

FT-IR : un nouvel outil pour différencier des souches de *Staphylococcus epidermidis* dans les IOA?

Jean-Baptiste FOULQUIER¹, Florian BERTEAU¹, Stephane CORVEC², Chloé PLOUZEAU-JAYLE³, Anne-Sophie VALENTIN⁴, Carole LEMARIE⁵, Anne GOUGEON⁶, Rachel CHENOUEARD⁵, Pascale BEMER², Didier TANDE¹ and the CRIOGO study group

¹Laboratoire de bactériologie, CHRU Brest; ²Laboratoire de bactériologie, CHU Nantes; ³Laboratoire de bactériologie, CHU Poitiers; ⁴Laboratoire de bactériologie, CHU Tours; ⁵Laboratoire de bactériologie, CHU Angers; ⁶Laboratoire de bactériologie, CHU Rennes

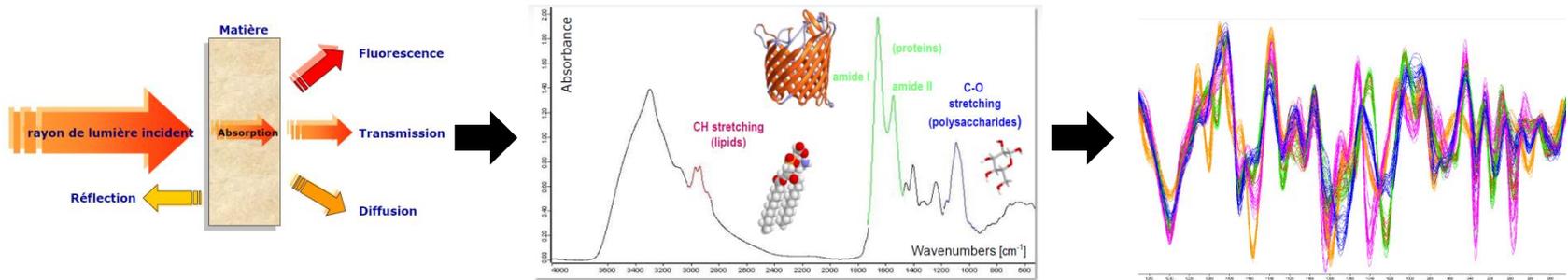
Introduction

- **Infections ostéo-articulaires :**
 - Infections graves
 - Nécessitant un diagnostic et prise en charge pluridisciplinaire
- **Diagnostic microbiologique des IOA :**
 - Une des étapes clés
 - Nécessite de réaliser **plusieurs prélèvements**
 - **Interprétation complexe** : flore commensale ?
- **Les SCN sont fréquemment isolés dans les IOA¹:**
 - ***S. epidermidis*** au premier plan
 - Responsable de **6,3 - 20,7 %** des infections sur prothèse
 - Appartient à la **flore commensale** cutanée, muqueuse

👉 **Intérêt de pouvoir différencier les souches pour affirmer l'infection**

Introduction

Typage par spectrophotométrie infrarouge (FT-IR)



- Absorption de la lumière IR :
 - Spectre spécifique de la composition de la cellule (membranaire) en **protéines**, **lipides** et en **polysaccharides** → **différenciation des microorganismes**

Avantages

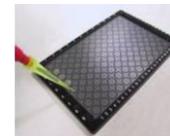
- **Typage rapide** (≈2h)
- **A partir d'une culture**
- Peu coûteuse

Mais ...

- Importance des **conditions analytiques** (température, pression)
- **Cut-off** à définir



IR biotyper, Bruker



Matériel et méthodes

Etude **comparative, multicentrique** (CRIOGO : Brest, Rennes, Tours, Angers, Poitiers, Nantes)

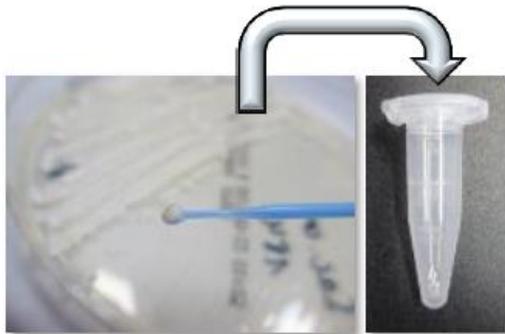
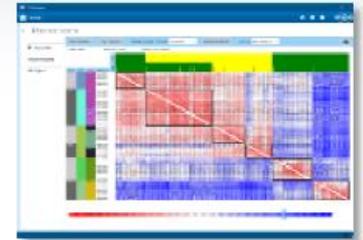
Objectif : Comparer les méthodes FT-IR, ATB et PFGE pour la discrimination des souches *S. epidermidis* dans le diagnostic des IOA

- Souches de *S. epidermidis* isolées dans des prélèvements per-opératoires
- Comparaison de 3 méthodes de typage :
 - **PFGE** : coefficient de Dice (UPGMA), 80% similarité
 - **Phénotype de résistance** (EUCAST 2019)
 - **FT-IR** : euclidien average algorithm, seuil de 0,15
- Tests de comparaison² :
 - Diversité : **Indice de Simpson**
 - Concordance : **Indice de Rand ajusté** et **indice de Wallace ajusté**

2. <http://www.comparingpartitions.info>

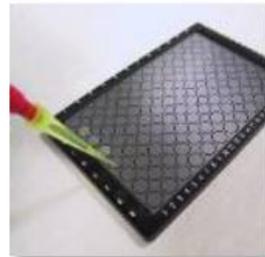
Matériel et méthodes

Préparation et analyse des échantillons



Transfert de culture pure dans un tube
→ Préparation d'une suspension homogène

Culture sur MH à 24h
50µL EtOH 70% + 50µL d'eau désionisée



Dépôt sur cible (réutilisable) + séchage (~25min)

15 µL/spot
TriPLICATE



Mesure par spectromètre FT-IR (~30 sec. par spot)

