gène-par-gène**, dite *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST) et ses dérivés : analyse de **marqueurs génétiques prédéfinis**, typiquement les gènes en copie unique dans les génomes.
- Alignement et comparaison à des **séquences de référence** contre lesquelles les génomes étudiés seront alignés et comparés.
- **Comparaison deux à deux** : comparaison du contenu en 'mots' c'est-à-dire en séquences nucléotidiques d'une longueur 'k' choisie, appelés **k-mères**.

MLST = Multi Locus Sequence Typing



- Composée de plusieurs **gènes de ménage (7)** (*présent dans tous les génomes d'une même espèce*)
- Identification de **toutes** les mutations (*SNP = single nucleotide polymorphism*) de chaque gene
- Chaque **variant** du gène est codé par un allele
- Combinaison des 7 allèles = 1 séquenço-type (*ST = Sequence Type*)

MLST de *K. pneumoniae* ST307 et ST147

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
307	4	1	2	52	1	1	7

ST	gapA	infB	mdh	pgi	phoE	rpoB	tonB
147	3	4	6	1	7	4	38

MLST et dérivés

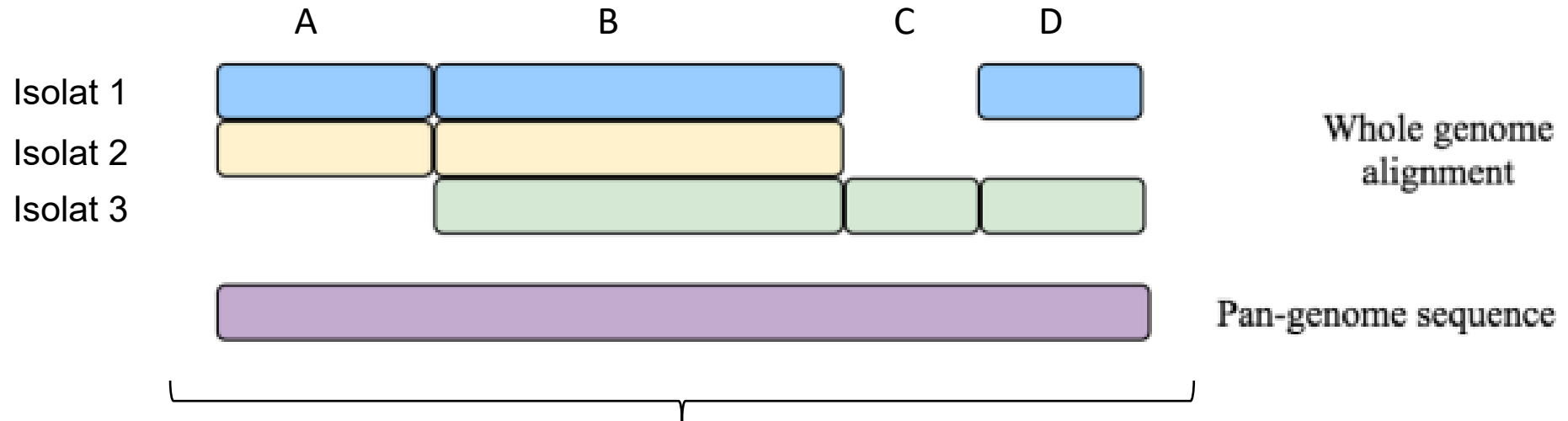
- **rMLST : Ribosomal MLST**

MLST basée sur l'analyse des 53 gènes codant pour les sous-unités protéiques du ribosome bactérien (gènes rps) afin d'intégrer la taxonomie et le typage microbiens

- **cgMLST : core genome MLST**

MLST basée sur l'analyse de l'ensemble des gènes composant le core génome d'une espèce bactérienne

Pangénome Bactérien



Pangenome = core genome (B) + gènes accessoires (AD) + gènes spécifiques (C)

Klebsiella pneumoniae/variicola/quasipneumoniae cgMLST

Show Targets

Name	K. pneumoniae sensu lato cgMLST
Version	1.0
Seed Genome	NTUH-K2044 (NC_012731.1, 15-JUN-2016)
Genus	Klebsiella
Species	pneumoniae/variicola/quasipneumoniae
Locus Count	2,358
Complex Type Distance	15
Complex Type Count	19,661
Last Change	Sep 19, 2025, 4:28 PM
Curators	J. Rossen, Department of Medical Microbiology, University of Groningen, the Netherlands
	D. Harmsen, University Münster, Germany
Publications	Weber RE, Pietsch M, Frühauf A, Pfeifer Y, Martin M, Luft D, Gatermann S, Pfennigwerth N, Kaase M, Werner G, and Fuchs S. IS26-Mediated Transfer of blaNDM-1 as the Main Route of Resistance Transmission During a Polyclonal, Multispecies Outbreak in a German Hospital. <i>Front Microbiol.</i> 2019, 10 : 2817 [PubMed 31921015]
	Piazza A, Comandatore F, Romeri F, Brilli M, Dichirico B, Ridolfo A, Antona C, Bandi C, Gismondo MR, and Rimoldi SG. Identification of blaVIM-1 Gene in ST307 and ST661 <i>Klebsiella pneumoniae</i> Clones in Italy: Old Acquaintances for New Combinations. <i>Microb. Drug Resist.</i> 2019, 25 : 787-790 [PubMed 30589602]

MLST et dérivés

- **rMLST : Ribosomal MLST**

MLST basée sur l'analyse des 53 gènes codant pour les sous-unités protéiques du ribosome bactérien (gènes rps) afin d'intégrer la taxonomie et le typage microbiens

- **cgMLST : core genome MLST**

MLST basée sur l'analyse de l'ensemble des gènes composant le core génome d'une espèce bactérienne

Avantages

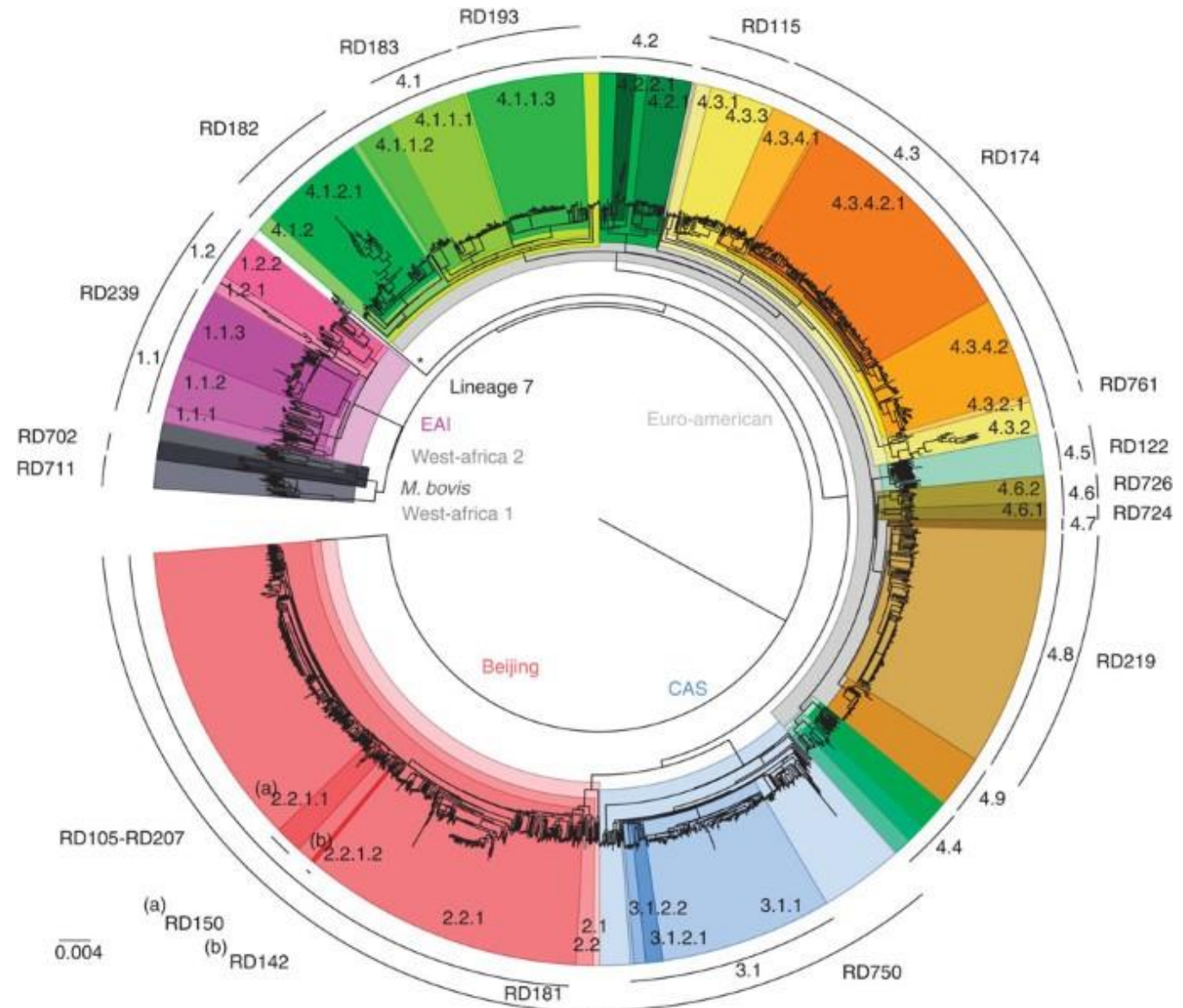
- Génotypes standardisés, portables, compréhensibles.
- Nomenclature des principales lignées phylogénétiques (ou groupes clonaux) au sein des espèces bactériennes

Inconvénients

- Incompatible pour les pathogènes présentant une diversité génétique insuffisante (*Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella Typhi*)

