



CARACTÉRISATION PHÉNOTYPIQUE ET MOLÉCULAIRE

Annexe 7



MÉTHODES PHÉNOTYPIQUES	3
Sérotypage par test d'agglutination rapide sur lame	3
Maldi-Tof	4
MÉTHODES MOLÉCULAIRES	5
Recherche de marqueur(s) moléculaires	7
Multi Locus Sequence Typing (MLST)	7
PFGE	7
CRISPR	8
MLVA	8
Séquençage total du génome (WGS)	8
RÉFÉRENCES	10

AVANT-PROPOS

La caractérisation des salmonelles isolées tout au long de la chaîne alimentaire s'inscrit dans la démarche globale de collecte de données descriptives et analytiques pour comprendre et anticiper la diffusion de ce pathogène tout au long de la chaîne alimentaire. Une phase de production et de collecte de données (monitoring) doit être réalisée selon des protocoles harmonisés, applicables dans les différents secteurs pour permettre une comparaison et une analyse intégrée.

Cette étape de caractérisation a pour objectif de montrer que des isolats reliés épidémiologiquement ont des caractères communs qui les différencient des isolats non reliés. Les examens bactériologiques classiques mis en œuvre en première intention se limitent généralement à l'identification phénotypique de l'espèce. La mise en évidence de marqueurs moléculaires, dont la présence dans le génome est stable mais dont les caractéristiques sont variables entre souches de même espèce, permet une différenciation fine de ces isolats.

Le système idéal de caractérisation (pouvant inclure la mise en œuvre de plusieurs méthodes d'analyse) doit être validé, standardisé, discriminant, reproductible et stable dans le temps et largement applicable (simple, peu coûteux).

Il existe deux grands types de méthodes de caractérisation. Les méthodes phénotypiques étudient les propriétés exprimées par les bactéries : formule antigénique, résistance aux antibiotiques, biotypie, lysotypie, profils protéiques, etc. Les méthodes moléculaires ciblent partiellement ou totalement le génome bactérien : plasmides, intégrons, îlots génomiques, chromosome, motifs nucléotidiques répétés, courtes séquences spécifiques, etc.

Ces méthodes apportent des informations complémentaires sur les souches isolées. Une multitude de marqueurs génétiques conférant un caractère particulier (virulence, résistance, réponse à un stress) ont été décrits. Leur transmission entre souches de *Salmonella* de même sérotype ou espèce, voire entre genre bactérien, est possible par transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (phages, plasmides, etc.), facilitant potentiellement la survie de la bactérie réceptrice dans différents hôtes et niches environnementales.

MÉTHODES PHÉNOTYPIQUES



LE GENRE *SALMONELLA* COMPREND DEUX ESPÈCES : BONGORI ET ENTERICA (COMPRENANT 7 SOUS-ESPÈCES). PLUS DE 2600 SÉROVARS SONT RECENSÉS, DONT LA TRÈS GRANDE MAJORITÉ APPARTIENNENT À LA SOUS-ESPÈCE *SALMONELLA ENTERICA* SUBSP. *ENTERICA*. LES SOUS-ESPÈCES SE DISTINGUENT PAR LEURS CARACTÈRES BIOCHIMIQUES (Figure 1).

SÉROTYPAGE PAR TEST D'AGGLUTINATION RAPIDE SUR LAME

Cette méthode de caractérisation phénotypique est la méthode de référence mise en œuvre par les laboratoires en première intention depuis plusieurs décennies pour définir

le sérovar d'une salmonelle à partir d'une culture pure.

Le fascicule de documentation FD CEN ISO/TR 6579-3 (Afnor, octobre 2014) présente les recommandations relatives au mode opératoire de sérotypage des salmonelles.

Ces lignes directrices sont conformes au schéma décrit par White - Kauffmann - Le Minor¹ pour la détermination de la formule antigénique de chaque salmonelle.