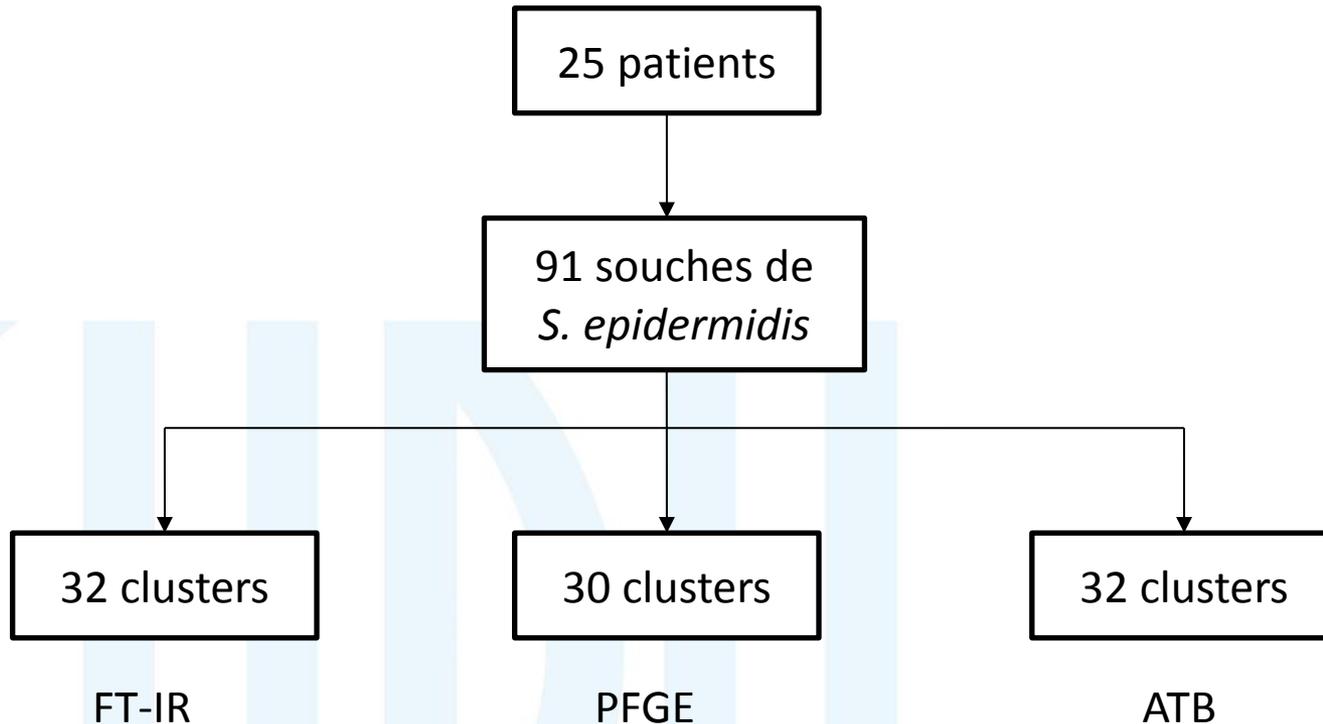


Analyse Bioinformatique de spectres

Présentation IR-Biotyper, Bruker

Résultats

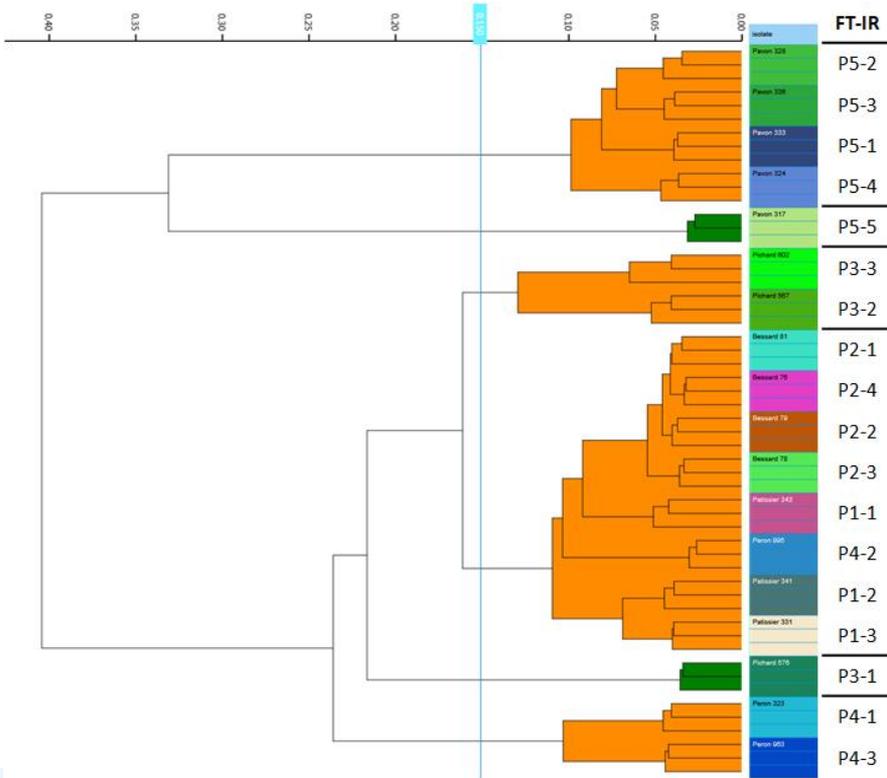
Répartition des souches selon les méthodes



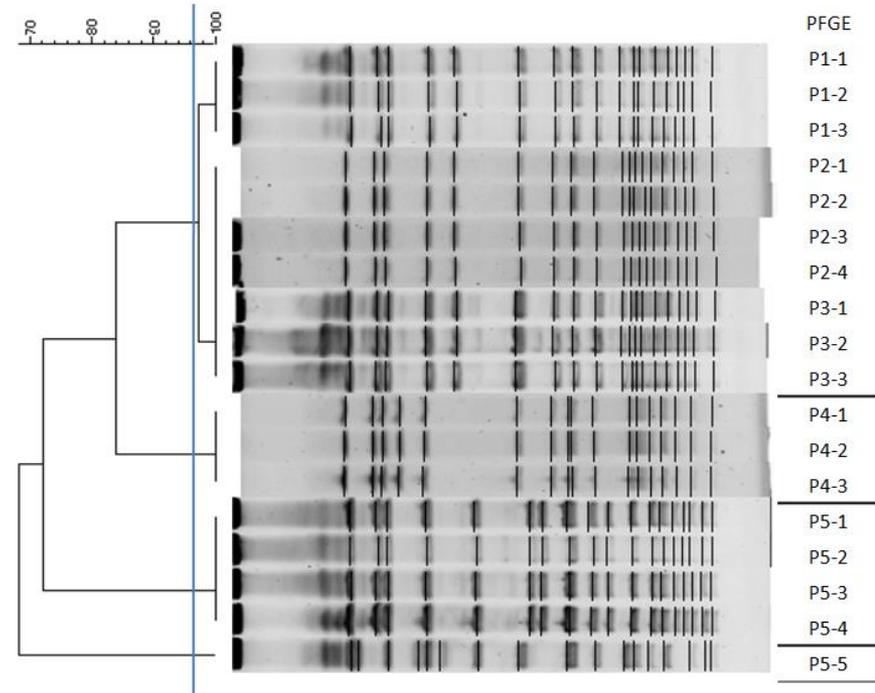
- **Nombre de clusters proche** pour les 3 méthodes
- Pour l'FT-IR : **cut-off optimisé médian 0,135 (0,099-0,324)**

Résultats

Exemple de dendrogrammes



FT-IR (0,15) : 6 clusters



PFGE (80%) : 4 clusters

Résultats - Diversité

Indice de diversité de Simpson

Méthode	Indice de Simpson	IC 95%	
ATB	0,97	0,963	0,978
FT-IR	0,953	0,938	0,968
PFGE	0,961	0,95	0,973

- Pas de différence significative entre PFGE et FT-IR ($p = 0,255$)
- Différence significative entre ATB et FT-IR ($p = 0,016$)
- Indice de Simpson proche de 1 pour les 3 méthodes : **bonne discrimination des souches**

Résultats - Concordance

Indice de Rand ajusté

- Compare la **congruence** des méthodes de typage

Méthode	PFGE	FT-IR
FT-IR	0.702	
	(0.560-0.844)	
ATB	0.837	0.650
	(0.696-0.975)	(0.489-0.810)

- Pas de différence significative entre PFGE/IR et PFGE/ATB ($p = 0,140$)
- Indices en faveur d'une :
 - **Correspondance modérée entre PFGE/IR**
 - **Correspondance moindre entre ATB/IR**

Résultats - Concordance

Indice de Wallace Ajusté

Méthode	PFGE	FT-IR	ATB
PFGE		0.781	0.739
		(0,616-0,941)	(0,513-0,945)
FT-IR	0.637		0.528
	(0,431-0,830)		(0,328-0,711)
ATB	0.966	0.845	
	(0,902-1,000)	(0,716-0,981)	

