

Cette présentation a été effectuée le 4 décembre 2024, au cours de la journée « Nouveautés en tuberculose : du laboratoire à l'intervention de santé publique » dans le cadre des 27es Journées annuelles de santé publique.

 **Canada**

**Génotypage de *Mycobacterium tuberculosis* : MIRU-VNTR
versus séquençage du génome entier (SGE)**

JASP 2024 – Montréal

Hafid Soualhine Ph.D
Laboratoire national de microbiologie
4 décembre 2024

PROTECTING AND EMPOWERING CANADIANS
TO IMPROVE THEIR HEALTH



1

Unclassified / Non classifié

- **Je n'ai aucun conflit d'intérêt à déclarer**

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA > 2

2

Surveillance génomique de la tuberculose (TB) Défis principaux

- **Standardisation et contrôle de la qualité**
- **Échange et partage des protocoles de SGE, outils bio-informatique**
- **Échange de données de séquençage**
- **Bénéfice: surveillance nationale de la TB et internationale**

3

Génotypage de la TB

- Permet la détection des variants (polymorphismes SNP, indels,...) du génome; le génotypage vise à déterminer l'existence de modifications à des positions connues, sur **une partie ou la totalité** du génome.
- Avec les données cliniques et épidémiologiques, le génotypage pourrait identifier des chaînes de transmission de la TB.
- Le génotypage est utilisé pour différencier une réactivation d'une reinfection; il permet aussi de résoudre des cas de contamination de laboratoire.
- Il pourrait être utilisé pour étudier la géodynamique et comprendre **la transmission de la TB** dans une perspective globale

4

YES! Drug resistant tuberculosis treatment is shorter and all oral.

PRÉDICTION DE LA RÉSISTANCE

Des laboratoires de haute qualité utilisent des méthodes modernes pour la détection **précoce, rapide et efficace** de la TB et de la résistance aux antituberculeux.

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA > 5

5

Unclassified / Non classifié

SGE et prédiction de la résistance aux antituberculeux de 1^{ère} ligne

Open Access Article

Evaluation of Whole Genome Sequencing-Based Predictions of Antimicrobial Resistance to TB First Line Agents: A Lesson from 5 Years of Data

by Meenu Kaushal Sharma ^{1,2,†}, Michael Stobart ^{1,†}, Pierre-Marie Akochy ³, Heather Adam ^{2,4}, Debra Janella ¹, Melissa Rabb ¹, Mohey Alawa ⁵, Inna Sekirov ⁶, Gregory J. Tyrrell ^{7,8} and Hafid Soualhine ^{1,2,*}

Table 1. The predictive values (positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV), sensitivity, and specificity) of AMR predictions for the four primary antituberculosis antimicrobials.

Antimicrobial	Pipeline Used	Total with Phenotypic and Genotypic Results	Phenotypic Resistance		Phenotypic Susceptible		Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
			WGS Predicted Resistant	WGS Predicted Susceptible	WGS Predicted Resistant	WGS Predicted Susceptible				
Isoniazid	Mykrobe	1510	124	19	8	1359	86.71%	99.41%	93.94%	98.62%
	Mykrobe corrected with TB Profiler *	1510	132	11	5	1362	92.31%	99.63%	96.35%	99.20%
Rifampin	Mykrobe	1510	44	0	8	1458	100.00%	99.45%	84.62%	100.00%
	Mykrobe corrected with TB Profiler *	1510	44	0	8	1458	100.00%	99.45%	84.62%	100.00%
Ethambutol	Mykrobe	1510	14	0	19	1477	100.00%	98.73%	42.42%	100.00%
	Mykrobe corrected with TB Profiler *	1510	14	0	16	1480	100.00%	98.93%	46.67%	100.00%
Pyrazinamide	Mykrobe	1431	43	47	2	1339	47.78%	99.85%	95.56%	96.61%
	Mykrobe corrected with TB Profiler *	1431	52	38	1	1340	57.78%	99.93%	98.11%	97.24%

* Mykrobe corrected with TB Profiler: any result that was discrepant between phenotypic phenotypic susceptibility testing (DST), and Mykrobe AMR prediction in our laboratory was further tested using TB profiler. If the discrepancy was resolved using TB profiler, the prediction value was corrected.