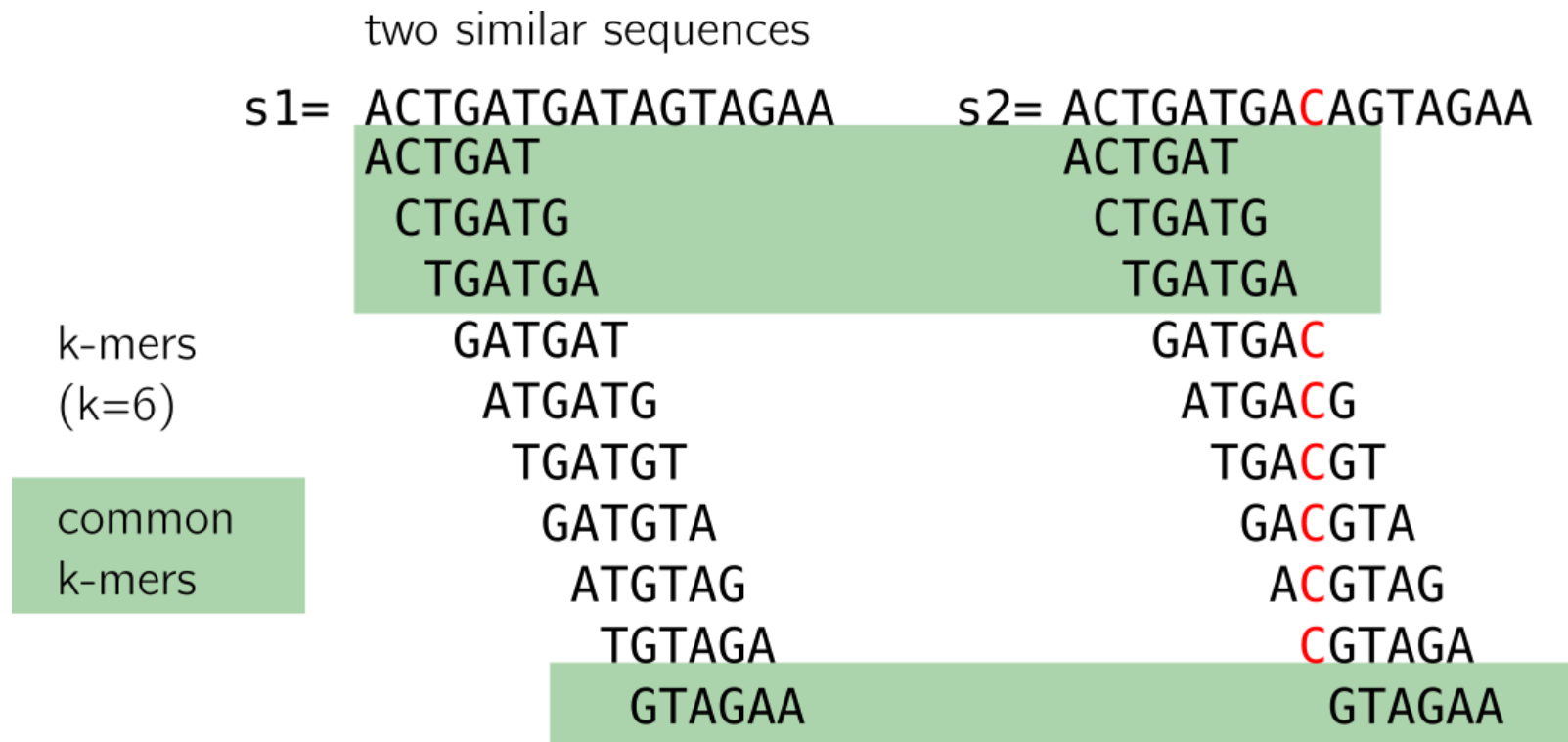
SNPs canoniques

- Comparaison à un génome de référence
- **RD = Region of Difference**
- Répartis dans l'ensemble du génome
- « Signature » spécifique d'une lignée, clade, clone
- Exemple : lignée de *M. tuberculosis*



Comparaison deux à deux : k-mères

- **k-mères** : sous-chaîne de longueur k d'une chaîne de caractères plus grande.
- Pour un génome : extraction de toutes les sous-séquences de longueur fixe (k) de chaque génome,
- Comparaison de la fréquence et de la composition de ces k-mères entre eux.



Comparaison deux à deux: résultats

Nombre de SNPs entre chaque génome pris deux à deux

	Génome 1	Génome 2	Génome 3	Génome 4
Génome 1		2	5	535
Génome 2			3	600
Génome 3				564
Génome 4				

Quel critère pour définir la clonalité

Pas de recommandation officielle, uniquement propositions basées sur un nombre limité de travaux

Table 1

Examples of relatedness criteria for wg/cgMLST and SNP typing schemes of representative clinically relevant bacteria

Organism	Relatedness threshold ^a		References
	wg/cgMLST (allele)	SNPs	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	≤8	≤3	[25,26]
<i>Brucella</i> spp.	Epidemiologic validation in progress ^b		http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst
<i>Campylobacter coli</i> , <i>C. jejuni</i>	≤14	≤15	[27,28]
<i>Cronobacter</i> spp.	Epidemiologic validation in progress ^b		http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst
<i>Clostridium difficile</i>	Epidemiologic validation in progress ^b	≤4	[29], http://www.cgmlst.org/ncs , http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst
<i>Enterococcus faecium</i>	≤20	≤16	[30]
<i>Enterococcus raffinosus</i>	Epidemiologic validation in progress ^b		http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst
<i>Escherichia coli</i>	≤10	≤10	[31,32], https://enterobase.warwick.ac.uk/
<i>Francisella tularensis</i>	≤1	≤2	[33,34]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Epidemiologic validation in progress ^b		http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst
<i>Klebsiella pneumonia</i>	≤10	≤18	[35,36]
<i>Legionella pneumophila</i>	≤4	≤15	[37]
<i>Listeria monocytogenes</i>	≤10	≤3	[38,39]
<i>Mycobacterium abscessus</i>		≤30	[40]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	≤12	≤12	[41]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Epidemiologic validation in progress ^b	≤14	[42], http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst
<i>Neisseria meningitidis</i>	Epidemiologic validation in progress ^b		http://www.cgmlst.org/ncs
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤14	≤37	[31,43]
<i>Salmonella dublin</i>	Epidemiologic validation in progress ^b	≤13	[44], https://enterobase.warwick.ac.uk/
<i>Salmonella enterica</i>	Epidemiologic validation in progress ^b	≤4	[45], http://www.cgmlst.org/ncs , http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst , https://enterobase.warwick.ac.uk/
<i>Salmonella typhimurium</i>	Epidemiologic validation in progress ^b	≤2	[46], https://enterobase.warwick.ac.uk/
<i>Staphylococcus aureus</i>	≤24	≤15	[47,48]
<i>Streptococcus suis</i>		≤21	[49]
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	≤10		[50]
<i>Yersinia</i> spp.	0		[51]

cg, core genome; MLST, multilocus sequence typing; SNP, single nucleotide polymorphism; wg, whole genome.

^a Data often represent single studies that can be used to begin formulation of species-specific interpretation criteria. Thus, these data should be coupled with newly published similar studies to ensure that resulting values are not atypical and can be generally applied.

^b Proposed wg/cgMLST schemes are available online (<http://www.cgmlst.org/ncs>, <http://www.applied-maths.com/applications/wgmlst>, <https://enterobase.warwick.ac.uk/>) but as yet have not been epidemiologically validated.

Variabilité génétique et bactérie

- Dépend du **taux de mutation** des bactéries :
 - Ex : *Mycobacterium tuberculosis* \simeq 4 SNPs / an
 - *Helicobacter pylori* \simeq 30 SNPs / an
- Dépend de la **fréquence des évènements de recombinaison**, échange de matériel génétique entre les bactéries :
 - Rare chez *M. tuberculosis*
 - Très fréquent chez *Streptococcus pneumoniae* (gènes mosaïque), *H. pylori*
- Variations du contenu génétique causé par de large insertions, délétions, réarrangements, transfert d'ADN exogène, éléments extrachromosomique (plasmides, phages...)

Quelles sont les méthodes utilisées pour détecter une clonalité ?