- Deux souches appartenant au même cluster en FT-IR ont 63,7% de chance d'être dans le même cluster en PFGE
- Résultats en faveur d'une **concordance modérée PFGE-IR** et **faible pour IR-ATB**

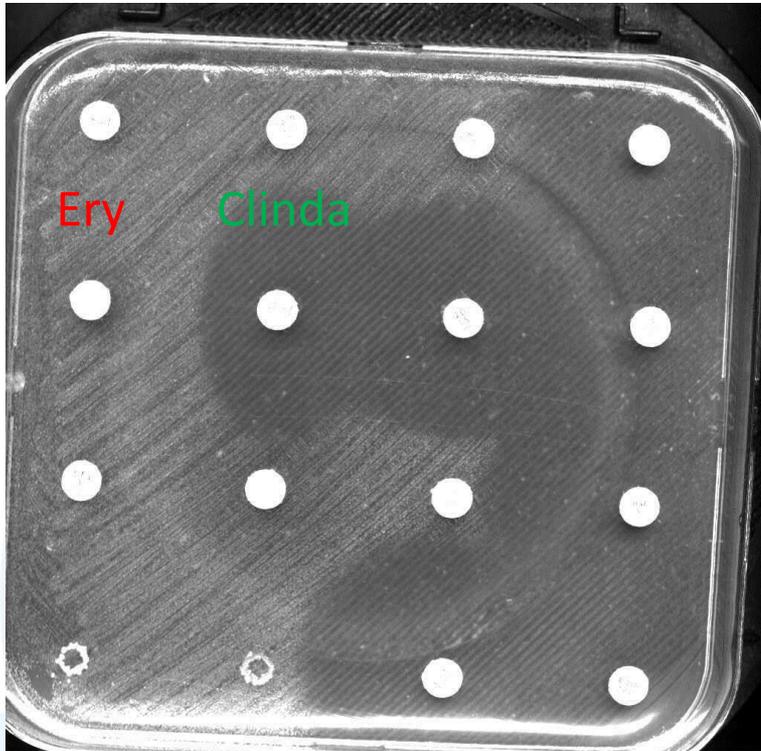
Discussion

Comment expliquer ces différences ?

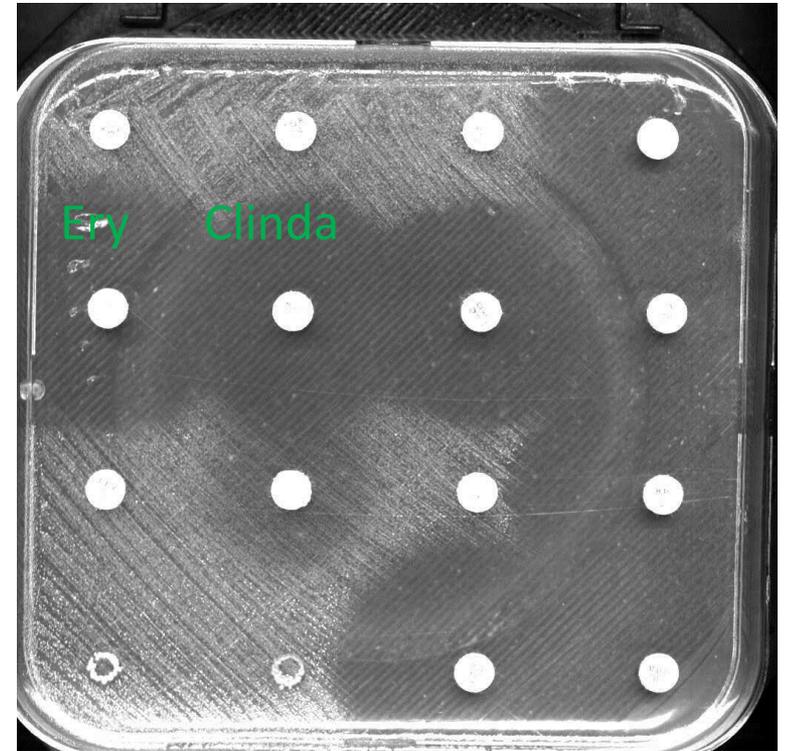
- ❑ Variations avec les **conditions analytiques** (température, hygrométrie)
- ❑ **Modification du spectre IR :**
 - Variation des composants membranaires ?
 - Expression de **morphotypes différents pour la même souche** ? (MH ≠ GS)
 - Formation de biofilm ?
- ❑ Etude « rétrospective »
- ❑ Souches parfois difficiles à mettre en solution (phénotype « collant »)
- ❑ Définition d'une souche :
 - critères de Tenover, seuils arbitraires (80%, 0,15), limites de l'antibiotype

Discussion

Définition d'un antibiotype : combien de différences S/I/R ?



VS



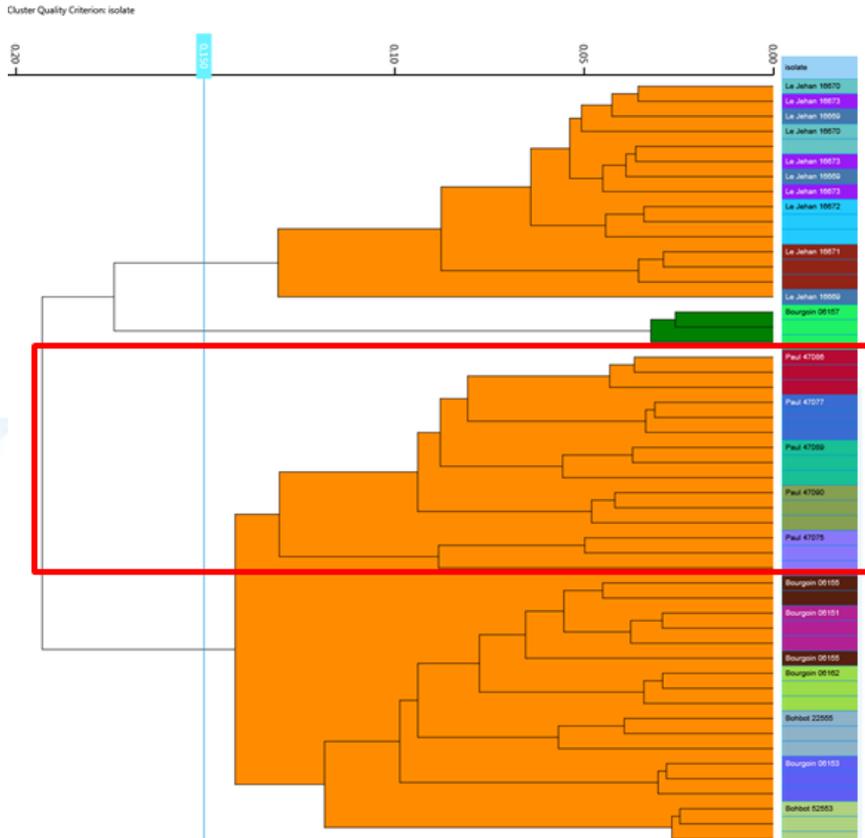
5 souches chez un même patient:

- 4 Erythromycine R
- 1 Erythromycine S

Souches différentes ?