Espèce	S. enterica					S. bongori	
	enterica	salamae	arizonae	diarizonae	houtenae	indica	
Caractères							
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+
ONPG (2 h)	-	-	+	+	-	d	+
Malonate	-	+	+	+	-	-	-
Gélatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Culture sur KCN	-	-	-	-	+	-	+
L(+)-tartrate(a)	+	-	-	-	-	-	-
Galacturonate	-	+	-	+	+	+	+
γ-glutamyltransférase	+	+	-	+	+	+	+
β-glucuronidase	d	d	-	+	-	d	-
Mucate	+	+	+	-(70%)	-	+	+
Salicine	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lyse par le phage O1	+	+	-	+	-	+	d
Habitat de la majorité des souches	Animaux à sang chaud		Animaux à sang froid et environnement				
(a) = d-tartrate (*) = Typhimurium d, Dublin - + = 90% ou plus de résultats positifs - = 90% ou plus de résultats négatifs d = résultats différents suivant les sérovars de la sous-espèces considérée							
L. Le Minor, M. Véron, M. Popoff. <i>Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)</i> , 1982, 133 B, 223-243 and 245-254. L. Le Minor, M. Popoff, B. Laurent, D. Hermant. <i>Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)</i> , 1986, 137 B, 211-217.							

Figure 1 : Caractères différentiels des espèces et sous-espèces du genre *Salmonella*

[Source : CCOMS, Institut Pasteur, P.A.D. Grimont, F.X. Weill, Formules antigéniques des sérovars de salmonella, 2007, 9^{ème} éd.].

¹ CCOMS, Institut Pasteur, P.A.D. Grimont, F.X. Weill, Formules antigéniques des sérovars de salmonella, 2007, 9^{ème} éd.

Cette méthode repose sur la mise en évidence d'antigènes spécifiques d'un isolat confirmé comme appartenant au genre *Salmonella*. Il existe trois types d'antigènes :

- Somatiques (« O ») codés par les gènes *rfb*, qui constituent la paroi cellulaire.
- Flagellaires (« H ») codés par les gènes *fliC* (phase 1) et *fliB* (phase 2), qui composent les flagelles responsables de la mobilité bactérienne.
- Capsulaires (« Vi », présence facultative).

Les salmonelles sont diphasiques et possèdent un bagage génétique permettant en théorie l'expression de deux phases flagellaires. A chaque instant, une seule phase flagellaire est exprimée par chaque salmonelle. Une population clonale (ensemble de bactéries issues de la multiplication d'un unique individu) peut cependant exprimer les deux phases flagellaires simultanément, si cette population n'est pas synchronisée. La mise en œuvre de cette méthode implique l'utilisation d'un grand nombre de sérums anti-immuns, monovalents ou polyvalents et conservés à +2-+8°C. La détermination de la formule antigénique nécessite, 2 à 5 jours selon le sérovar et une grande expérience technique pour l'interprétation visuelle des tests agglutinations.

MALDI-TOF²

Le principe de la spectrométrie de masse repose sur la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). L'ionisation s'effectue par laser en présence d'une matrice (MALDI) et la détection des molécules ionisées est opérée sous vide après accélération et séparation dans un tube de vol (TOF). Un spectre spécifique est ainsi généré, qui correspond au profil protéique de la bactérie préalablement isolée. Le spectre généré est interprété par comparaison avec des spectres de référence contenus dans une base de données.

Bien que la spectrométrie de masse nécessite l'investissement et la maintenance d'un appareillage onéreux, l'intérêt de cette méthode réside dans le fait que l'analyse soit peu coûteuse en consommables et en temps. Le déploiement de cette technologie dans les laboratoires de bactériologie médical au début des années 2010 a permis de réduire le délai d'identification des micro-organismes de 24 heures, à un coût huit fois moindre³. Un processus de normalisation de l'identification-confirmation du genre *Salmonella*

(espèce et sous-espèce) par méthode Maldi-Tof a été initié dans le domaine de la santé animale.