Int. J. Mol. Sci. 2024, 25(11), 6245

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA > 6

6

Prédictions de la résistance des antituberculeux de première ligne (LSPQ)

Antibiotiques	Total	Antibiogramme Résistant		Antibiogramme Sensible		Sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
		Prédiction R (VP)	Prédiction S (FN)	Prédiction R (FP)	Prédiction S (VN)				
Isoniazide	91	17	0	0	74	100	100	100	100
Rifampine	97	11	0	0	86	100	100	100	100
Éthambutol	98	1	0	2	97	100	98	34	100
Pyrazinamide	94	10	5	0	84	67	100	100	94

Excellente prédiction pan-sensibles des 4 antituberculeux de première ligne : spécificité $\geq 98\%$

Excellente prédiction de résistance RIF, INH (TB-MR) : Sensibilité = 100 %

Mais la valeur prédictive de EMB et la sensibilité de PZA sont faibles

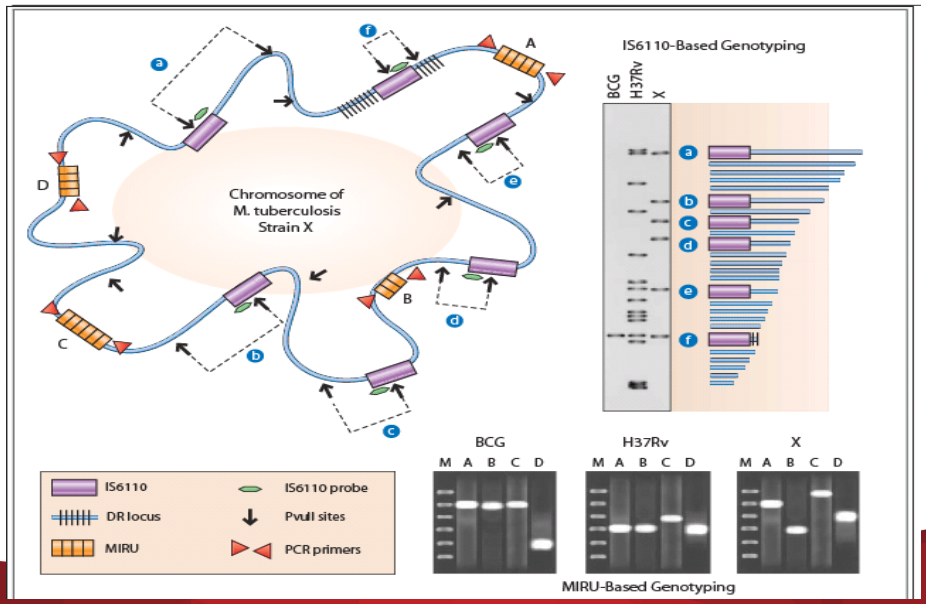
7

GÉNOTYPAGE DE LA TB

8

Marqueurs génétiques de génotypage épidémiologique

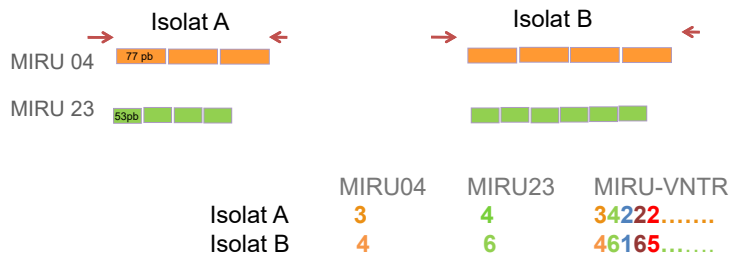
Unclassified / Non classifié



9

MIRU-VNTR (*mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number tandem repeat*)