Discussion

Dendrogrammes correspondants

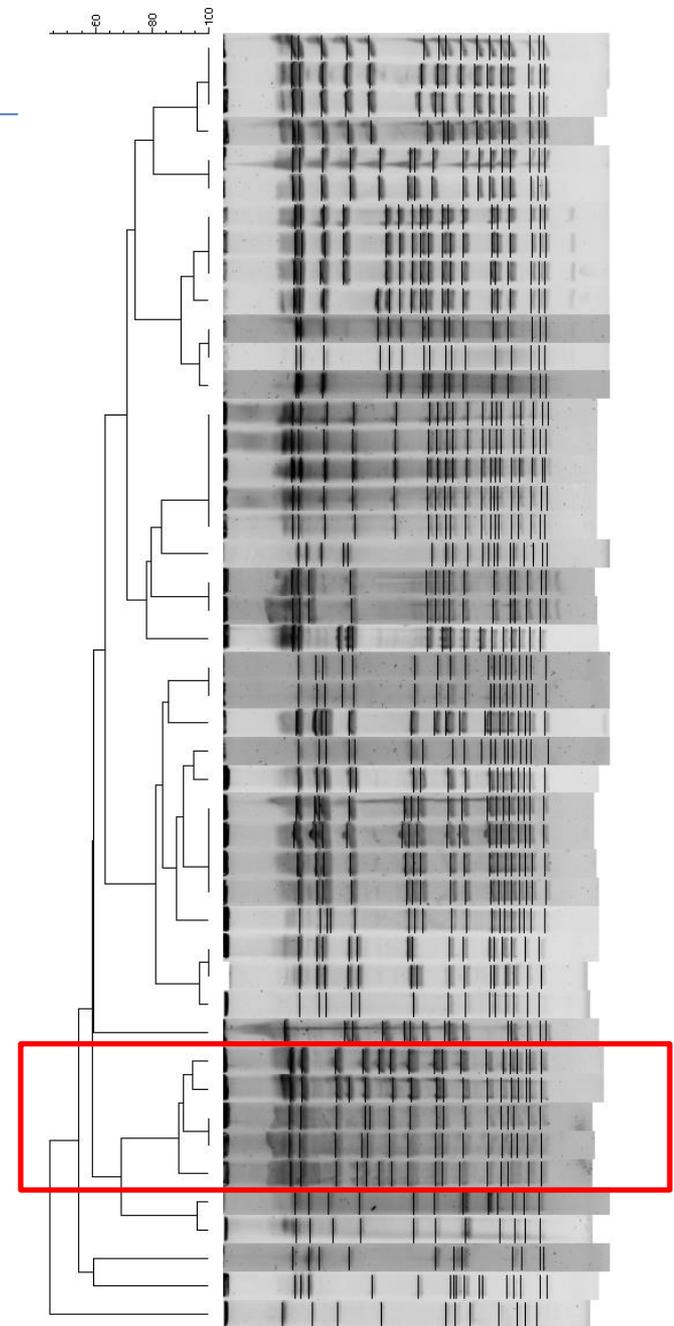


FT-IR (1 run = 24 souches)

5 souches chez un même patient:

- FT-IR (0,15) : 1 cluster
- PFGE (80%) : 1 cluster

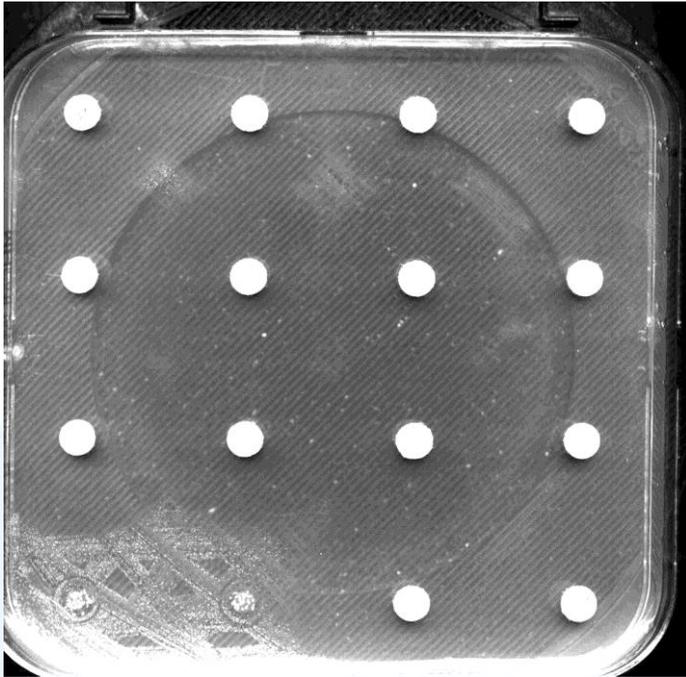
👉 **Mêmes souches !**



PFGE
(toutes les souches du centre 6)

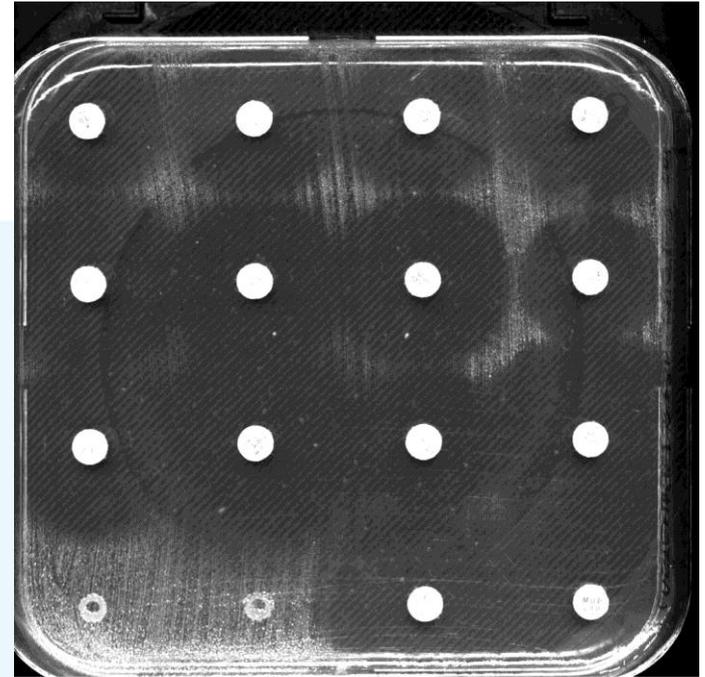
Discussion

Définition d'un antibiotype : limites d'un antibiotype sauvage ?



Souche 1

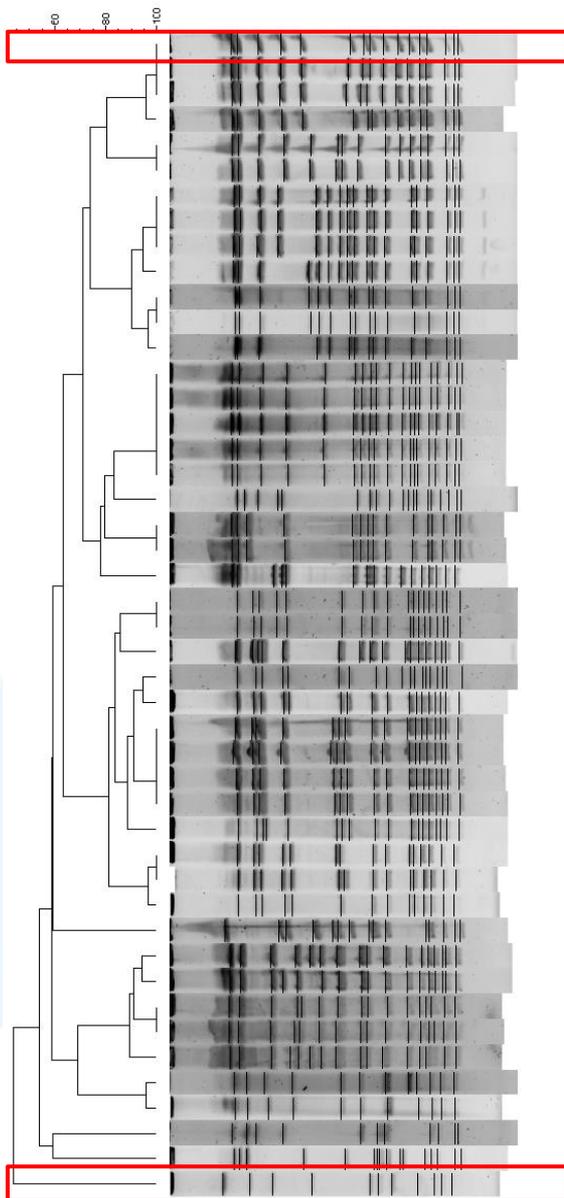
VS



Souche 2

Souches identiques ?