Des solutions commerciales validées, basées sur cette technologie, sont disponibles pour identifier le genre, l'espèce et sous-espèce des bactéries isolées, dans une première approche taxonomique et épidémiologique (Bardoň and Štromerová, 2015; Murray, 2010). Plusieurs travaux de recherche ouvrent des perspectives sur l'utilisation du Maldi-Tof pour l'identification du sérovar (Dieckmann and Malorny, 2011) ou encore des caractères de résistance aux antibiotiques, par extension de l'analyse des spectres de masse (absence ou présence de pics caractéristiques). Ces approches doivent être consolidées et validées avant d'être appliquées en routine. Cette méthode constituera alors une méthode de choix pour évaluer l'éventuelle présence de populations bactériennes minoritaires (exemple : différents sérovats présents dans le même prélèvement).

² pour Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight

³ <https://pro.anses.fr/euroreference/Documents/ER05-Meth-MaldiTof.pdf>

MÉTHODES MOLÉCULAIRES



LES MÉTHODES PRÉSENTÉES CI-DESSOUS NÉCESSITENT L'ISOLEMENT PRÉALABLE DE LA SOUCHE BACTÉRIENNE. IL N'EST PAS EXCLU QUE, DANS UN FUTUR PROCHE, CERTAINES MÉTHODES ANALYTIQUES COMBIDENT LA DÉTECTION, L'IDENTIFICATION ET LE TYPAGE MOLÉCULAIRE DE LA BACTÉRIE SANS OBLIGATION DE CULTURE ET D'ISOLEMENT DE CELLE-CI (MÉTAGÉNOMIQUE).

L'évaluation des performances d'une méthode de caractérisation moléculaire repose sur différents critères :

- **pouvoir discriminant** : capacité à distinguer des souches non reliées d'un point de vue épidémiologique.
- **reproductibilité et répétabilité** : obtention de résultats identiques dans le temps pour une même souche, obtenus respectivement entre laboratoires ou au sein d'un même laboratoire.
- **application harmonisée** : niveau d'harmonisation de la méthode (protocole standardisé, sous assurance qualité, nomenclature partagée, normalisation des résultats, stockage des données) à un niveau international pour permettre la comparaison de résultats.

Un consensus scientifique international s'est exprimé à Bruxelles en 2011 entre représentants de l'OIE, OMS, CE, USFDA, US-CDC, ECDC pour souligner l'importance de mettre en place une base de données génomiques mondiale partagée, pour faciliter notamment l'approche dite « One Health » (pour « une santé ») transversale aux domaines de la santé animale, la santé humaine et la sécurité des aliments (Kupferschmidt, 2011).

Les bactéries sont des organismes vivants qui évoluent en permanence. Leur génome est soumis à des mutations, acquisitions et/ou pertes d'éléments génétiques. Cette évolution, associée à des facteurs biologiques et épidémiologiques, peut favoriser la dissémination voire l'émergence de souches épidémiques. La fréquence de recombinaison génétique entre salmonelles est très variable selon les sérovars. L'investigation d'alertes sanitaires, les études d'attribution de source de contamination ou encore l'évaluation de la dangerosité des isolats sont possibles par mise en œuvre de méthodes moléculaires adaptées à l'objectif⁴. Sous réserve d'une appréciation préalable de la structure et de la diversité des populations bactériennes, la caractérisation en routine des isolats permet d'identifier rapidement des agrégats (clusters) associés à une

exposition commune de l'homme ou de l'animal et parfois de formuler des hypothèses sur les chaînes de transmission des contaminants.

La méthode à appliquer dépendra donc de l'objectif poursuivi :

- **Etude de la structure des populations bactériennes** : caractérisation des relations phylogénétiques entre les souches, évaluation de la diversité et du degré d'évolution génomiques.
- **Investigation d'épidémie** : caractérisation de la proximité génomique entre les souches isolées et suspectées d'être reliées à la situation épidémiologique préoccupante, par une méthode au pouvoir de discrimination élevé.
- **Attribution de sources** : caractérisation des souches à partir d'une méthode au pouvoir de discrimination intermédiaire, adapté à la diversité moléculaire des populations bactériennes ciblées.
- **Risque épidémique potentiel** : caractérisation du contenu en gènes de la souche en relation avec son fitness (capacité à se multiplier dans son environnement, à persister, à diffuser), évaluation de l'expression phénotypique du potentiel génétique des isolats.