Unclassified / Non classifié



24 Loci MRU

Category	MIRU 02	MIRU 04	MIRU 10	MIRU 16	MIRU 20	MIRU 23	MIRU 24	MIRU 26	MIRU 27	MIRU 31	MIRU 39	MIRU 40	524	577	1985	2163	2165	2317	2401	2481	3171	3900	4052	4156
1	2	2	5	3	1	2	1	5	3	2	2	4	2	3	2	6	3	2	4	2	3	3	6	2
2	2	2	6	3	1	3	1	6	3	2	3	3	3	3	2	3	3	2	4	2	3	3	7	2
3	2	2	5	3	2	3	1	5	3	3	2	3	2	3	3	6	3	2	3	3	2	2	5	3
4	3	2	4	3	2	5	1	7	3	3	2	5	2	3	4	4	4	4	4	4	2	3	4	7
5	2	2	4	3	2	5	1	4	3	3	2	4	2	3	5	4	3	4	4	4	2	3	4	6
6	2	2	4	3	1	5	1	4	3	3	2	7	2	3	4	6	3	4	4	4	2	3	3	8
7	2	2	4	3	1	5	1	4	3	3	2	7	2	3	4	6	3	4	4	4	2	3	3	8
8	2	2	4	3	1	5	1	4	3	3	2	7	2	3	4	6	3	4	4	4	2	3	3	8
9	2	2	4	3	1	5	1	4	3	3	2	7	2	3	4	6	3	4	4	4	2	3	3	8

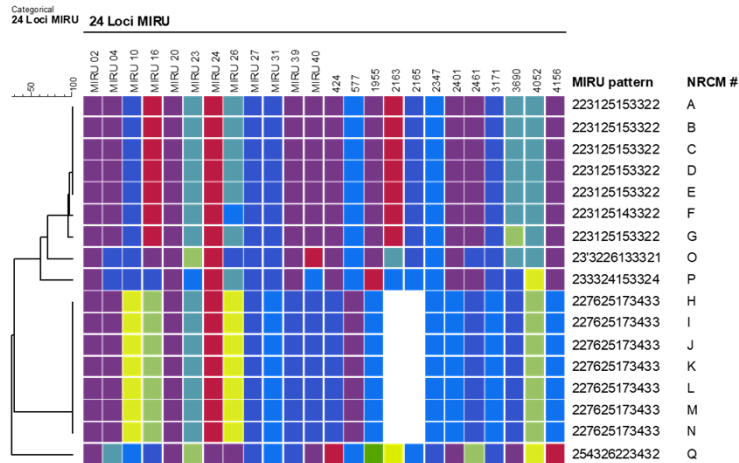
10 10

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA >

10

Exemple de rapport de génotypage par MIRU-VNTR

- Mycobacterial interspersed repetitive unit - variable number of tandem repeat analysis

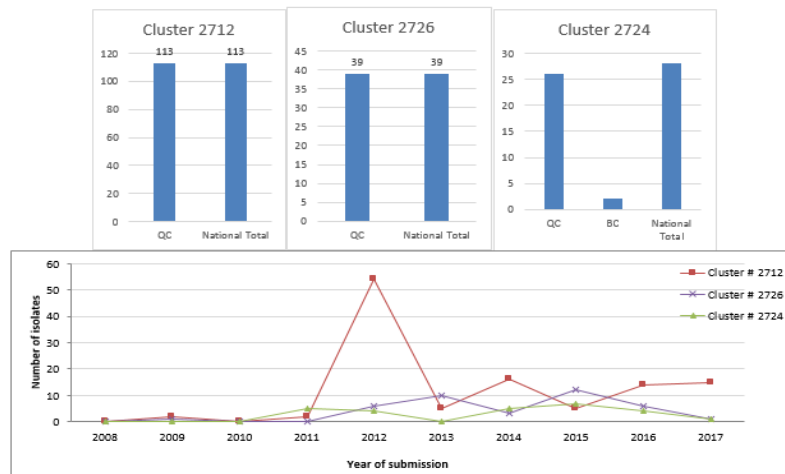


11

Banque nationale des données CTBNet – MIRU-VNTR

Plus de 10 000 isolats, à l'échelle nationale (excluant l'Ontario)
Suivi des *clusters* (agrégats) et coordination inter-provinces/territoires/international