Discussion



Souche 1

☞ Souches dans 2 passages différents en FT-IR

- Même température (21°C)
- Hydrométries différentes (50% vs 27%)

☞ Spectres non comparables

☞ **Souches différentes !**

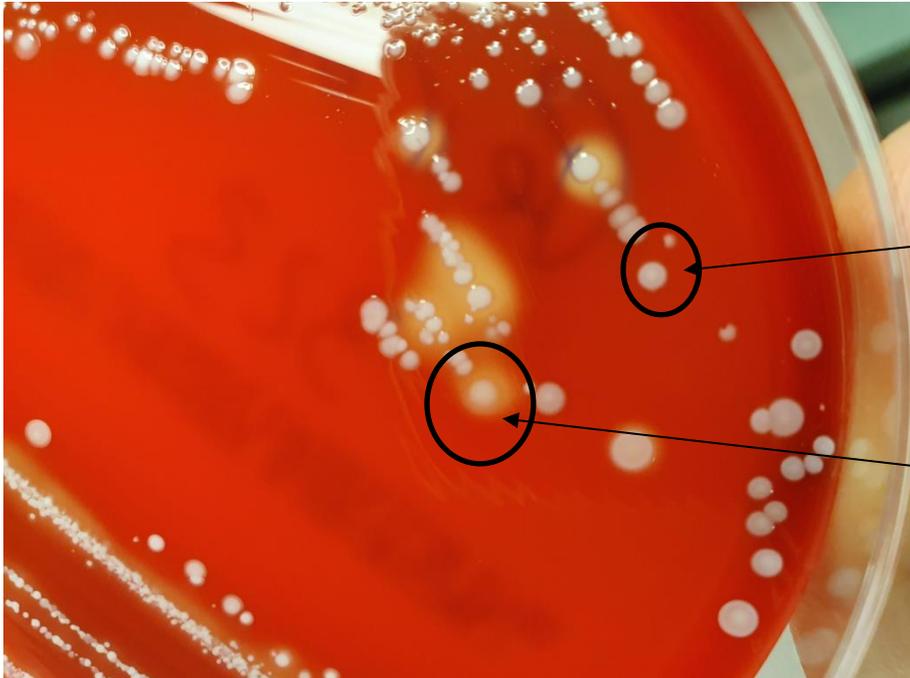
Souche 2

PFGE

(toutes les souches du centre 6)

Discussion

A partir d'une colonie : **2 morphotypes** sur GS



Pas d'hémolyse



β hémolyse



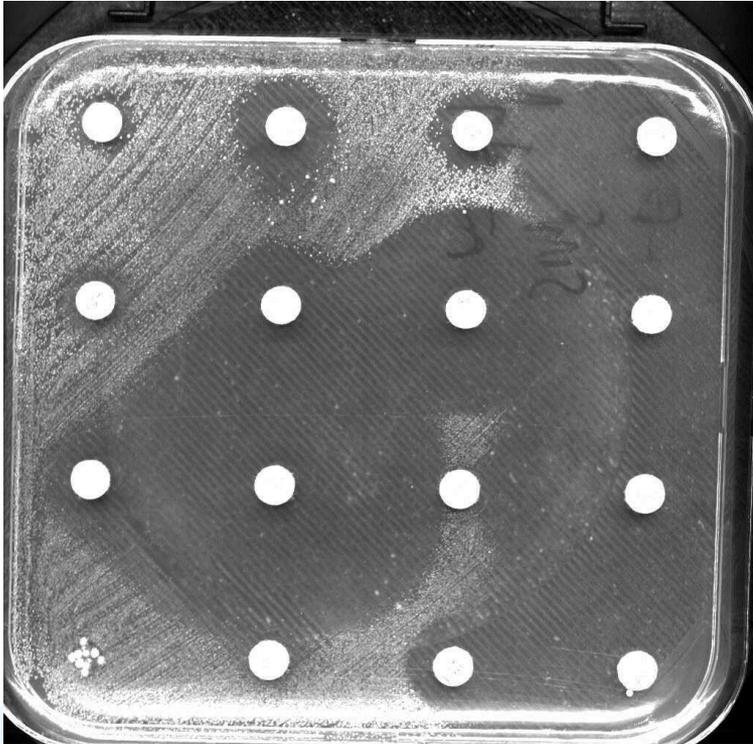
(Pas de différences évidentes sur MH)

Deux souches différentes ?

MAIS...

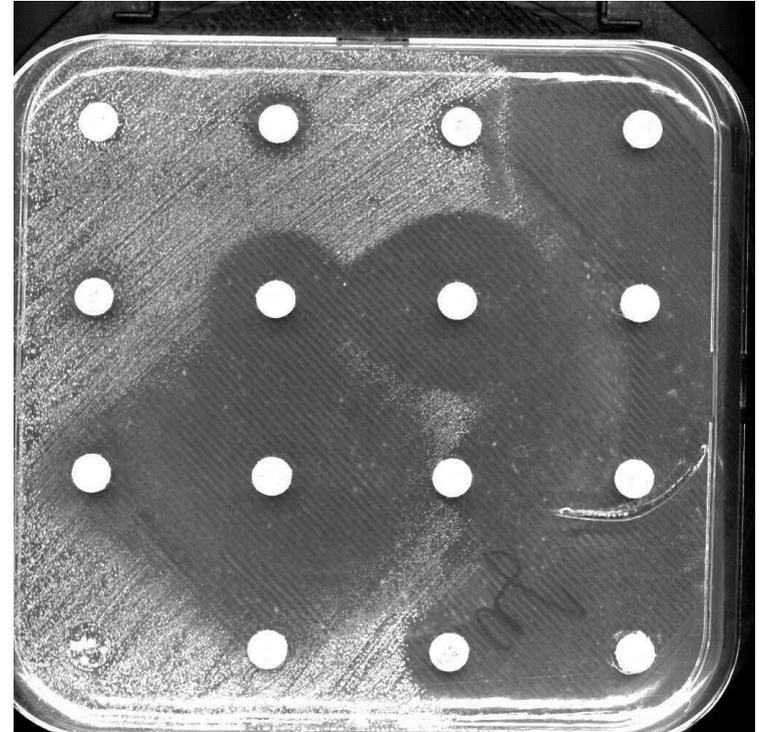
Discussion

Mêmes antibiotypes !