METHODES BASEES SUR L'ANALYSE GENOMIQUE

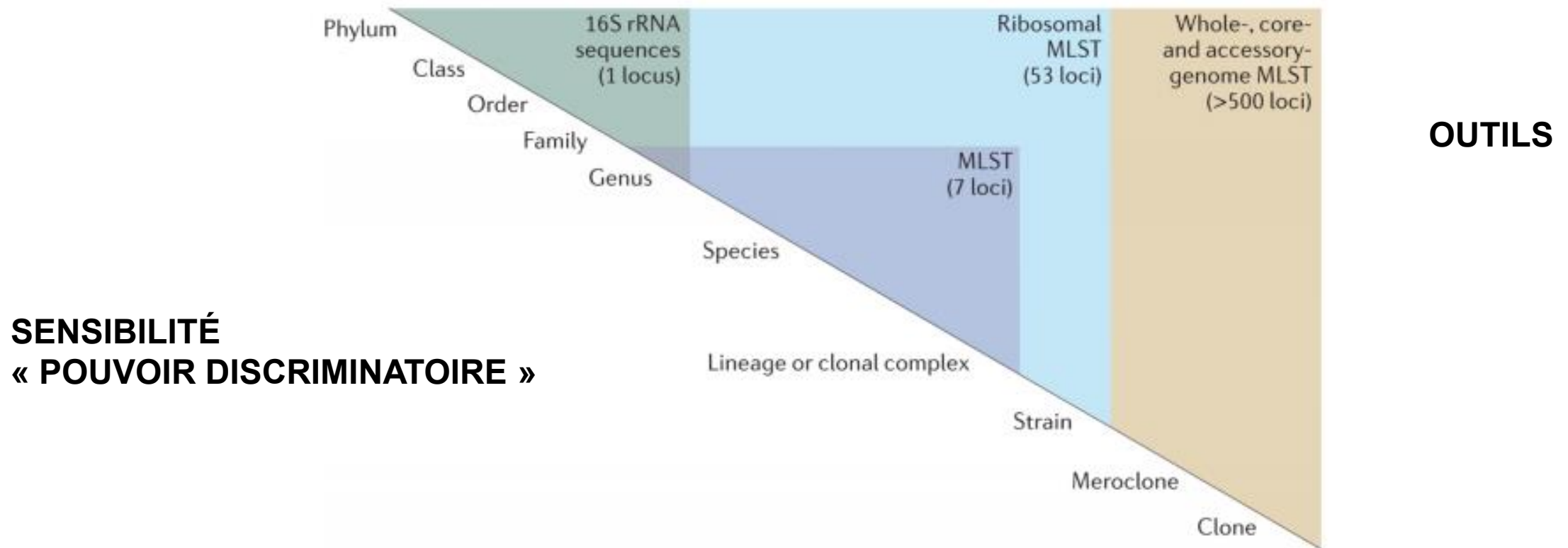
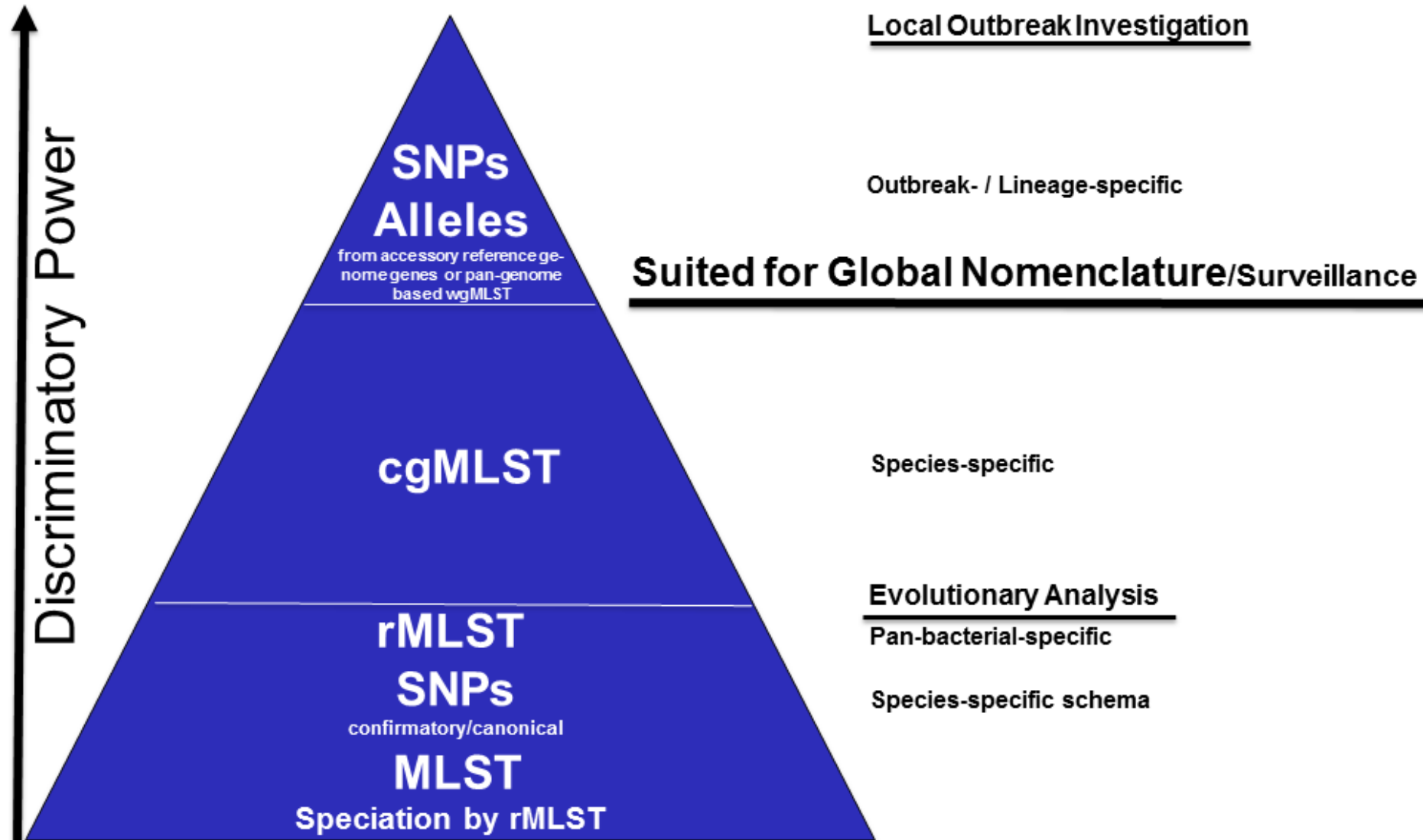


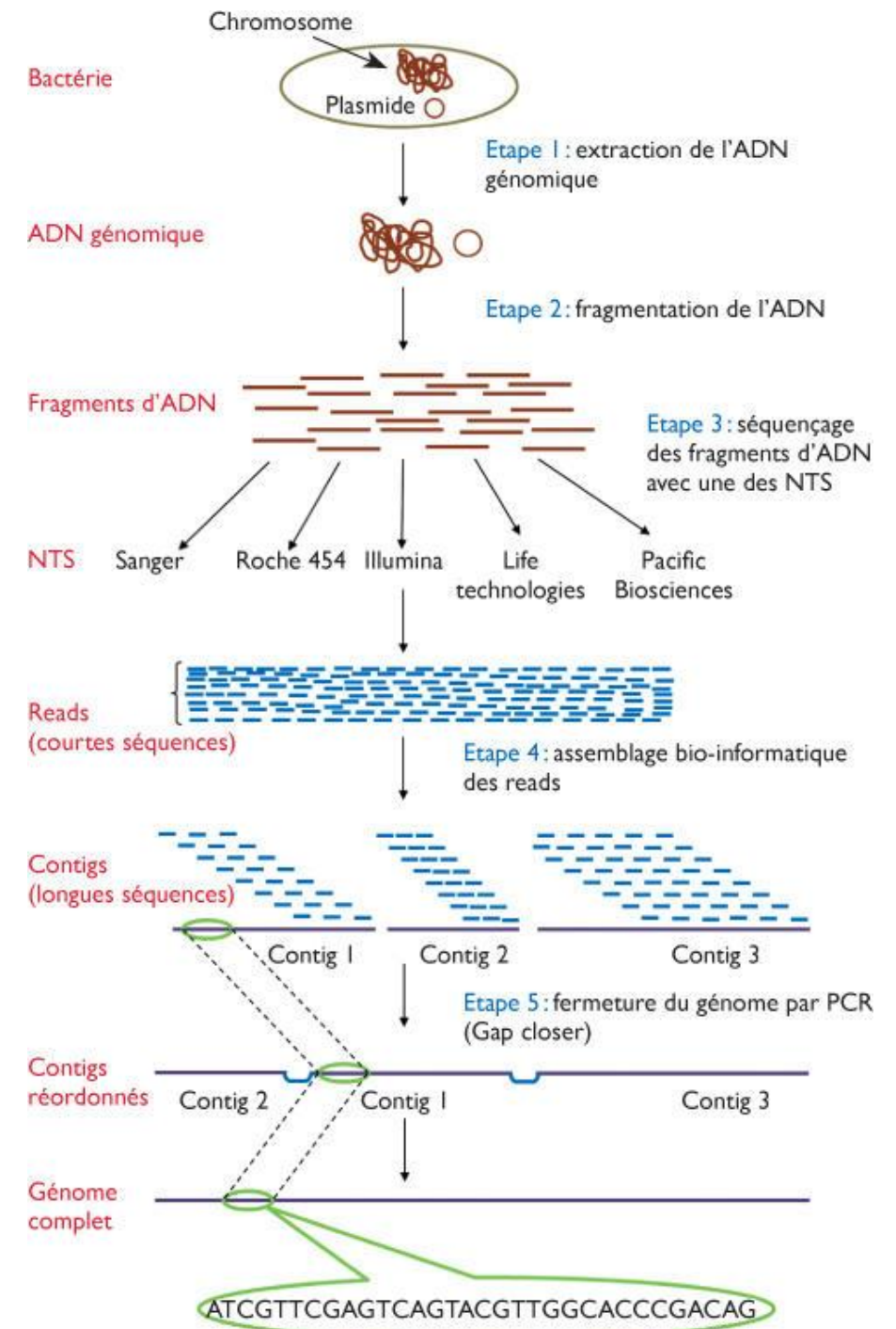
Figure 2. Relating sequence data to nomenclature schemes

Quelles sont les méthodes pour identifier un clone bactérien ?



Séquençage génome entier

Principe

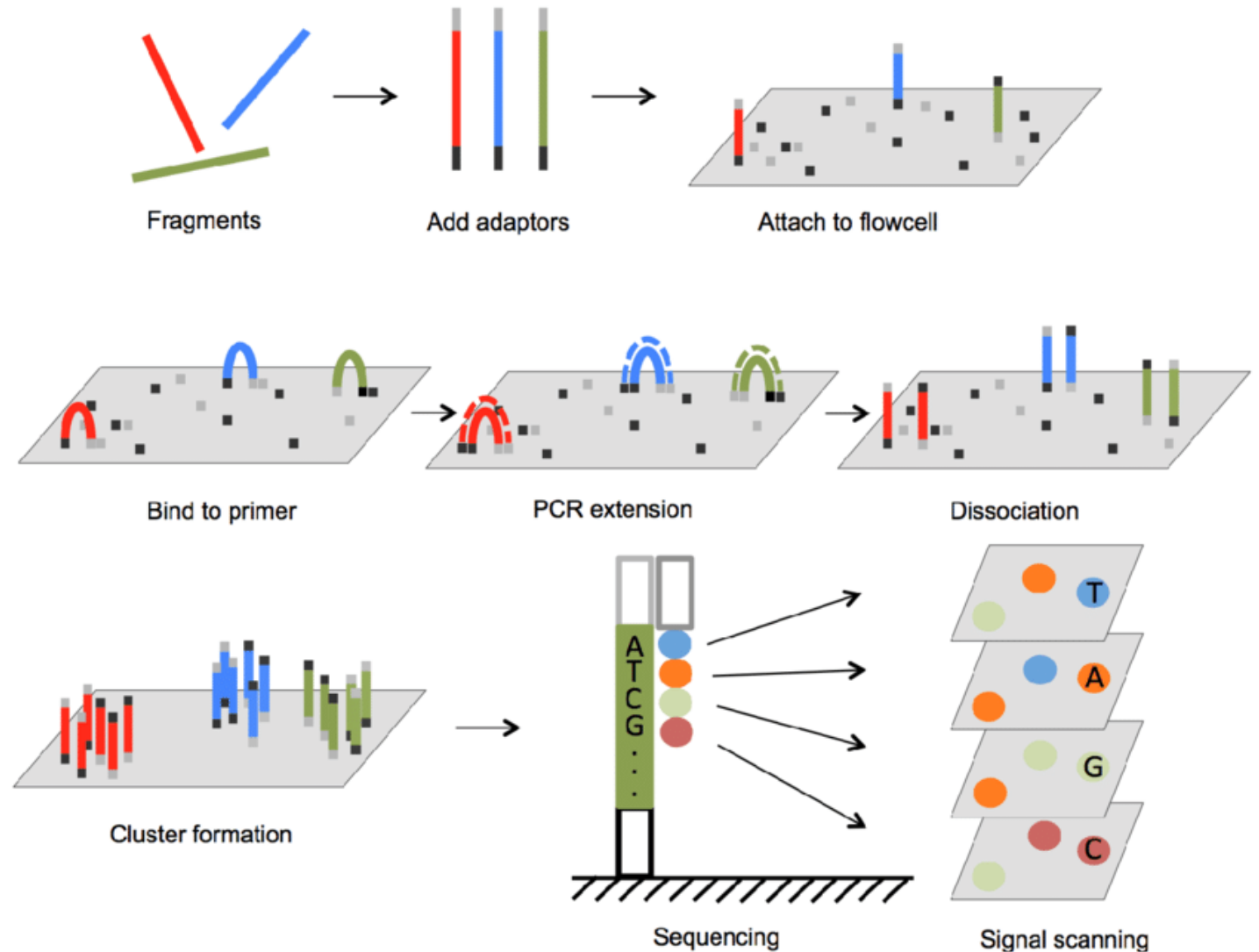


Séquençage par synthèse (Illumina)