Le tableau 2 résume les caractéristiques des principales méthodes appliquées et souligne les avantages et inconvénients de chacune au regard des objectifs poursuivis. (tableau page 6).

⁴ EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), 2013. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). EFSA Journal 2013;11(12):3502. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2013.3502/epdf>

Tableau 2 : Principales caractéristiques des méthodes moléculaires applicables à *Salmonella* spp.

Méthode	Application	Pouvoir discriminant	Reproductibilité	Harmonisation Internationale	Méthode de 1 ^{ère} ou 2 ^{nde} intention ?	Représentativité des cibles moléculaires de la méthode / ensemble du génome
Sérotypage moléculaire	Surveillance	Faible à modéré – insuffisant généralement pour l'investigation d'épidémies	Dépend de la méthode	Suit la nomenclature du sérotypage par agglutination ; pas de SOP et EOA	1 ^{ère}	Faible
PFGE	Investigation d'épidémie (méthode de référence), structure des populations	Variable selon les sérovars	Modérée à Forte	Oui	1 ^{ère} /2 ^{nde}	Moyenne (dépend des sites de restriction enzymatique)
MILVA	Investigation d'épidémie, étude locale	Variable selon les sérovars (ex. Typhimurium et variants monophasiques)	Modérée à Forte (ex. Typhimurium et variants monophasiques)	Oui (pour Typhimurium et Enteritidis)	1 ^{ère} /2 ^{nde}	Faible (limitée aux régions ciblées : VNTRs)
CRISPR	Surveillance, investigation d'épidémie	Modéré à Fort	Forte	Faible (application surtout France)	1 ^{ère} /2 ^{nde}	Faible (limitée aux régions ciblées : CRISPRs)
MILST	Surveillance	Modéré - insuffisant généralement pour l'investigation d'épidémies	Forte	Forte	1 ^{ère} /2 ^{nde}	Faible (cible 7 gènes conservés)
WGS	Surveillance ; investigation d'épidémie, étude locale, source attribution	Fort	Forte	Oui (SOP et EOA à définir)	1 ^{ère} /2 ^{nde}	Très Forte (excepté pour les motifs d'ADN répétés)

[**CRISPR**: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; **EOA** : External quality assurance; **PFGE** : Pulse Field Gel Electrophoresis; **MILST** : Multi-Locus sequence typing ; **MILVA** : Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis ; **SOP** : Standard operating procedure ; **WGS** : Whole genome sequencing]

RECHERCHE DE MARQUEUR(S) MOLÉCULAIRE(S)

De nombreuses méthodes ont été décrites dans la littérature scientifique pour détecter la présence d'un ou plusieurs marqueurs moléculaires, plus ou moins spécifiques des différents sérovars de *Salmonella*, voire de lignées bactériennes ou encore clones épidémiques.

De nombreuses méthodes, basées sur l'amplification de marqueur à point final (PCR classique) ou en temps réel (RT-PCR), ont été développées pour confirmer le caractère variant des souches dites *variants* monophasiques de Typhimurium, de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-. Une réflexion est en cours au niveau international (ISO) pour normaliser une méthode moléculaire consensuelle pour confirmer ces variants par PCR.

MULTI LOCUS SÉQUENCE TYPING (MLST)

Le principe de cette méthode repose sur la variation de séquence de 7 loci génétique hautement conservés au sein du chromosome de *Salmonella* car impliqués dans le métabolisme primaire de la bactérie. Un profil ST (pour *sequence type*) est déduit à partir de ces 7 séquences alléliques, indexées dans une base de données centrale, accessible via le web. Les profils ST de différents isolats peuvent ainsi être comparés sans ambiguïté. Cette méthode constitue une première approche dans la caractérisation de la complexité clonale des populations de *Salmonella* isolées.