Figure 12: Top 3 clusters in Quebec



12

Figure 18: Distribution of cluster 2712 in Canada

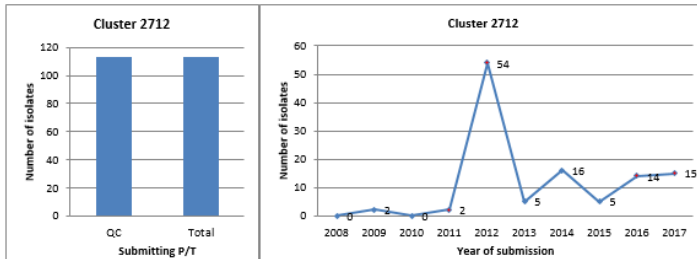
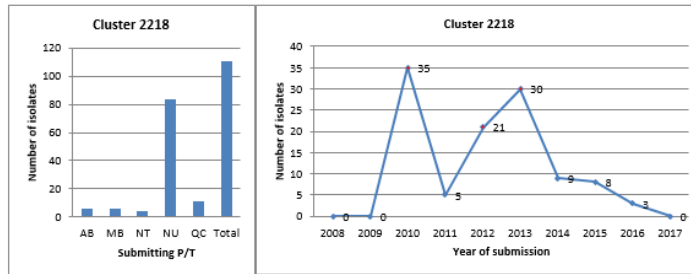
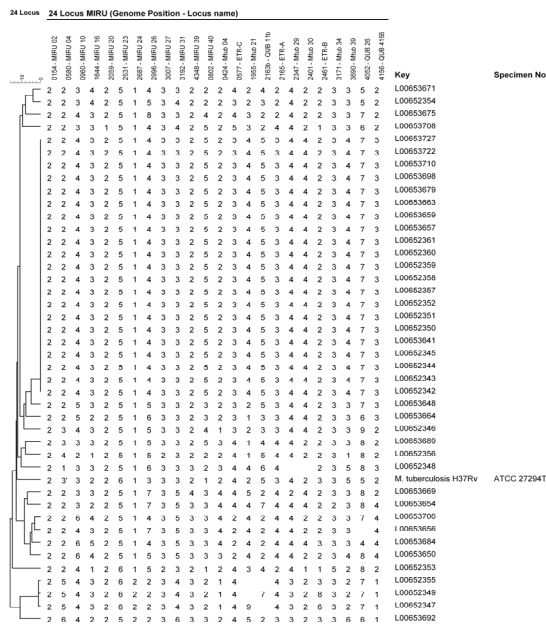


Figure 19: Distribution of cluster 2218 in Canada



13

Dendrogramme de MIRU-VNTR: Analyse d'une écloison au Québec



14

Distance métrique

Vague/Rapide

Fine/Lente

MIRU

cgMLST

SNVPhyl

- MIRU compare 24 sites répétés, donc seulement <1 % du génome; efficace pour un génotypage global, mais non pour des transmissions clonales ou des éclosions.
- cgMLST compare 2500 à 3200 gènes (dépend du *core genome* en général; couvre 60-75 %) Plus le core (ou point de comparaison) est élevé, plus la résolution et la confiance sont élevées.
- Analyse des SNPs SNVPhyl (Génome inclut dans l'analyse 80-90 %) Plus haute résolution, plus lente et tributaire de la qualité de séquençage = **Éclosions de TB.**

15

Analyse du polymorphisme nucleotidique (SNP)

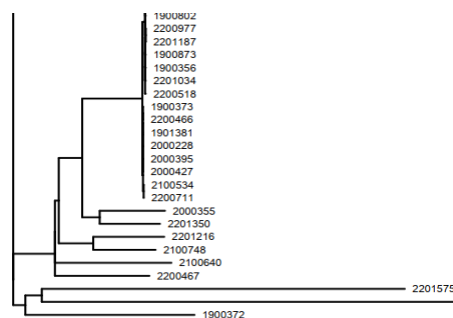
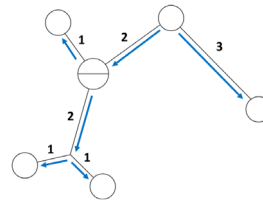
- Compare les différence de polymorphisme nucléotidique sur tout le génome = variation génétiques
- Les séquences répétées, InDel sont écartées