Librairie pour fragmenter et amplifier les brins d'ADN ($\approx 1,5$ jours)



Plusieurs projets par cassette



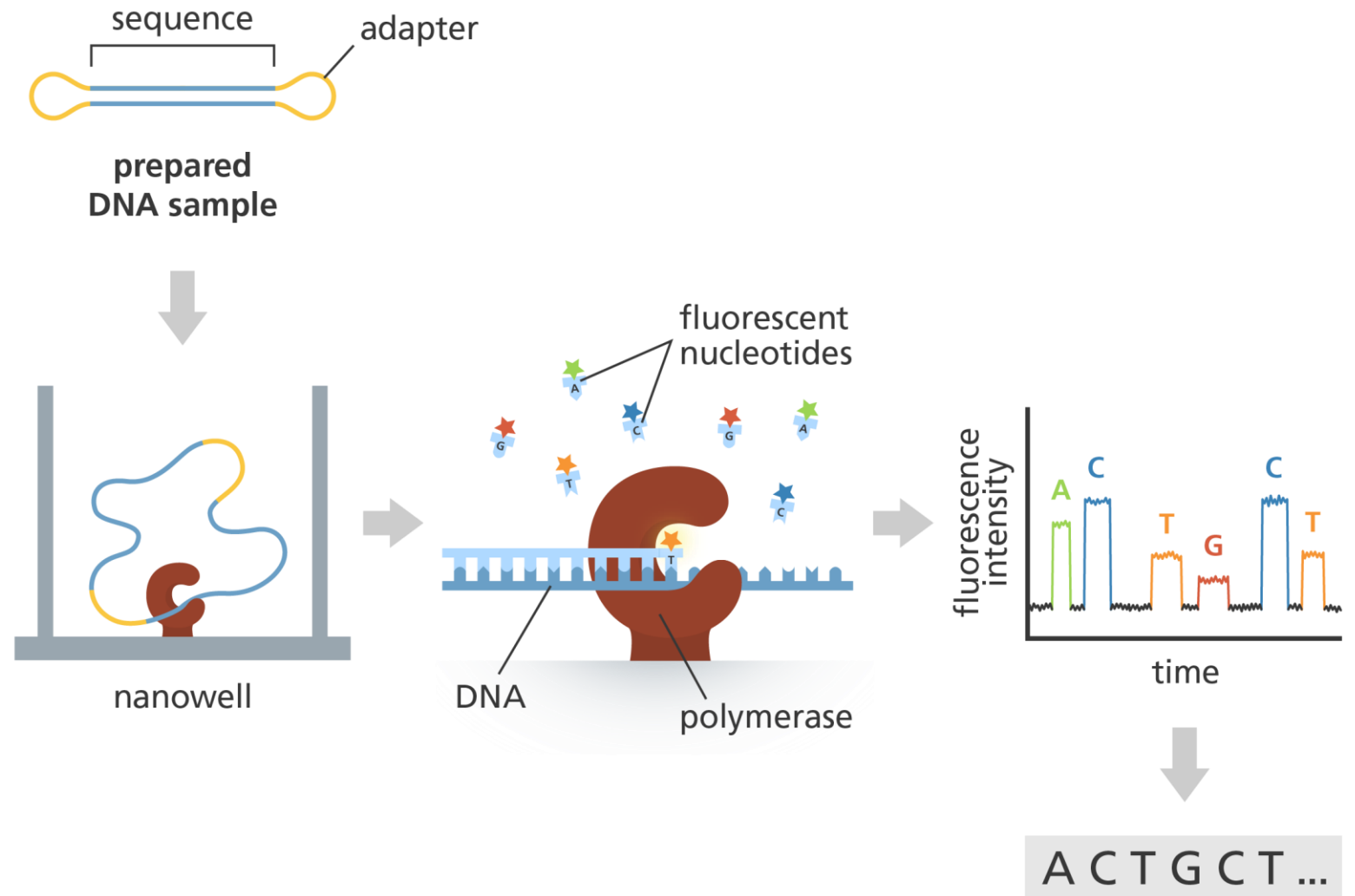
Séquençage molécule unique en temps réel (Oxford, Pacbio)

Préparation de l'échantillon rapide
($\approx 1h$)

Projet par projet

Plusieurs projets possibles sur la même flowcell

MAIS risque de contamination

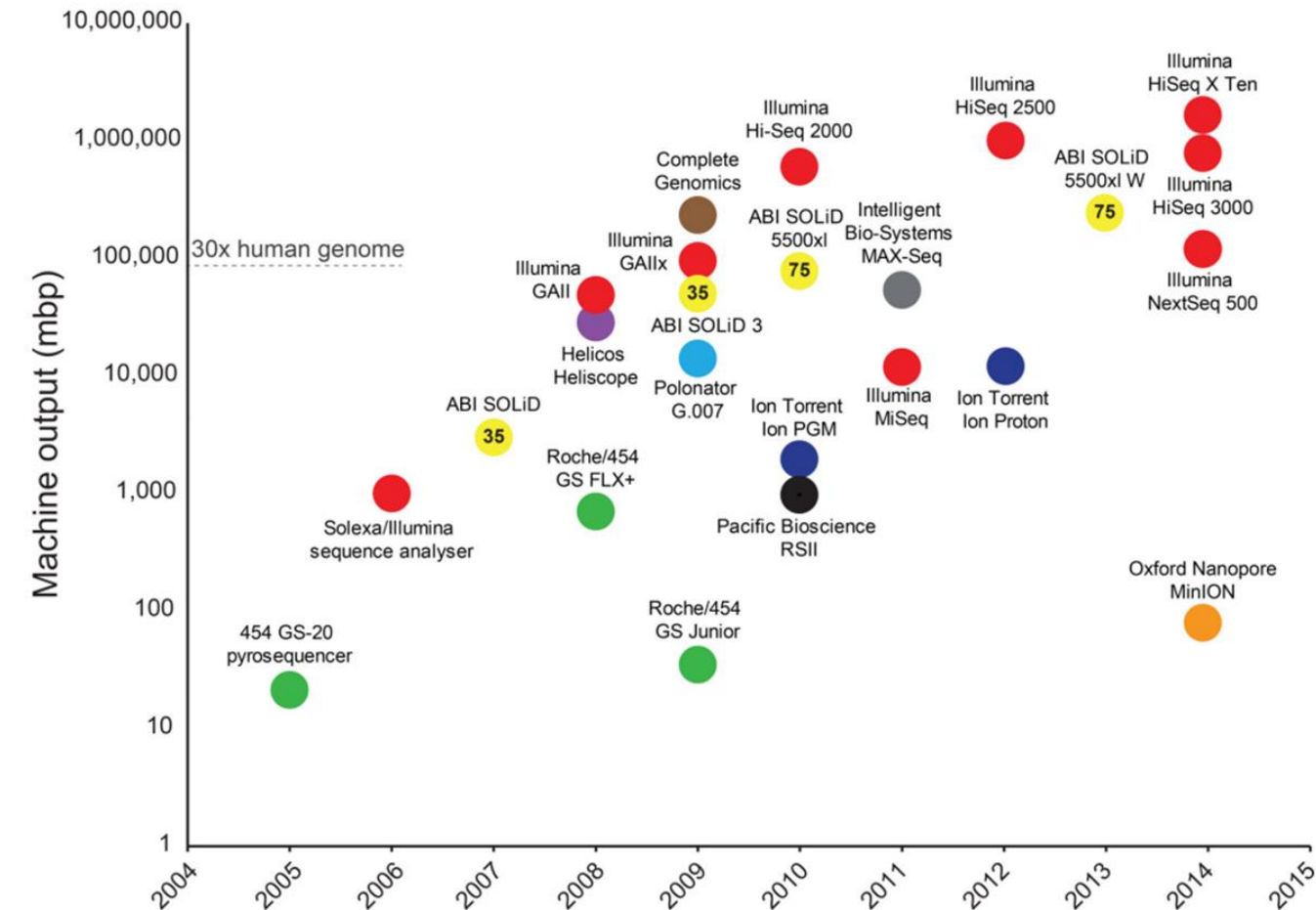


Technologies actuelles de séquençage

Next generation sequencing			
	Méthode Sanger	Séquençage par synthèse (Illumina)	Séquençage molécule unique en temps réel (Oxford, Pacbio)
Avantages	Standardisation Qualité de séquençage	Simple, évolutif, haut rendement Possibilité de standardisation	Rapide, Equipement peu coûteux (starter pack 1,000\$)
Inconvénients	Cout au nucléotide Nombre de gènes limité	Equipement coûteux	Faible rendement des séquences de haute qualité
Délai	2-3 jours	4-5 jours	1-2 jours
Analyse des données	Rapide	+/- long	Inclus en « real-time » pour une partie des données +/- long