Entre avril 2014 et mars 2015, le laboratoire de référence de santé publique de Londres a séquencé en routine un grand nombre de génomes (n=7 338) dans le cadre de leurs activités de surveillance des *Salmonella* d'origine humaine, en parallèle du sérotypage par agglutination (Ashton et al., 2016). Une très forte corrélation (96% des 6 887 *Salmonella enterica* analysées) a été observée entre les résultats obtenus par les deux méthodes. Cette méthode respecte la nomenclature traditionnelle des sérovars et apporte également des compléments sur le lien phylogénétique entre les isolats (profil ST pour *sequence type*). De plus, les souches qui possèdent une formule antigénique incomplète (perte d'expression phénotypique d'un antigène O ou H) peuvent être associées à un ST.

PFGE

Le principe de cette méthode repose sur la macro-fragmentation du génome total de l'isolat à l'aide d'enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont capables de couper l'ADN au niveau d'une séquence spécifique de nucléotides (exemple pour *XbaI* :5'...TCTAGA...3'). Les profils moléculaires (pulsotypes) sont obtenus par séparations et révélation des fragments d'ADN sur gel d'électrophorèse. Le gel est soumis à un courant électrique d'orientation variable pour faciliter la séparation des fragments de grande taille, d'où le terme utilisé de « champ pulsé ».

Cette méthode, développée en 1984, a fait l'objet de très nombreux travaux menés dans le cadre d'une démarche d'harmonisation internationale (PulseNet, EFSA-ECDC). Des procédures harmonisées sont aujourd'hui disponibles et spécifiques du genre *Salmonella*⁵. Elles concernent le protocole, les contrôles qualité des données brutes et les modalités d'interprétation des résultats. Des essais inter-laboratoires annuels sont organisés au niveau national, européen et international. L'électrophorèse en champ pulsé est la méthode de référence pour la caractérisation moléculaire approfondie et la discrimination des salmonelles. Utilisée très largement depuis deux décennies pour mener une surveillance moléculaire globale, cette méthode a été très utile pour l'identification d'épidémies et l'investigation de situation de contaminations locales, nationales et internationales par *Salmonella*.

Par la faible diversité des pulsotypes détectés, cette méthode présente cependant des limites pour distinguer des isolats non reliés épidémiologiquement, appartenant à certains sérovars (Typhimurium, Enteritidis, Dublin).

Après évaluation et validation de leurs performances vis-à-vis de la méthode de référence, des méthodes alternatives (CRISPR, MLVA, méthodes basées sur le séquençage du génome) plus rapides, discriminantes et moins laborieuses à mettre en œuvre, remplacent donc progressivement la PFGE.

⁵ Jacobs W, Kuiling S and van der Zwaluw K, 2014. Molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food, feed and animals: state of play and standard operating procedures for pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis (MLVA) typing, profiles interpretation and curation. EFSA supporting publication 2014:EN-703, 74 pp

CRISPR

Cette méthode est basée sur la caractérisation par PCR de deux régions chromosomiques nommées CRISPR1 et CRISPR2 (pour Clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Ces régions présentent un polymorphisme élevé chez *Salmonella* (Barrangou and Dudley, 2016). Ces deux régions CRISPR sont composées de courtes séquences palindromiques répétées et séparées par des séquences nommées *spacers*. Au total, la présence ou absence de 68 *spacers* est caractérisé pour définir un profil Crispr pour chaque isolat.

MLVA⁶

Cette méthode de typage du génome bactérien est basée sur l'analyse du polymorphisme d'un ensemble de régions ou loci génomiques, appelées VNTR pour *Variable Number Tandem Repeat* (Lindstedt et al., 2003). Chaque locus se caractérise par une séquence d'ADN de 5 pb ou plus (dit unité), répétée en tandem.

Le principe (Source : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22807>) repose sur l'amplification de ces régions par PCR et utilisation d'amorces marquées par un fluorophore, pour estimer le nombre d'unités répétées (UR) caractéristiques des différents loci. Ces amorces s'hybrident aux séquences conservées, situées en amont et en aval des VNTRs (=offset). Pour chaque région amplifiée, le nombre d'UR est déduite à partir de la taille totale de l'amplicon.