- Arbre phylogénétique
 - Noeud (cercle) représente isolats
 - Branches (lignes): longueur proportionnelle à la différence génétique entre les isolats

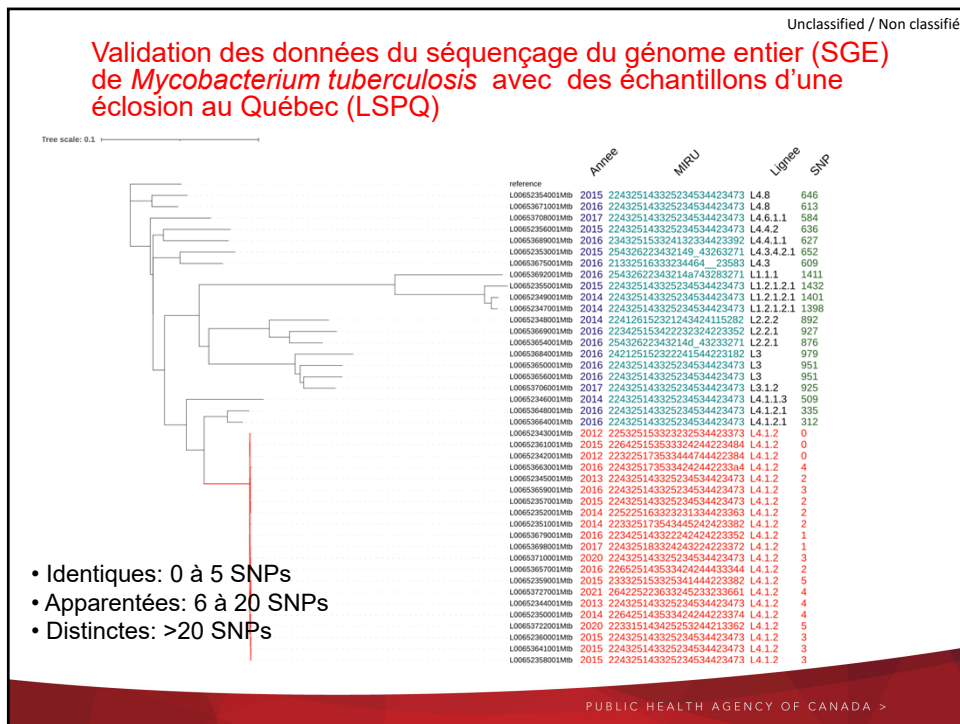
"Maximum likelihood ou Neighbour joining"

Matrice maximum de vraisemblance
ou matrice de distance

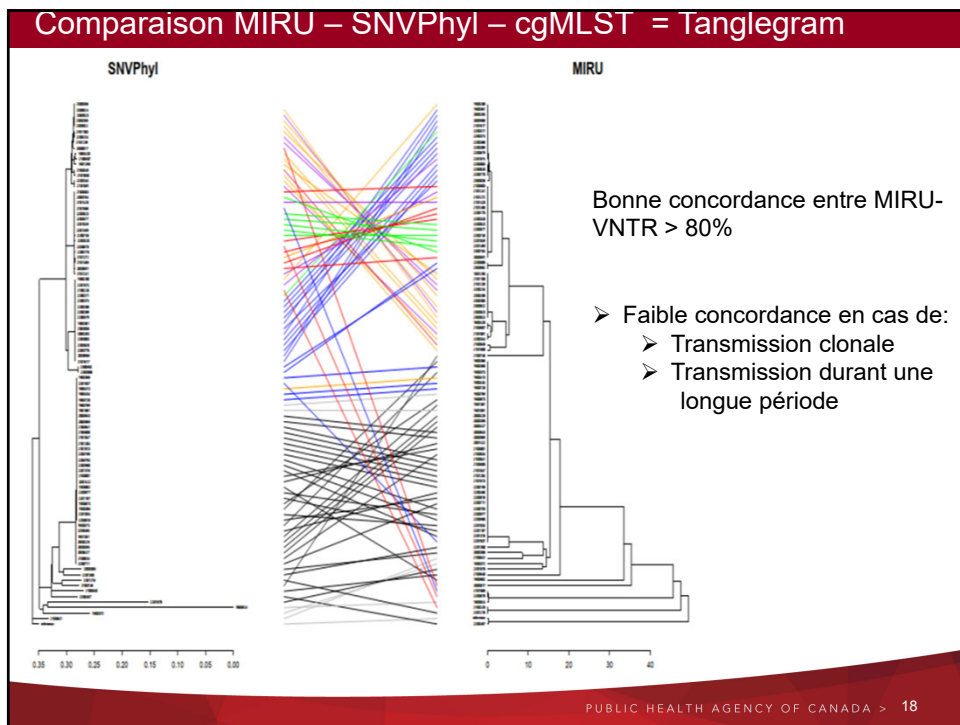
Déterminer le seuil de SNPs (CuttOFF) pour l'analyse de liaison.
(généralement 20, mais pourrait être 5-20)