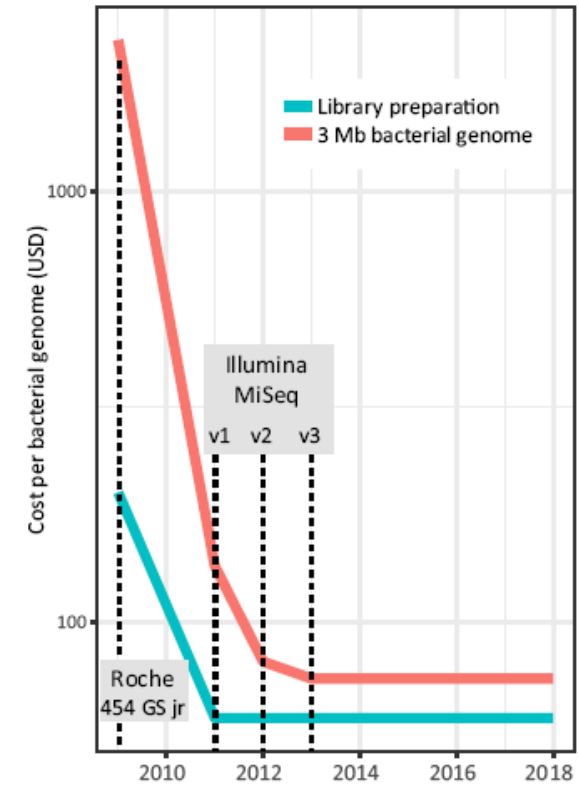
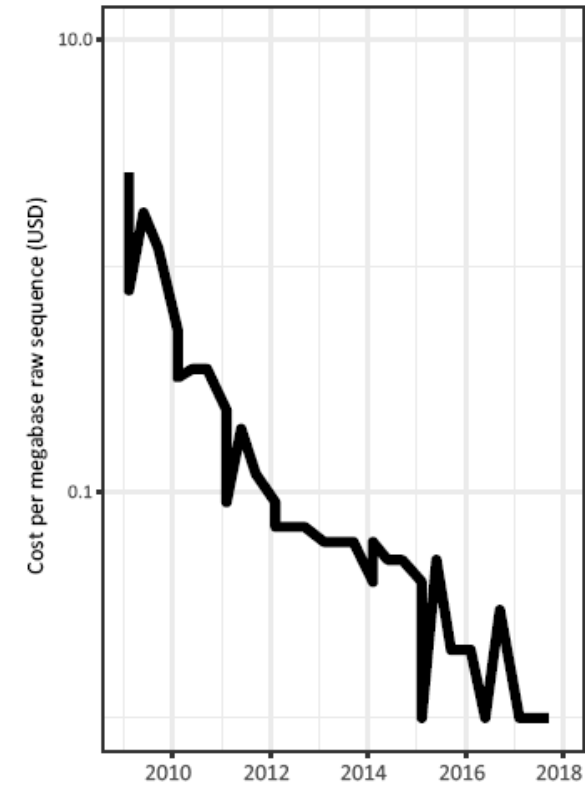
Séquençage Génome Entier : Performance et Coût

Next Generation Sequencing



Reuter et al. Mol Cell. 2015

Decrease of cost

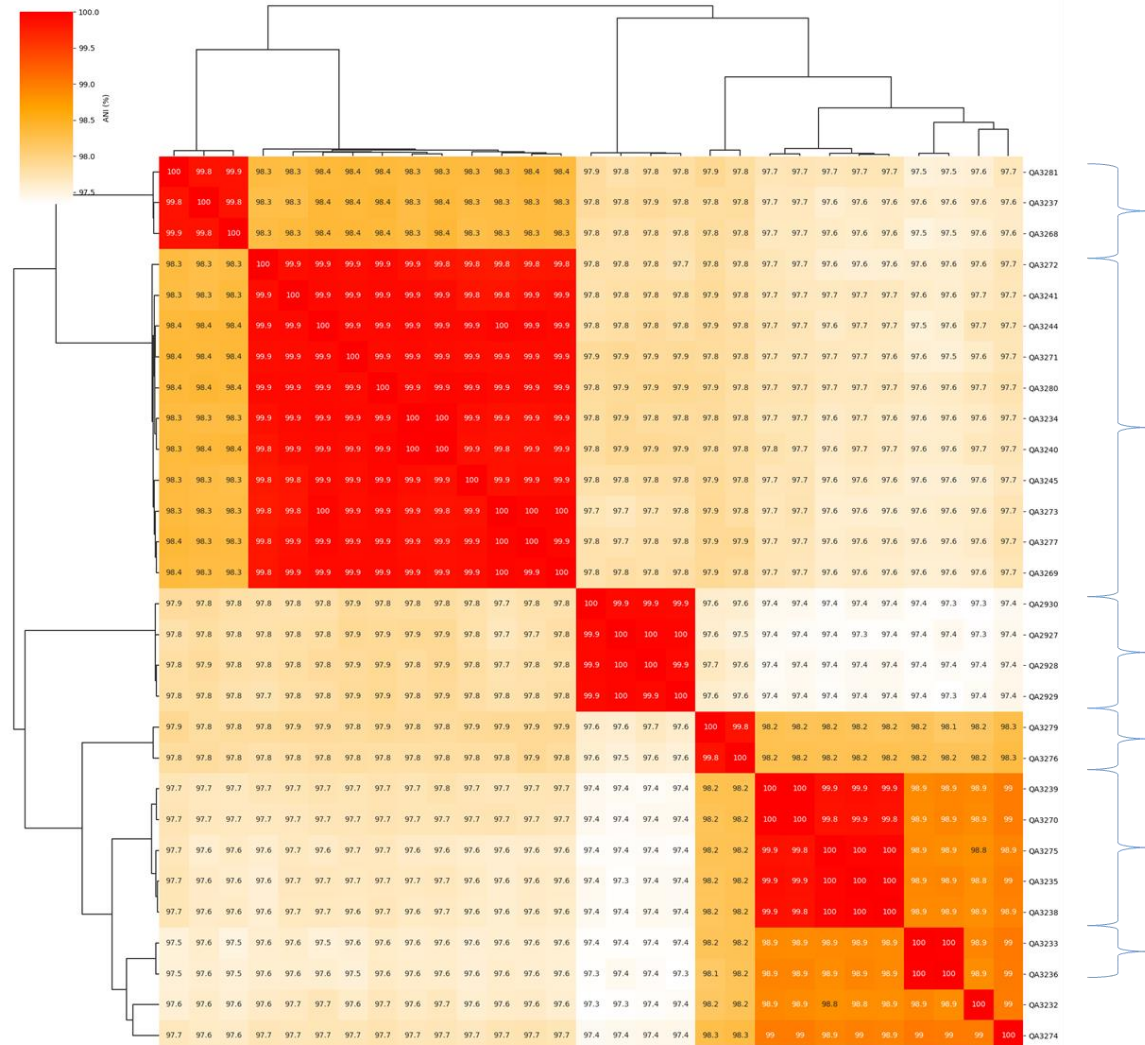


Balloux et al. Trends Microbiol 2018

Cas pratique n°1

- Suspicion de transmission croisée dans une réanimation néonatale
- 57 patients porteurs ou infectée à *S. aureus*
 - 15 souches de patients séquencées
- Enquête épidémiologique :
- 33 personnels dépistés positifs
 - 15 souches séquencées

Cas pratique n°1



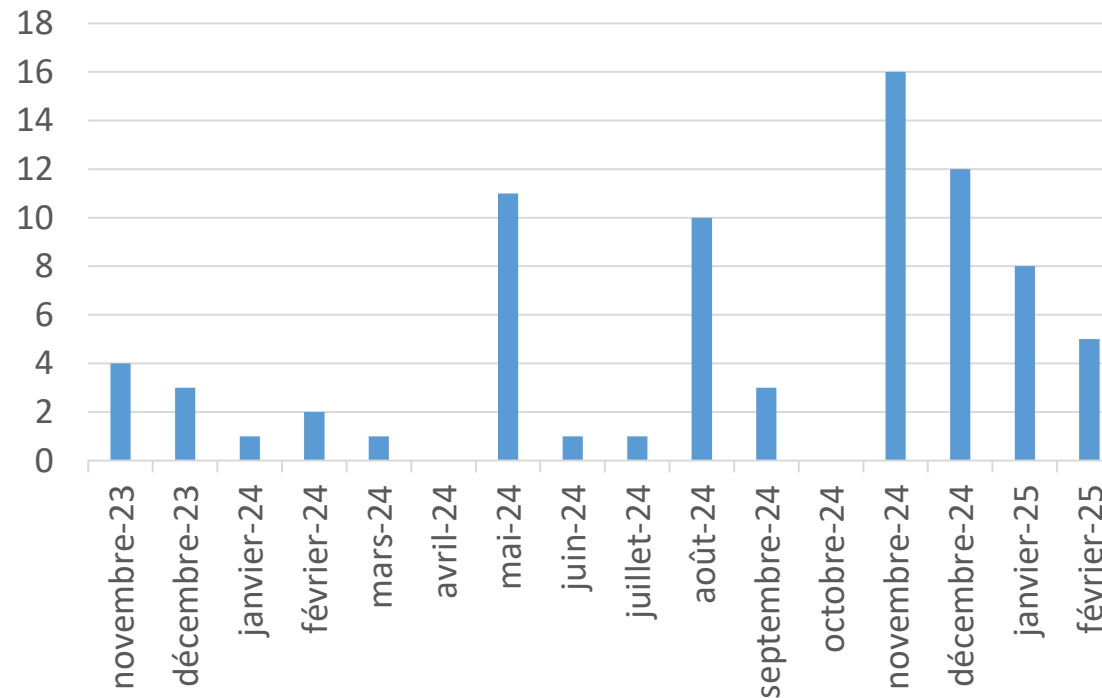
Groupe de souches après analyses du wgMLST

Groupe	Nombre de patients	Moyenne Nb SNPs
ST 5	7	0-18 SNPs
ST97	2	8-14 SNPs
ST5	2	13 - 18 SNPs
ST45	1	65-80 SNPs

- Diffusion polyclonale de souches de *S. aureus*
- Circulation de clones associés au milieu hospitalier
- Pas de cluster clairement identifié

Cas pratique n°2

- Identification de cas d'ERG au sein de 3 services de médecine conventionnelle d'un même établissement.
- Ces 3 services sont contigus et situés sur un même étage avec un personnel paramédical pouvant ponctuellement intervenir d'une unité à l'autre.



Répartition des cas au sein des 3 unités en fonction du temps

Détail de l'épidémie par Unité : souches

Résultats de l'analyse des souches après séquençage génome entier

Souche	U1	U2	U3	Total
VanA (ST1469)	- 3 patients -Acquisition nosocomiale : 3/3 patients	- 8 patients - 1 Porteur connu : Patient 13 - Acquisition nosocomiale : 7/8 patients	—	11
VanA (ST483)	—	—	- 1 patient - 1 Porteur connu : Patient 21	1
VanB (ST152)	-4 patients - 1 Porteur connu : Patient 2 -Acquisition nosocomiale : 3/4 patients	- 1 patient - 1 Porteur connu : Patient 14	- 6 patients - Acquisition nosocomiale : 6/6 patients	11
Total	7	9	7	23

Epidémie associée aux soins suspectée : décision d'une investigation

Enquête environnementale

Méthodes :

- Décembre 2024 : 84 prélèvements répartis dans les 3 unités
- Laboratoire Hygiène : culture + antibiogramme + PCR
- Souches séquencées pour comparaison génomique

Résultats :

- U1 : écouvillon d'une bassine (chambre 83) était positif à **ERG VanB ST152**.
- U2 : écouvillon d'un ordinateur du bureau infirmier était positif à **ERG VanA ST1469**.
- U3 : écouvillon d'une bassine (chambre 11) était positif à **ERG VanB ST152**,
écouvillon d'un brassard de tension partagé entre les patients (positionné dans le couloir) était positif à **ERG VanA ST1469**.