Souche β -hémolytique

VS

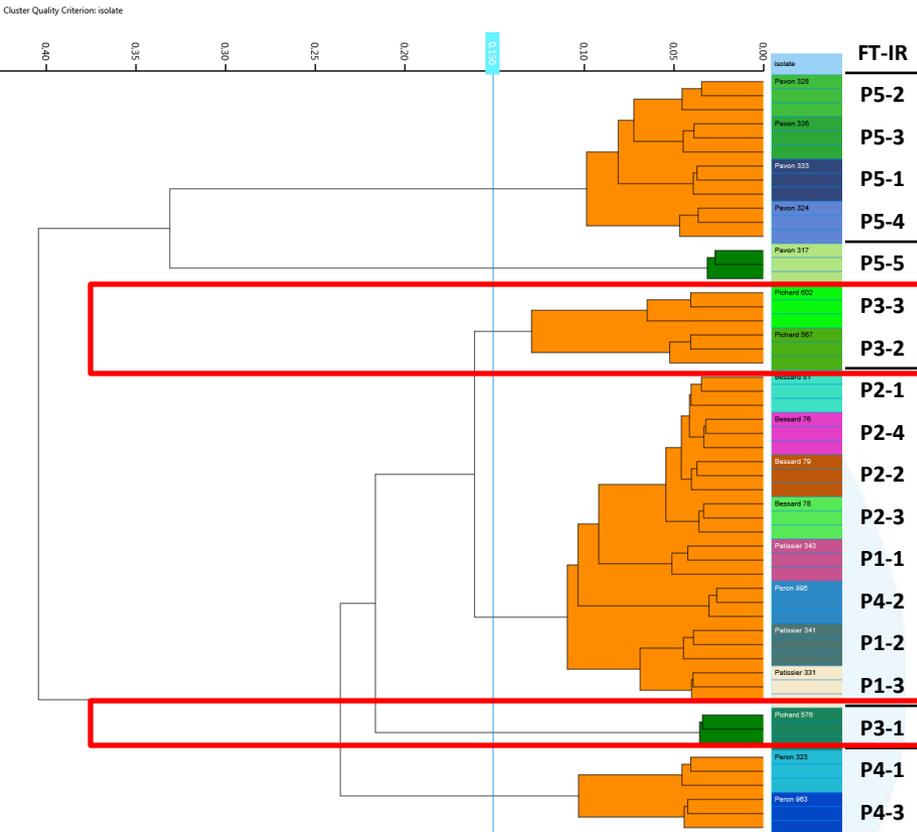


Souche non hémolytique

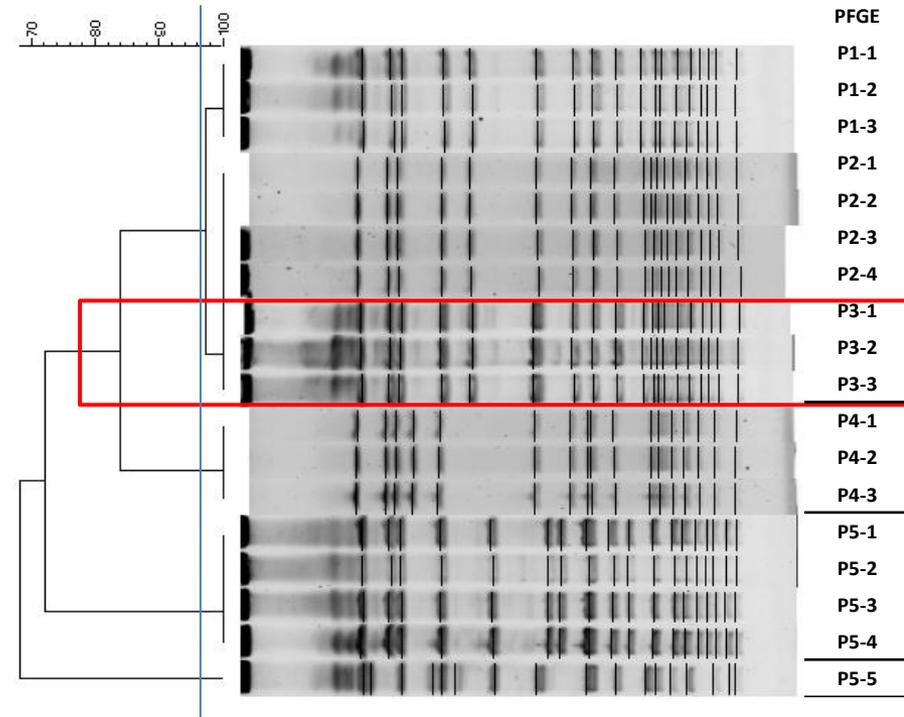
Une seule souche ?

Discussion

Dendrogrammes correspondants (Patient 3, P3)



**FT-IR (0,15) : 2 clusters
pour les 3 souches**



**PFGE (80%) : 1 cluster
pour les 3 souches**

Discussion

Poursuite des investigations

- ❑ Typage de souches en FT-IR, PFGE, ATB en **simultané** ?
- ❑ Autres **protocoles de traitement des souches**
 - Autres milieux de culture
 - Temps d'incubation
 - Directement d'une colonie
- ❑ Autres **méthodes statistiques** pour générer les dendrogrammes (ACP)
- ❑ Revoir les **seuils**
 - Critères de Tenover pour le PFGE
 - Critères pour l'antibiotype
- ❑ **Région du spectre IR** analysée adaptée aux *S. epidermidis* ?

Pour conclure

- ❑ Première étude de typage des *S. epidermidis* par la méthode FT-IR
- ❑ Méthode prometteuse : rapide, peu couteuse
- ❑ Comparaison IR vs PFGE vs ATB en résumé :
 - **Bonne discrimination** des souches avec les 3 méthodes
 - **Correspondance modérée** entre PFGE/IR e ATB/IR
 - **Bonne correspondance PFGE vs ATB**
- ❑ Perspectives :
 - **Nouvel outil pour le diagnostic** des IOA à SCN ?
 - Technique pour le moment non substitutable aux PFGE, ATB
 - Inclure d'avantage de patients

Merci pour votre attention

CHRU
B R E S T

CHRU
BREST



Calcul des indices

Souche 1 →
Souche 2 →
...

	A	B	C	D
1	id.patient	PFGE	IR	ATB
2	PA1	A1.1	A6.1	A1.1
3	PA1	A1.1	A7.1	A1.1
4	PA2	A2.1	A2.1	A2.1
5	PA2	A2.1	A1.1	A2.1
6	PA4	A3.1	A1.1	A3.1
7	PA4	A3.1	A1.1	A3.1
8	PA4	A3.1	A1.1	A3.1
9	PA4	A3.1	A1.1	A3.1
10	PA4	A3.1	A1.1	A3.1

Clusters avec la méthode PFGE ...