Les VNTRs ciblés sont choisis selon leur longueur totale (en pb) et leur polymorphisme. Plus la variabilité du nombre d'UR est grande, plus le VNTR contribuera à la discrimination des isolats. Des protocoles harmonisés sont disponibles pour les sérovars Typhimurium, Enteritidis et Dublin. Des tableaux de normalisation des données brutes sont disponibles pour comparer des résultats obtenus dans des conditions différentes. La méthode MLVA est appliquée au niveau européen en première intention (recommandations EFSA-ECDC) pour la caractérisation des souches humaines de *S. Typhimurium* et ses variants monophasiques.

SÉQUENÇAGE TOTAL DU GÉNOME (WGS)

Malgré leur efficacité démontrée pour la détection, l'investigation et le contrôle d'épidémies d'origine alimentaire durant les deux dernières décennies, les méthodes PFGE et MLVA ne sont plus considérées aujourd'hui comme les plus performantes pour répondre à ces objectifs. Le séquençage total de génome (WGS) peut potentiellement remplacer toutes les méthodes de typage phénotypique et moléculaire actuellement utilisées. Il donne accès à la capacité maximale théorique de discrimination entre les isolats, par un accès à l'ensemble des déterminants génétiques de la bactérie, qui lui confèrent par exemple sa virulence ou encore sa résistance aux antibiotiques.

L'apport de nouvelles technologies et méthodes basées sur le séquençage total du génome bactérien a d'ores et déjà permis de révéler l'émergence de bactéries pathogènes transmissibles par l'aliment et de retracer l'évolution et la diffusion de la souche problématique à un niveau international (exemple, épidémie à *E. coli* O104:H4 en Allemagne en 2011 (Mellmann et al., 2011).

L'analyse d'un grand nombre de génomes (acquisition régulière au cours du temps) peut permettre la mise en évidence d'un marqueur moléculaire spécifique à une souche émergente, voire épidémique. Cette approche fut appliquée en temps réel et s'est avérée très efficace pour gérer une alerte à *Klebsiella* en 2011 aux Pays-Bas (Dautzenberg et al., 2014).

La surveillance génomique des isolats en continu et temps réel peut permettre d'anticiper une émergence, voire de détecter des souches à haut risque de provoquer une épidémie, selon leurs caractéristiques génomiques, leur virulence, résistance aux antibiotiques et selon l'environnement dans lequel la souche est détectée (potentielle multiplication, procédés liés au produit, niveau d'exposition de l'animal ou de l'homme, etc.). Pour cela, les « métadonnées » associées à l'isolement de la souche doivent être de qualité et sont aussi importantes à rassembler que les données analytiques. A titre illustratif dans le domaine de la santé humaine, il s'agit de l'âge du patient, des symptômes observés, de l'historique de ses voyages et de son régime alimentaire.

⁶ Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis

Tableau 1 : Composantes clés des approches pertinentes pour les laboratoires publiques assurant des analyses de routine (K-mer, SNPs et MLST)

[Source : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=22807>].

Features	K-mer	SNP	MLST
Epidemiological concordance	Intermediate	High	High
Discrimination	Intermediate	High	High
Stable strain nomenclature	No	No	No
International standardisation	No	No	No
Scalability	No	No	No
Speed	Intermediate	Slow SNP calling, slow comparisons	Slow SNP calling, fast comparisons
Local computing requirements	Low	High	Low
Local bioinformatics expertise required	Yes	Yes	No
Curation of database	No	No	Yes

SNP : single nucleotide polymorphisms; MLST: extended multilocus sequence typing

Une terminologie spécifique est associée à l'approche WGS. Le terme *core-genome* (cg) est utilisé pour mentionner l'ensemble des gènes détectés chez toutes les souches bactériennes incluses dans la population bactérienne étudiée. Le génome accessoire correspond aux gènes détectés uniquement chez une partie de la population bactérienne étudiée. Il inclut par exemple l'ADN phagique et plasmidique. Le pan-genome correspond au core-genome et au génome accessoire, c'est-à-dire à l'ensemble de l'information génétique contenu dans la population.