Unité	Chambre simple	Chambre double
U1	11	8
U2	2	12
U3	18	3

Description des unités

Chaque chambre est équipée de sanitaires comprenant un lavabo, un WC, une douche, ainsi qu'une bassine destinée à la toilette des patients alités

Résumé chronologique



Figure 8. Répartition chronologique des chambres ayant accueilli des patients porteurs de souches cliniques d'ERG présentant ≤ 20 SNP de différence avec la souche environnementale (tensiomètre, bureau infirmier).

Les patients peuvent occuper plusieurs chambres différentes durant leur séjour.

Résumé chronologique

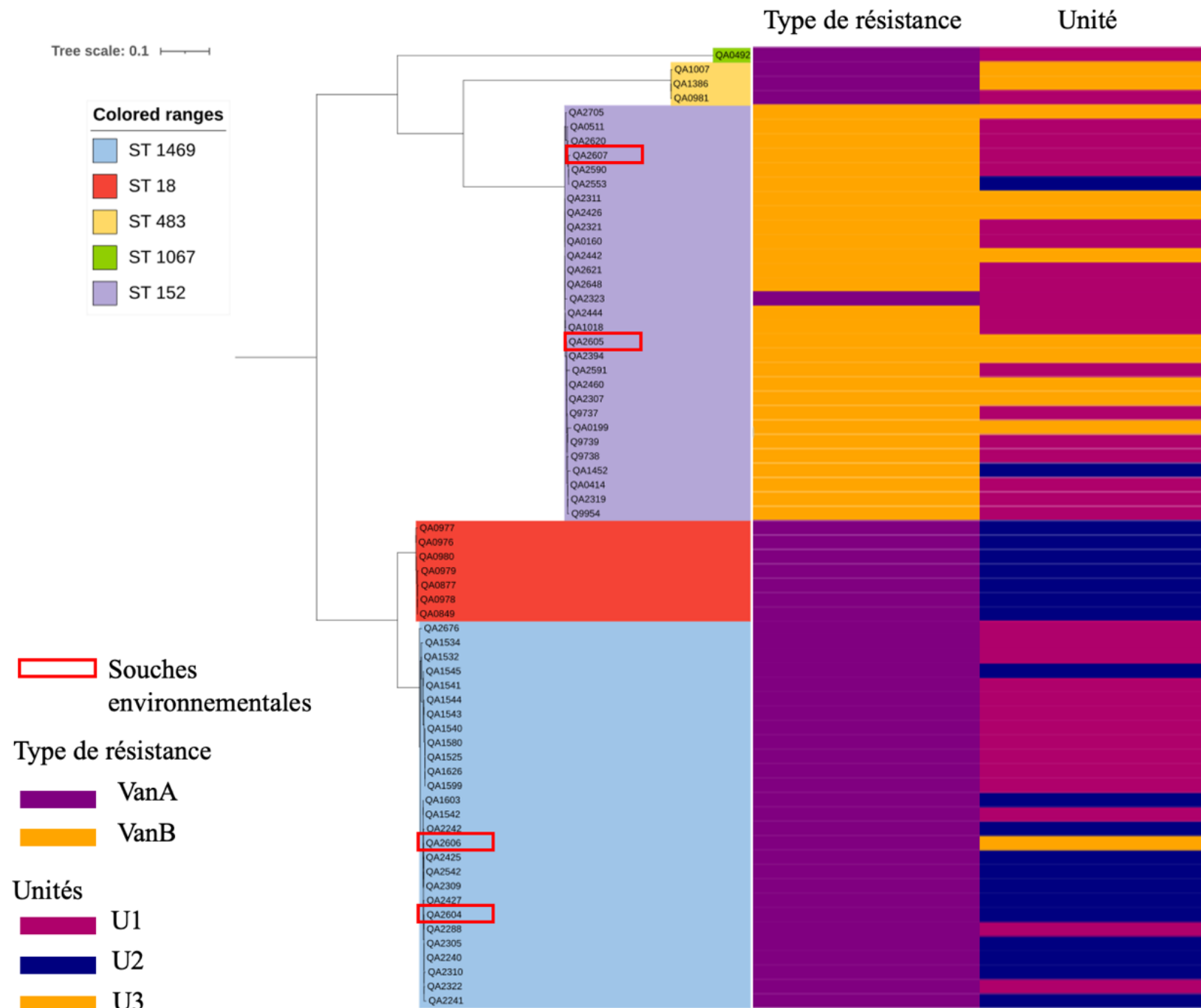


Figure 9. Répartition chronologique des chambres ayant accueilli des patients porteurs de souches cliniques d'ERG présentant ≤ 20 SNP de différence avec la souche environnementale (bassines chambres 11 U3 et 83 U1).

Les patients peuvent occuper plusieurs chambres différentes durant leur séjour.

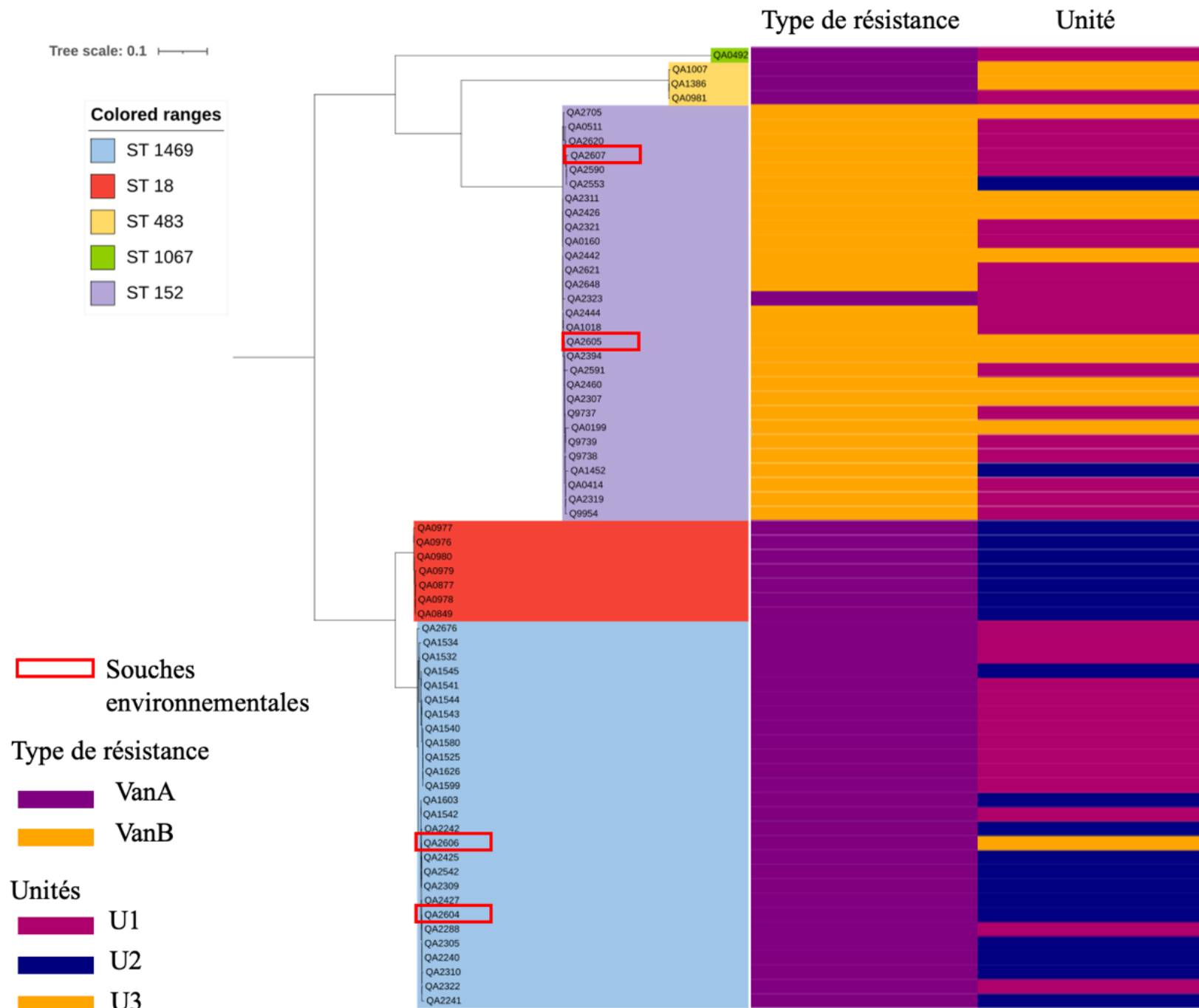
Cas n°2

- 27 isolats VanA ST1469 :
 - Diversité génétique moyenne = 18 SNPs de différence (intervalle : 0-309).
- Souche environnementale **QA2606** (tensiomètre de l'U3) ≤ 20 SNPs avec 25 isolats cliniques et avec l'isolat environnemental **QA2604** (bureau infirmier de l'U2).