Partition B

Class	B_1	B_2	...	B_C	Sums
A_1	n_{11}	n_{12}	...	n_{1C}	$n_{1\bullet}$
A_2	n_{21}	n_{22}	...	n_{2C}	$n_{2\bullet}$
\vdots	\vdots	\vdots	\ddots	\vdots	\vdots
A_C	n_{R1}	n_{R2}	...	n_{RC}	$n_{R\bullet}$
Sums	$n_{\bullet 1}$	$n_{\bullet 2}$...	$n_{\bullet C}$	N

Partition A

Tableaux de contingence méthode par méthode



SID
AR
AW



Partition B

Partition A

Number of pairs	In the same cluster	In different clusters	Sums
In the same cluster	a	b	$a+b$
In different clusters	c	d	$c+d$
Sums	$a+c$	$b+d$	M



"Mismatch matrix" méthode par méthode

Logiciel en ligne : <http://www.comparingpartitions.info/> (UMMI)

Indice de Simpson (SID)

- Mesure de la diversité ou **capacité discriminatoire** d'une méthode de typage
- Probabilité que deux souches soient échantillonnées au hasard dans une population appartenant à deux types différents
 - **SID → 0** : deux souches tirées au hasard appartiennent au **même cluster**
 - **SID → 1** : deux souches tirées au hasard appartiennent à des **clusters différents**

$$SID_A = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{i=1}^S n_i(n_i-1)$$

n_i : nombre de souche par cluster i

N : nombre total de souche

Indice de Rand Ajusté (AR)

- Représente la **congruence globale (similarité)** ou proportion d'accord entre de deux méthodes de typages
- Prend en compte le fait que l'accord entre les clusters peut être le fruit du hasard seul
 - **AR → 0** : les deux méthodes donne des **résultats différents**
 - **AR → 1** : **résultats identiques**

$$\text{Adjusted Rand} = \frac{a+d-n_c}{a+b+c+d-n_c}$$

$$n_c = \frac{N(N^2+1) - (N+1)\sum n_i^2 - (N+1)\sum n_j^2 + \sum \sum \frac{n_{ij}^2}{N}}{2(N-1)}$$

n_i, n_j : nombre de souche du i ème cluster de la méthode A et j ème de la méthode B

N : nombre total de souche

Indice de Wallace Ajusté (AW)

- Représente **l'accord entre deux méthodes** de typages
- Probabilité pour deux souches d'un même cluster avec la méthode A se trouvent également dans un même cluster avec la méthode B
- Prend en compte le fait que l'accord entre les clusters peut être le fruit du hasard seul
 - **AW** $(A \rightarrow B) \rightarrow 0$: deux souches dans un même cluster avec la méthode A seront **dans des clusters différents** avec la méthode B
 - **AW** $(A \rightarrow B) \rightarrow 1$: les deux souches sont dans **un même cluster** avec les deux méthodes

$$AW_{A \rightarrow B} = \frac{W_{A \rightarrow B} - W_{i(A \rightarrow B)}}{1 - W_{i(A \rightarrow B)}}$$

$$W_{A \rightarrow B} = \frac{a}{a+b} \quad W_{B \rightarrow A} = \frac{a}{a+c}$$

Quid de l'FT-IR chez d'autres espèces?

Germe	Méthode	Effectif	Clustering	Cut-off	Concordance	Références
Gram positif						
<i>L. monocytogenes</i>	PCR-serovar	166	ANN	-	Prédiction de 98,8% des sérotypes	Rebuffo-Scheer, 2007
<i>S. aureus</i>	PFGE, spa typing	60	PCA	-	AW FT-IR→PFGE : 0,051 AW PFGE→FT-IR : 0,042	Johler, 2016
<i>S. pneumoniae</i>	Quellung reaction	168	EL	0,2	Kappa : 0,83 (PSV13) Kappa : 0.75 (PSV23)	Burckhardt, 2019
<i>S. pneumoniae</i>	Quellung reaction	112	PCA	-	Prédiction > 99 % des sérotypes	Zimmermann

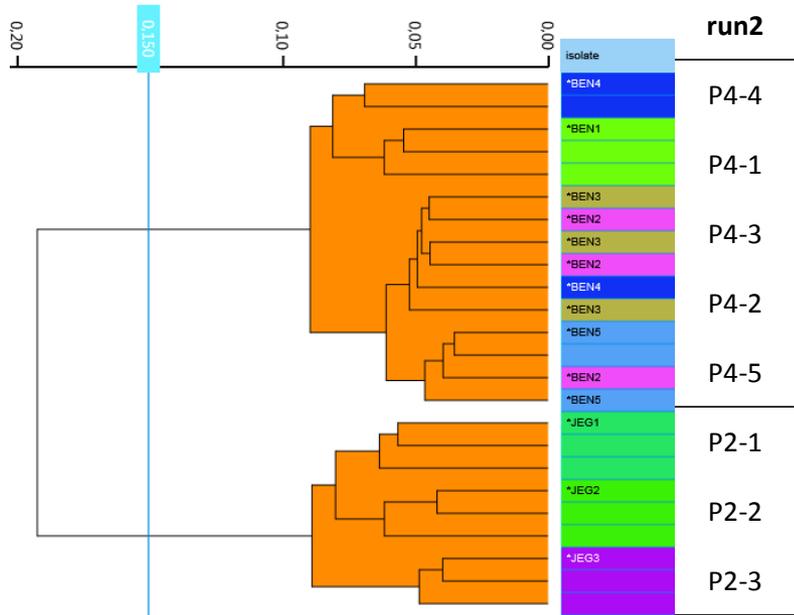
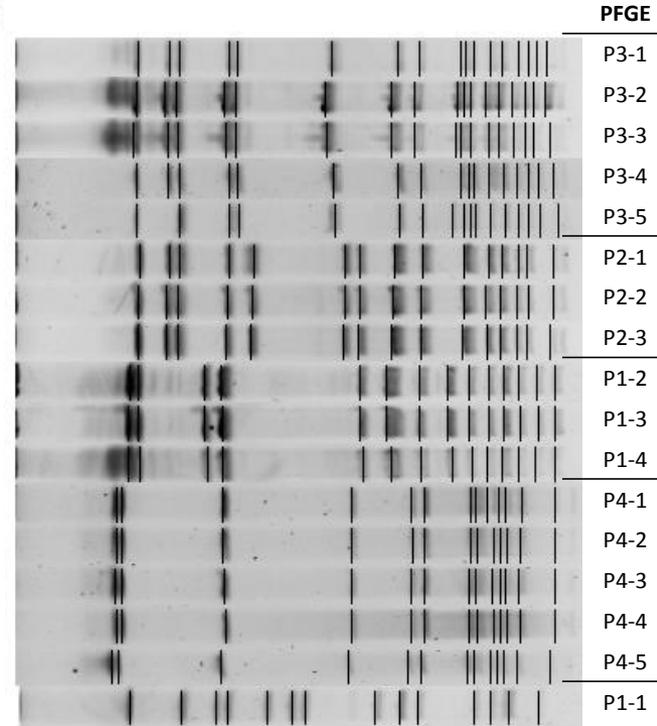
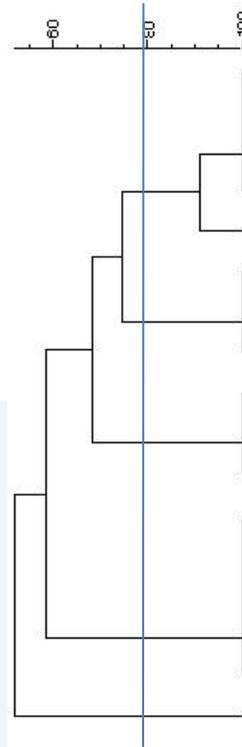
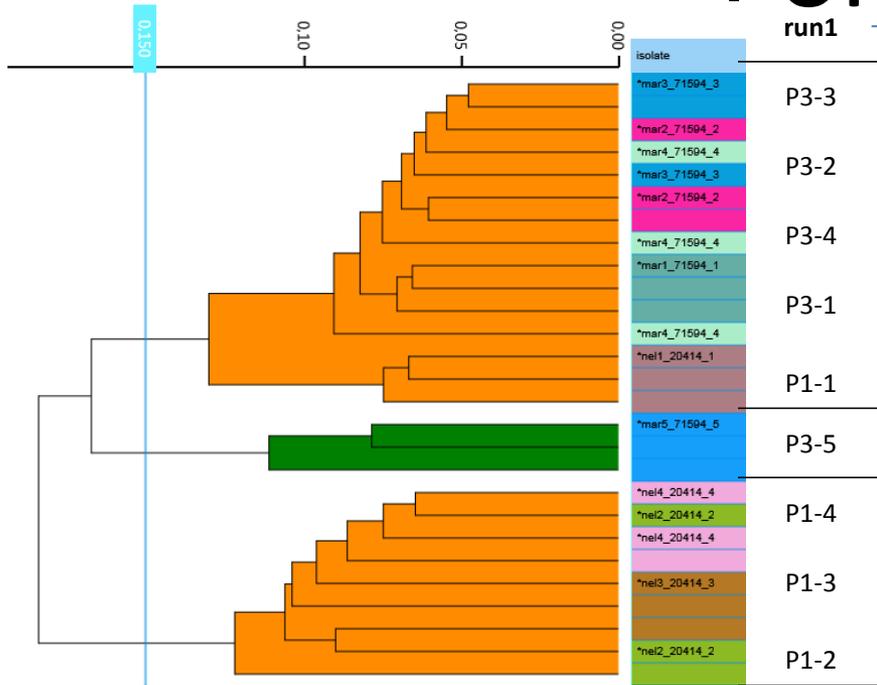
PCA : Principal Component Analysis ; EL : Euclidian distance and average linkage; ANN : Artificial neural network