Plusieurs approches ont été développées pour l'analyse des données brutes de séquençage total de génome (k-mers, SNP et cg/wg-MLST). L'approche k-mer est moins discriminante mais plus simple et rapide et peut être utilisée pour l'identification rapide d'espèce, sous-espèces. L'approche SNPs est la plus discriminante mais reste sensible au choix du génome de référence utilisé pour le *mapping*, ce qui limite la comparaison de résultats entre laboratoire utilisant un génome de référence différent. Des développements plus récents par approche dite de novo permettent de s'affranchir du génome de référence. Les analyses SNP demandent des ressources machine (temps de calcul) plus importants que les autres approches. Les approches cg-MLST (core-genome MLST) et wg-MLST (whole-genome MLST) constituent des approches intermédiaires intéressantes

pour la mise en place d'une surveillance en routine dans les laboratoires. L'allèle (*la séquence*) de chaque gène présent dans le génome de la bactérie est comparé avec les données centralisées dans une base de données contenant plusieurs milliers de génomes. Un profil ST (*sequence type*) est ainsi défini pour chaque isolat du MLST conventionnel (7 gènes). Les performances de la méthode, sa capacité à pouvoir évoluer tout en conservant une nomenclature stable pour décrire la structure et la diversité moléculaire des salmonelles, les possibilités de normalisation, sont autant d'arguments qui ont conduit PulseNet International (Nadon et al., 2017) à recommander la mise en œuvre du Whole Genome MLST dans les laboratoires.

RÉFÉRENCES

- Ashton, P.M., Nair, S., Peters, T.M., Bale, J.A., Powell, D.G., Painsset, A., Tewolde, R., Schaefer, U., Jenkins, C., Dallman, T.J., de Pinna, E.M., Grant, K.A., Salmonella Whole Genome Sequencing Implementation Group, 2016. Identification of Salmonella for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ* 4, e1752.
- Bardoň, J., Štromerová, N., 2015. [Identification of zoonotic bacterial pathogens by the MALDI TOF MS method]. *Klin. Mikrobiol. Infekcni Lek.* 21, 46–50.
- Barrangou, R., Dudley, E.G., 2016. CRISPR-Based Typing and Next-Generation Tracking Technologies. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 7, 395–411.
- Dautzenberg, M.J., Ossewaarde, J.M., Kraker, M.E. de, Zee, A. van der, Burgh, S. van, Greeff, S.C. de, Bijlmer, H.A., Grundmann, H., Stuart, J.W.C., Fluit, A.C., Troelstra, A., Bonten, M., 2014. Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011. *Eurosurveillance* 19, 20723.
- Dieckmann, R., Malorny, B., 2011. Rapid Screening of Epidemiologically Important Salmonella enterica subsp. enterica Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4136–4146.
- Kupferschmidt, K., 2011. Outbreak Detectives Embrace the Genome Era. *Science* 333, 1818–1819. h
- Lindstedt, B.-A., Heir, E., Gjernes, E., Vardund, T., Kapperud, G., 2003. DNA fingerprinting of Shiga-toxin producing Escherichia coli O157 based on Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeats Analysis (MLVA). *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2, 12.
- Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S.F., Henkhaus, J.K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P.M., Moore, R.L., Guenther, S., Rothberg, J.M., Karch, H., 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic Escherichia coli O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6, e22751.
- Murray, P.R., 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 1626–1630.
- Nadon, C., Walle, I.V., Gerner-Smidt, P., Campos, J., Chinen, I., Concepcion-Acevedo, J., Gilpin, B., Smith, A.M., Kam, K.M., Perez, E., Trees, E., Kubota, K., Takkinen, J., Nielsen, E.M., Carleton, H., Panel, F.-N.E., 2017. PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. *Eurosurveillance* 22, 30544.