Cas n°2

- 29 souches **VanB ST152** :
- diversité génomique moyenne = 4 SNPs (intervalle : 0 -11).
- Souche environnementale **QA2605**, (bassine chambre U3) ≤ 20 SNPs avec 27 isolats cliniques et avec l'isolat environnemental **QA2607** (bassine chambre U1)



Conclusion Exemple

Diffusion intra- et inter-unités des ERGs

Réservoir environnemental à l'origine de la persistance des ERGs dans les trois services

- Brassard à tension
- Bureau infirmier

→ **Désinfection insuffisante du matériel**

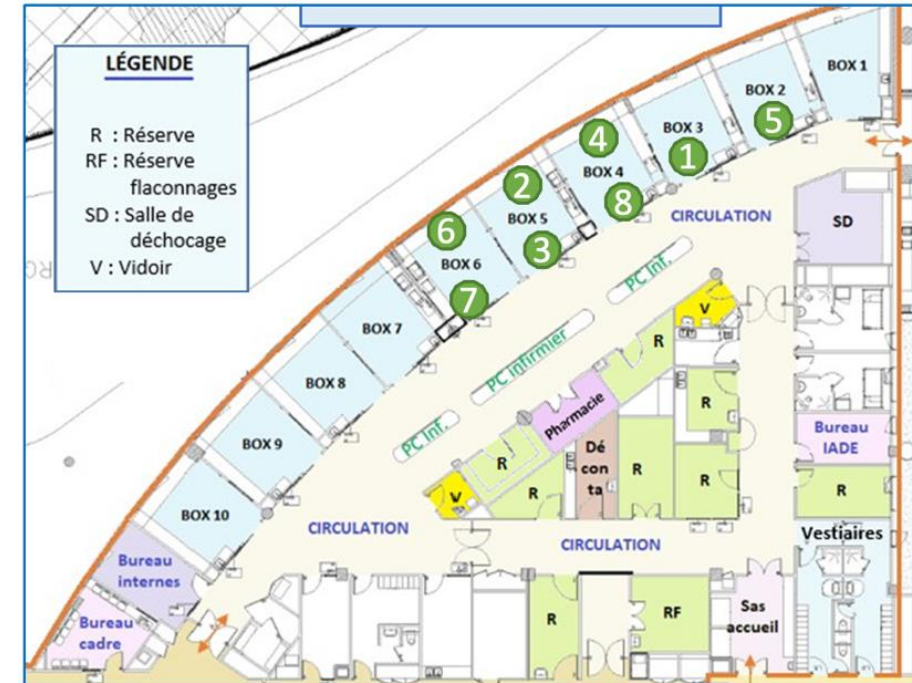
Transmission manuportée par le personnel (non prélevé dans cette enquête)

→ **Hygiène des mains insuffisante**

Rôle de l'enquête : Educatif ++

Cas pratique n°3

- 10 patients positifs à un *P. aeruginosa* producteurs de carbapénémases de type VIM sur une période d'un an
- Parmi eux, 8 hospitalisés dans une même réanimation
- Caractéristiques communes des patients : une admission directe dans l'unité, des séjours prolongés et une atteinte respiratoire majoritaire, sous forme de portage ou d'infection à PVIM.
- L'ensemble des cas positifs à PVIM ont séjourné dans des chambres contiguës, situées entre le box 2 et le box 6.

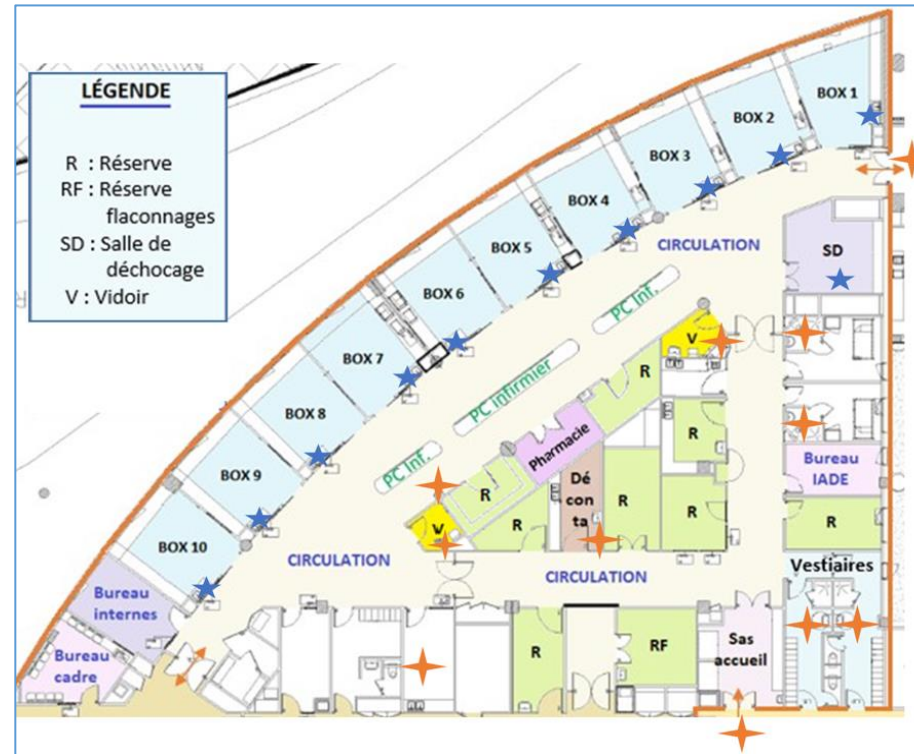


Alerte donnée par le laboratoire, lors d'une analyse rétrospective des cas de *P. aeruginosa* VIM + sur un an.

Enquête environnementale

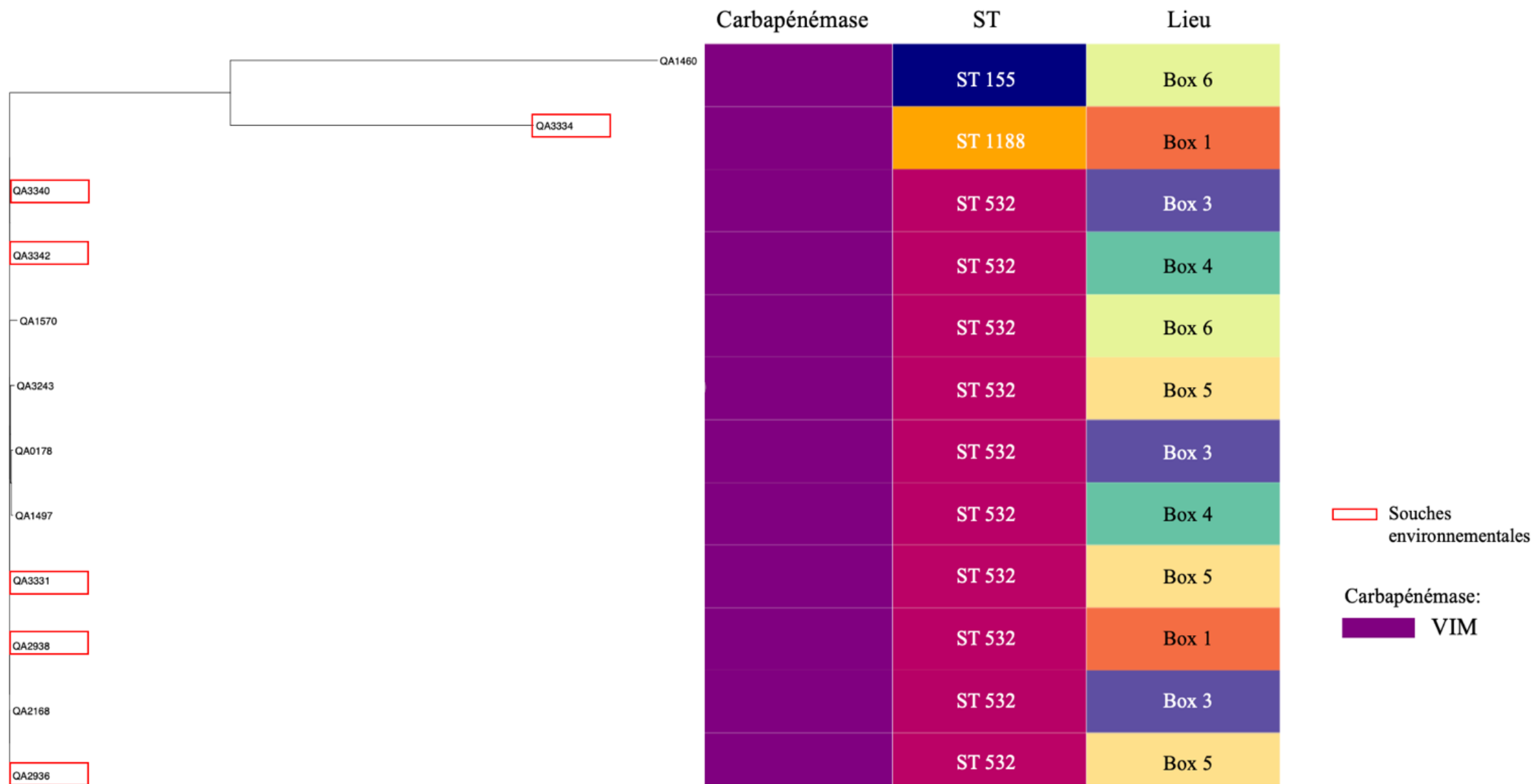
★	Box 1	Siphon
★	Box 2	Siphon
★	Box 3	Siphon
★	Box 4	Siphon
★	Box 5	Siphon
★	Box 6	Siphon
★	Box 7	Siphon
★	Box 8	Siphon
★	Box 9	Siphon
★	Box 10	Siphon
★	Déchocage	Siphon
✦	Vidoirs	Siphon vidoir face entrée Siphon vidoir face déchocage
✦	PC infirmier	Siphon
✦	Salle de décontamination	Siphon droit Siphon gauche
✦	Chambre de garde internes	Siphon
✦	Chambre de garde Séniors	Siphon
✦	Vestiaire Homme	Siphon
✦	Vestiaire Femme	Siphon
✦	Détente	Siphon Robinet (au mur)
✦	SAS d'entrée (côté box 1)	Siphon
✦	SAS (côté vestiaire)	Siphon

3 mois plus tard : prélèvements de divers points d'eau dans le service



Résultats culture et souches

- 6/8 souches cliniques retrouvées et analysées :
 - 6/6 porteurs du gène ***bla*_{VIM-2}**
 - ST : 5/6 **ST532**, un **ST155**.
- Enquête environnementale :
 - 4 prélèvements (boîtes 1, 3, 4 et 5) positifs à ***Pseudomonas aeruginosa* VIM-2 ST532**.
 - 5 prélèvements positifs à entérobactéries productrices de carbapénémases
 - *Enterobacter hormaechei* NDM-4
 - *Klebsiella pneumoniae* KPC-3
 - *Citrobacter farmeri* VIM-1/VIM-4
 - *Citrobacter portucalensis* VIM-1/VIM-4



Résultats analyse comparative

- Les souches de PVIM-2 présentent une diversité génomique marquée, avec une moyenne de 14426 SNPs (155 - 52406).
- Aucun lien génomique étroit entre les souches (défini comme <37 SNP).
- Proximité génétique plus importante entre les souches environnementales
 - box 1 et 3 (151 SNP)
 - box 1 et 4 (203 SNP)
 - box 1 et 5 (167 SNP)
 - box 3 et 4 (155 SNP)
 - box 3 et 5 (164 SNP)
 - box 4 et 5 (171 SNP).
- Entre souches cliniques et environnementales
 - 281 SNP entre la souche (siphon box 3) et celle d'un patient (box 3)
 - 308 SNP entre la souche (siphon box 3) et celle d'un patient (box 4)
 - 290 SNP entre la souche (siphon box 1) et celle d'un patient du box 3

Conclusion cas pratique n°3

- **Variabilité génétiques** importante entre les souches :
 - Pas de clone épidémique unique identifié
- Siphon:
 - Probable **réservoir initial** d'un clone ancestral
 - Lieu favorable aux échanges génétiques
 - Réservoir majeur de bactéries environnementales
- Difficulté d'interprétation des analyses de comparaison génomique
 - Enquête réalisée à distance des infections
 - Méthode bio-informatique à optimiser

Cas pratique n°4

Contexte : 3 décès chez des nouveau-nés hospitalisés en soin intensif ayant présentés des chocs septiques fulminants à *Klebsiella pneumoniae* sur une période de 3 mois.