Quid de l'FT-IR chez d'autres espèces?

Germe	Méthode	Effectif	Clustering	Cut-off	Concordance	Références
Gram négatif						
<i>Yersinia sp.</i>	Biotype (API) Serotype PCR	123	ANN	-	Prédiction de 98,3% des <i>Y. enterocolitica</i> Prédiction de 92,5% des sérotypes	Kuhm, 2009
<i>E. coli</i>	MLST	95	PCA	-	Prédiction de 91,2% souches	Dawson, 2014
<i>K. pneumoniae</i>	Rep-PCR	38	PCA	-	AW FT-IR→PCR : 0,872 AW PCR→FT-IR : 0,895	Dinkelacker 2018
<i>P. aeruginosa</i>	MLST	100	EL	0,184-0,374	AR FT-IR/MLST : 0,936 AW FT-IR→MLST : 1,000 AW MLST→FT-IR : 0,879	Martak, 2019
<i>K. pneumoniae</i>	MLST	16	EL	0,181-0,864	AR FT-IR/MLST : 1,000 AW FT-IR→MLST : 1,000 AW MLST→FT-IR : 1,000	Martak, 2019
<i>E. cloacae</i>	MLST	23	EL	0,159-0,219	AR FT-IR/MLST : 0,963 AW FT-IR→MLST : 1,000 AW MLST→FT-IR : 0,929	Martak, 2019
<i>A. baumannii</i>	MLST	20	EL	0,495-0,530	AR FT-IR/MLST : 0,755 AW FT-IR→MLST : 0,915 AW MLST→FT-IR : 0,642	Martak, 2019

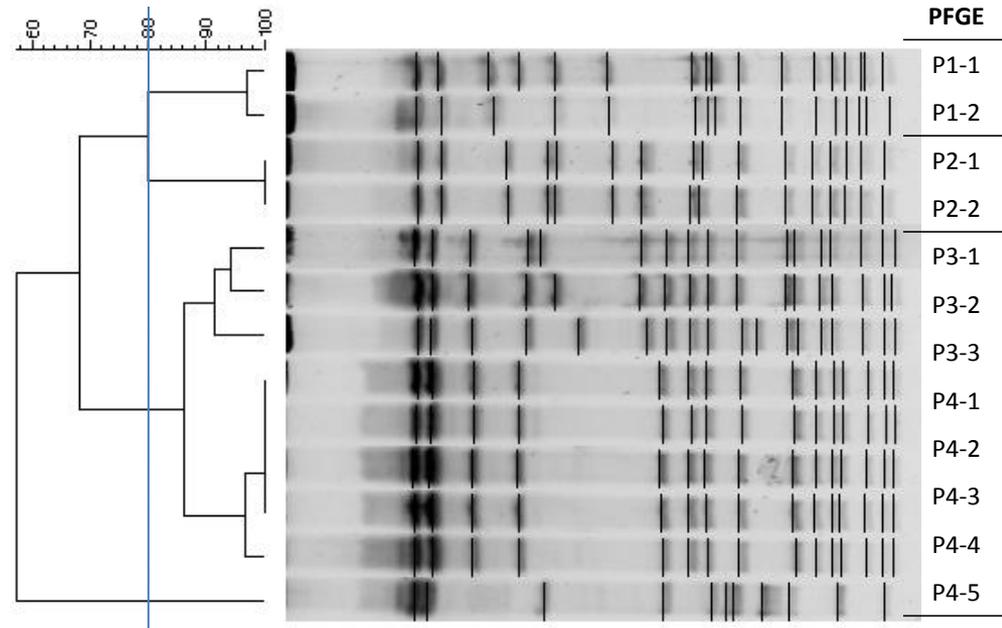
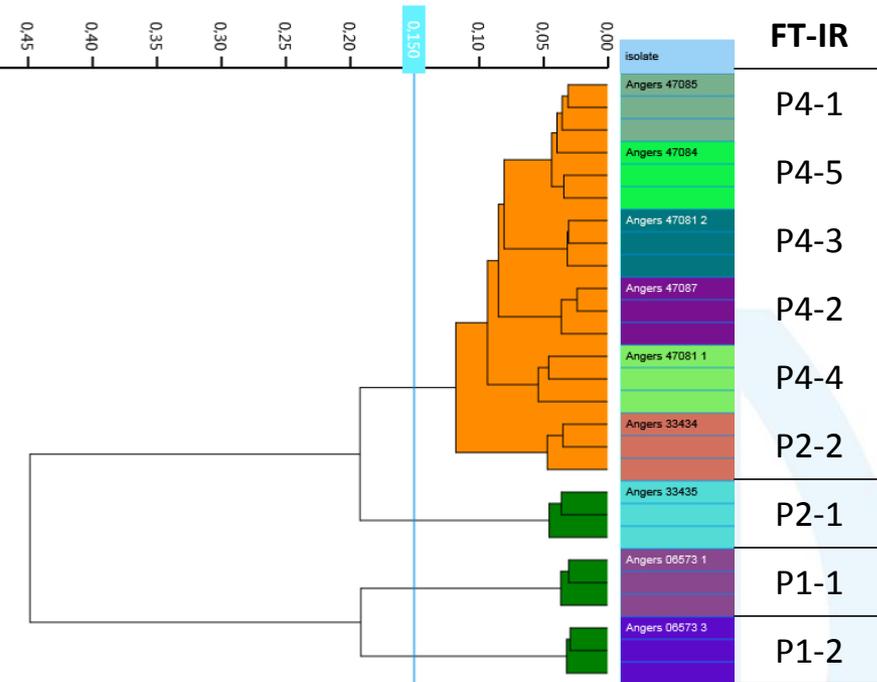
PCA : Principal Component Analysis ; EL : Euclidian distance and average linkage; ANN : Artificial neural network

Poitiers



Angers

Cluster Quality Criterion: isolate



Manque:

P3-1 = cluster seul

P3-2 = cluster seul

P3-3 = avec P4