16



17



18

Whole-genome MultiLocus Sequence Typing wgMLST



Compare les séquences au niveau de 2,870 loci sur tout le génome

Couverture de ~70% du génome

Locus: dans ce cas locus = gène

Gènes riches PE / PPE, InDel, séquences répétées : exclues

Génération d'un arbre phylogénétique basée sur "Hamming distances"

Hamming distance quantifier la différence entre deux séquences et se traduit ici en nombre de loci différents.

Chaque niveau de branche 'level' dans l'arbre phylogénétique est défini par un "threshold hamming distance" = Code cluster

19

Description de l'analyse de cgMLST

- Centre de Génomique Opérationnel (COG) – **Méthode statique**
 - Analyse cgMLST utilisant un minimum de nombre de seuils de différence (*differences thresholds*):
 - 0 loci de différences dans un même groupe (cluster) = très stringent
 - 5 loci de différences dans un même groupe
 - 10, 15 ou 25 loci de différences aussi évalués
 - Output: résultat différent selon le seuil choisi; un seuil sera adopté pour la surveillance nationale.
- *Genomics Address Services* (GAS) – **Méthode flexible**
 - Analyse cgMLST utilisant différents seuils de distances (*cluster address*):
 - Level 1: 2000 loci difference = moins de groupes ou clusters
 - Level 2: 1000
 - Level 3: 500
 - Level 4: 100
 - Level 5: 50
 - Level 6: 10
 - Level 7: 5 loci
 - Level 8: 1 locus différence = beaucoup plus de groupes ou clusters
 - Résultat: assignation des adresses concaténées pour tous les niveaux

20

Exemple de cgMLST: Numéro ST représentant le niveau de distance génétique:

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	id	address	level_1	level_2	level_3	level_4	level_5	level_6	level_7	level_8
11	1800495	1.1.13.99.167.405.441.483	1	1	13	99	167	405	441	483
12	1800496	1.1.13.99.167.405.441.486	1	1	13	99	167	405	441	486
13	1800505	1.1.13.99.167.405.440.479	1	1	13	99	167	405	440	479
14	1800540	1.1.13.99.167.405.441.484	1	1	13	99	167	405	441	484
15	1800824	1.1.8.27.36.46.49.55	1	1	8	27	36	46	49	55
16	1801296	1.1.13.172.325.668.762.937	1	1	13	172	325	668	762	937
17	1900229	1.1.12.33.59.228.251.261	1	1	12	33	59	228	251	261
18	1900234	1.1.12.33.53.168.178.187	1	1	12	33	53	168	178	187
19	1900235	1.1.14.211.432.892.1052.1379	1	1	14	211	432	892	1052	1379
20	1900239	1.1.13.196.409.854.1002.1299	1	1	13	196	409	854	1002	1299
21	1900279	1.1.15.270.590.1118.1284.1624	1	1	15	270	590	1118	1284	1624

All cgMLST Cluster Assignments:

	A	B	C	D	E	F	G
1	id	GAS_level8	GAS_level7	cgMLST0	cgMLST5	cgMLST_Completion	CTBNet
2	2000030	1.1.12.41.80.283.307.317	1.1.12.41.80.283.307	317	230	0.96437219	5721
3	2100691	1.1.13.196.409.854.1000.1288	1.1.13.196.409.854.1000	644	326	0.985126254	1639
4	2201579	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.978208232	2629
5	2201441	1.1.13.110.193.448.501.608	1.1.13.110.193.448.501	940	587	0.978554134	2631
6	2201581	1.1.12.38.70.270.294.304	1.1.12.38.70.270.294	954	658	0.976478727	5673
7	2200316	1.1.13.196.409.854.1002.1299	1.1.13.196.409.854.1002	686	762	0.980975441	1632
8	2201518	1.1.12.33.59.216.234.243	1.1.12.33.59.216.234	591	442	0.973365617	4672
9	2301261	1.1.12.33.53.131.139.147	1.1.12.33.53.131.139	1165	804	0.982704946	4513

21

Analyse approfondie... Cluster Instability

- GAS cgMLST niveau 7 et 8 (1 et 5 loci différence) versus MIRU-VNTR

	A	B	C	D
1	GAS_level8_cgMLST	index	MIRU_cluster	count
352	1.1.13.110.193.448.495.555	0	3	15
371	1.1.13.110.193.448.495.574	0	2	3
372	1.1.13.110.193.448.495.575	0	2	2
374	1.1.13.110.193.448.495.577	0	2	5

	A	B	C	D	E	F	G
1	id	GAS_level8	GAS_level7	cgMLST0	cgMLST5	cgMLST_Completion	CTBN
4	2201579	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.978208232	2629
152	2200611	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.977170529	2629
412	2100600	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.980283639	2629
425	2001075	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.979245936	2629
654	2101054	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.976824628	2629
716	2200726	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.98062954	2629
768	2200773	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.98062954	2629
802	2301748	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.981321342	2636
985	2101266	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.978900035	2640
1012	2200756	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.980283639	2629
1093	2200126	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.97751643	2629
1272	1900538	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.979937738	2629
1344	2301098	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.980975441	2629
1441	2000198	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.977862331	2629
1522	2001146	1.1.13.110.193.448.495.555	1.1.13.110.193.448.495	727	305	0.979937738	2640

15 isolats groupes en un seul cluster cgMLST

Ayant 3 profils MIRU-VNTR, avec 2 MIRU-VNTR loci différences

22

MIRU-VNTR – cgMLST: *Cluster Stability Matrix*

- Comparaison bi-directionnelle entre:
- - MIRU-VNTR / cgMLST – COG = 5 loci de différences/groupe
cgMLST – GAS = niveau 7 = 5 Loci

Cluster Stability Matrix					
Method	Level 8	Level 7	0 Loci	5 Loci	MIRU
Level 8	NA	0.195	0.908	0.178	0.112
Level 7	0.413	NA	0.609	0.872	0.672
0 Loci	0.881	0.198	NA	0.181	0.113
5 Loci	0.424	0.907	0.616	NA	0.702
MIRU	0.323	0.721	0.469	0.716	NA

Évaluation pré-finale :

Analyse cgMLST utilisant différents seuils de distances (*cluster address*):