	QA1547	QA1548	QA2345
Identification (Hybridation ADN-ADN par TYGS) Score DDH Référence	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> 92.8 % GCA_000613225	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 92.9% GCA_000742135	<i>K. pneumoniae</i> 93% ATCC13883
MLST	Nouveau (*19bb)	5079	792
Analyse des SNPs (SNP-dists) - nombre de gènes (core-genome)	Non applicable	Non applicable	Non applicable
Locus O	O3/O3a	O1ab	O3/O3a
Locus K	K1	KL64 (K64)	KL25 (K25)
Gènes de virulence	Aucun	Aucun	<i>Yersiniabactine</i> <i>Colibactine</i> <i>rmpA2</i>
Score de virulence	0	0	2
Gènes de résistance	OKP-B-36	SHV-1	SHV-1
Phénotype de résistance	Phénotype sauvage	Phénotype sauvage	Phénotype sauvage

Conclusion (1/3)

Outil indispensable pour identifier des voies de transmission et caractériser les épidémies

MAIS à confronter **systematiquement** à l'investigation épidémiologique

- Intérêt :
 - Confirmer des réservoirs / voies de transmission des épidémies hospitalières
 - Sensibiliser/Convaincre le personnel ++
- Méthode :
 - Méthode de NGS (\simeq 7 jours)
 - Typage MLST pour 1^{ère} réponse rapide
 - Comparaison des souches deux à deux : plus discriminant mais plus long (\simeq +3 jours)
 - Qualité suffisante +++

Conclusion (2/3)

- **Absence de recommandation si différence >0 SNPs.**
- **Cas des EPC** : épidémies de plasmides +++
 - Souvent très conservés (réelle épidémie?)
 - Nécessite l'utilisation de plusieurs techniques associant qualité de séquençage et longueur de séquence pour reconstruire le plasmide complet
- Démocratisation du NGS :
 - Possibilité dans un futur proche de faire de **l'analyse « sans a priori » (sequence first)**
 - Détection de cluster sans enquête préalable, par du séquençage systématique des souches
 - Ex Epidémie dans un service de radiologie, dû à une mauvaise préparation des produits de contraste

Conclusion (3/3)

- Outils bio-informatiques/interprétation à adapter en fonction des espèces bactériennes (variation génétique +/- importante)
- Application développée essentiellement pour les **bactéries**
 - Virus ?
 - Champignons filamenteux : difficultés de performance et d'interprétation (grande diversité de la contamination environnementale).
- Intérêt de mettre au point des **méthodes discriminantes rapides** pour éliminer des cas groupés avant de réaliser le séquençage des souches

IR Biotyper

Méthode basée sur la **technologie IR**

Etudie le profil des sucres, lipides et protéines des bactéries

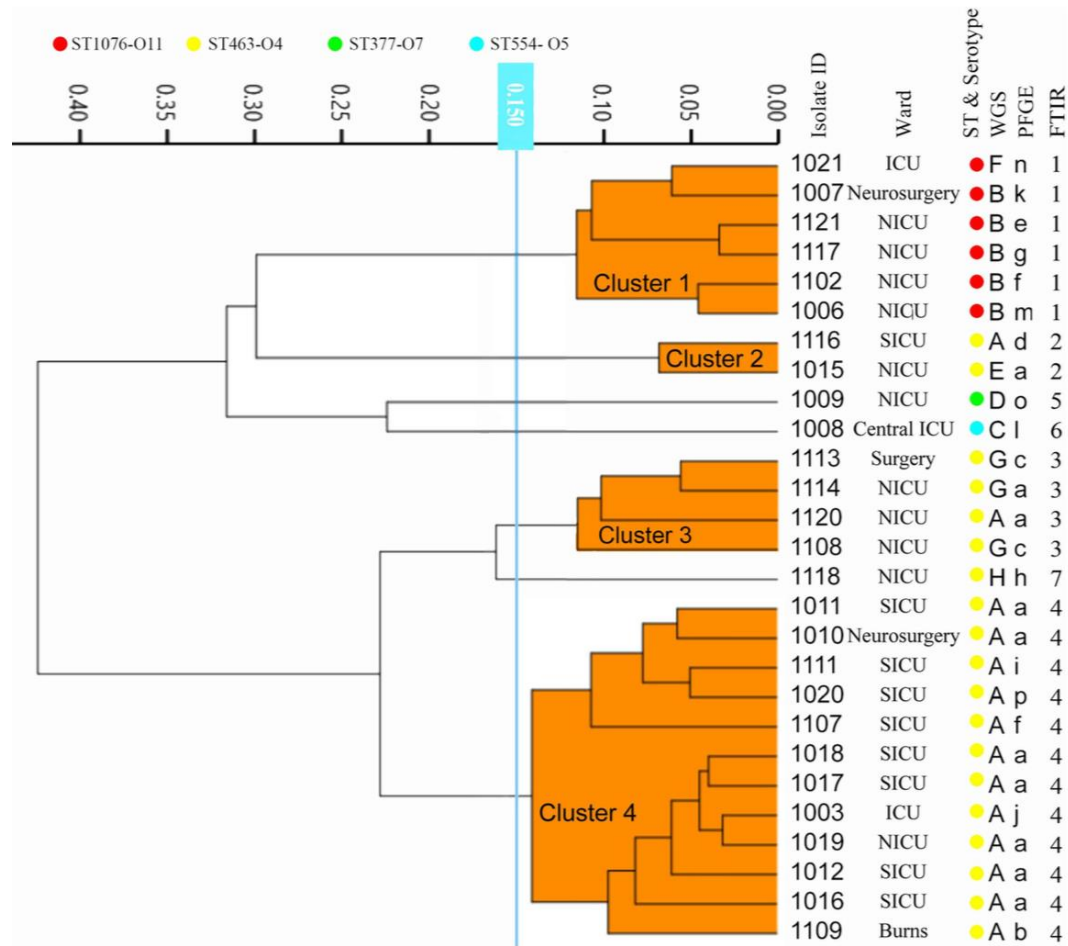
Méthode typage de souche couplé au MALDI-TOF

Permet l'analyse de scénarios épidémiques « en temps réel »

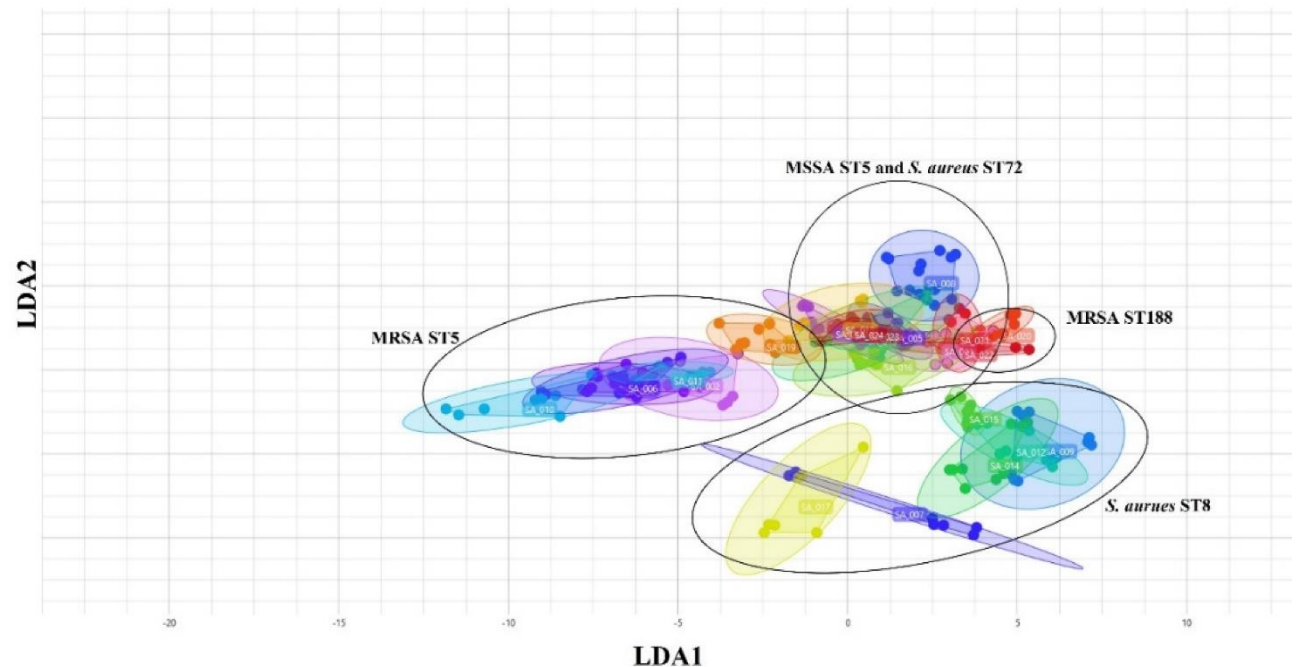
Application :

sérotypage pour *Streptococcus*, *Legionelle*, *Salmonella* et *Listeria*

Comparaison de profils pour les autres espèces



Distance was obtained automatically by FT-IR. The lineages of IRBT, WGS-based typing, PFGE, STs, and serotypes are given for each isolate.



Remerciements

- **Equipe OHH :**
 - Paul-Rémi Petit,
 - Gwendoline Ragonnet
 - Rémi Charrel
- **Laboratoire Hygiène environnementale :**
 - Frédérique Gouriet
- **Externe en pharmacie:**
 - Marie-Alizée Borragini,
 - Nolwenn Marie
 - Manon Piat

**MERCI POUR
VOTRE
ATTENTION**