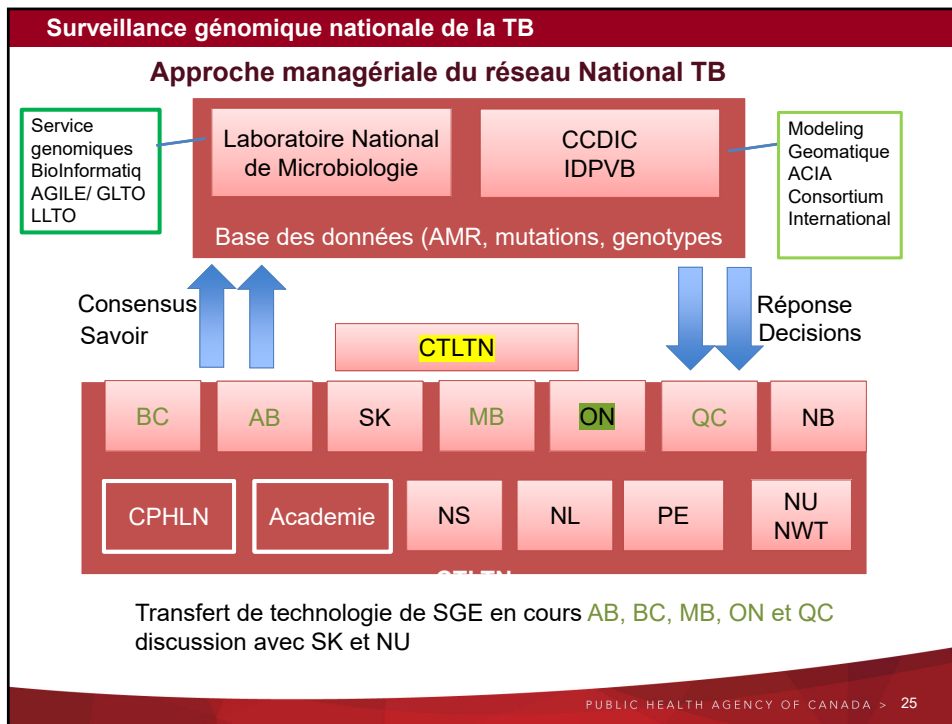
Level 5 : 15 loci Level 6: 10 loci Level 7: 5 loci

23

Perspectives futures

- Le cgMLST remplacera MIRU-VNTR après validation et formation (1 à 2 ans)
- SNVPhyl est un service fourni sur mesure depuis 2016 (éclosions de TB).
- Implémentation d'une base de données de SGE et outils d'analyse nationale *TB genotyping database* (WGS-CTBnet) sera hébergée à l'ASPC
- Chaque juridiction P/T aura accès en tout temps à ses propres données et pourra comparer aux autres profils à l'échelle nationale.
 - Résistance aux ATB avec profils de mutations, / Profil MIRU-cgMLST /
 - Profils typiques et rares (*M. bovis*, *M. orygis*, *M. africanum*, comparer ACIA et international...)
 - Accès électronique des utilisateurs P/T plus facile
 - Alerte de profil similaire ailleurs au Canada.
 - cgMLST et SNVPhyl peuvent réduire les investigations de traçage des contacts.
 - Lier la surveillance génomique aux systèmes de surveillance nationale de la TB.

24



25

Public Health Agency of Canada
Agence de la santé publique du Canada

Unclassified / Non classifié

Remerciements

University of Manitoba

NRCM

- Dr. Meenu Sharma
- Dr. Melissa Rabb
- Dr. Michael Stobart
- Dr. Rashedul Islam
- Alisa McGurran
- Morgan Hiebert
- Darrell Johnstone
- Debra Janella
- Kiana Bergman
- Yanni La
- Emma Rempel
- Janine Concepcion
- Lisa Karlowsky
- Laura Los
- Elayna Thiessen
- Drew De Roca
- Catherine Yoshida
- Michelle Wuzinski
- Yvonne Pho

NML

- Dr. Morag Graham
- Dr. Garrett Westmacott
- Aaron Petkau
- Kyla Cochrane
- Genevieve Labbe
- Dr. Julie Chih-yu Chen

Univ. Manitoba

- Dr. Heather J. Adam
- Dr. Denice Bay

External Collaborators

LSPQ/INSPQ – QC

- Dr. Judith Fafard
- Dr. P-M Akochy
- Benjamin Delisle
- Faye Rowsome
- Emilie Belanger
- Line Painchaud

- Dr. Marcel Behr –QC
- Dr. M. Rodrigues-BC
- Dr. Greg. Tyrrell - AB
- Mohey Alawa -SK
- Dr M. Greenblatt -ON
- Dr. Inna Sekirov -BC
- Dr. Olga Andrievskaia, (CFIA/ACIA)
- Dr. Maureen Crew (CCDIC)
- Dr. Abu Mouchili (CCDIC)

Centre international de TB McGill / McGill International TB Centre

FAHO/WHO Collaborating Centre for Tuberculosis Research

CIHR IRSC / Canadian Institutes of Health Research

Research Manitoba

PUBLIC HEALTH AGENCY OF CANADA >

26