

IR-TF (Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier) pour typer les épidémies en temps réel

Didier HOCQUET

JNI 21^{es} Journées Nationales d'Infectiologie

Poitiers
et la région Nouvelle Aquitaine
Palais des Congrès du Futuroscope
du mercredi 9 septembre 2020
au vendredi 11 septembre 2020



Déclaration de liens d'intérêt avec les industries de santé en rapport avec le thème de la présentation (loi du 04/03/2002) :

Didier HOCQUET

IRTF pour typer les épidémies en temps réel

L'orateur ne souhaite pas répondre

- Consultant ou membre d'un conseil scientifique
- Conférencier ou auteur/rédacteur rémunéré d'articles ou documents
- Prise en charge de frais de voyage, d'hébergement ou d'inscription à des congrès ou autres manifestations
- Investigateur principal d'une recherche ou d'une étude clinique

OUI NON

OUI NON

OUI NON

OUI NON



Les besoins

- Diffusion des souches épidémiques en milieu hospitalier et environnemental
→ **Problème majeur de santé publique**



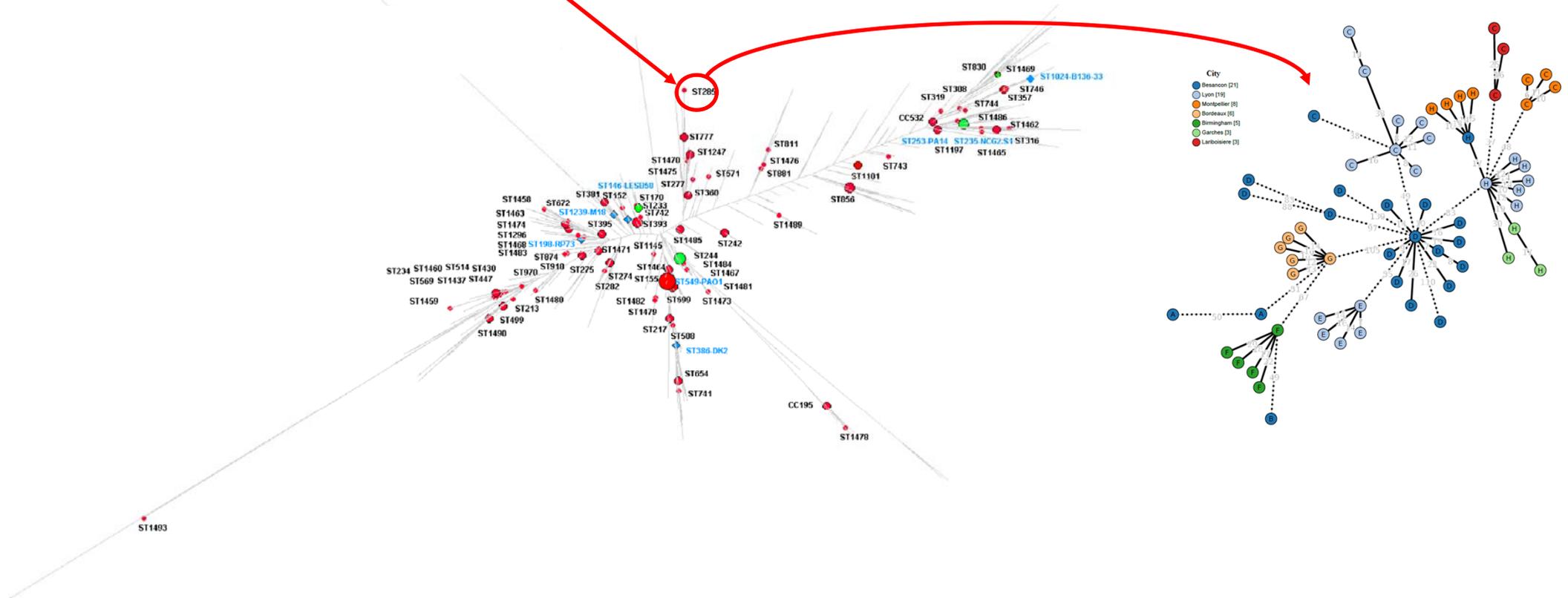
- Rapidement établir des liens entre les isolats et détecter les souches épidémiques
→ **Mesures d'hygiène adaptées**
→ Eviter la **diffusion des pathogènes multirésistants** et **l'échec thérapeutique**
- **Suspicion d'épidémie en clinique**
→ Identification par MALDI-TOF MS puis typage

Si épidémie, que faut-il détecter ?

Espèce bactérienne

Clone bactérien (ST)

Souche épidémique locale



Méthodes de typage disponibles

Type	Méthode	Espèces	Pouvoir discriminant	Typabilité	Reproductibilité	Intensité de travail	Temps (jours)	Coût	Automation	
Phéno	Sérotypage	G+/G-	Orange	+++	+++	Red	2-7	Light Pink	Non	
Géno	Amplification et/ou restriction	PFGE	G+/G-	Orange	++++	+++	Red	3-5	Yellow	Non
		PCR-RFLP	BK	Orange	+++	++++	Light Pink	1-5	Light Pink	Semi (Riboprinter – Hygiena)
		PCR-ribotypage	<i>C. Difficile</i>	Orange	+++	+++	Light Pink	1-2	Light Pink	Semi (Riboprinter – Hygiena)
		AFLP	G+/G-	Light Pink	+++	+++	Light Pink	1-2	Light Pink	Non
		Rep-PCR	G+/G-	Red	+++	++	Yellow	1-2	Light Pink	Semi (Diversilab - bioMérieux)
		DNA microarray	G+/G-	Orange	+++	++++	Light Pink	1-2	Red	Semi (Xmap – Bio-Rad)
	Séquençage	Gène cible	G+/G-	Light Pink	++++	++++	Light Green	1-5	Yellow	Non
		MLST	G+/G-	Light Pink	++++	++++	Yellow	1-5	Yellow	Non
		MLVA	G+/G-	Orange	+++	+++	Light Green	2-3	Yellow	Non
		CRISPR typing	BK, <i>Salmonella</i>	Orange	+++	++++	Yellow	1-2	Yellow	Non
		WGS	G+/G-	Light Green	++++	++++	Light Pink	1-30	Red	Non
		IR-TF ???								
Spectro	MALDI-TOF	G+/G-	Light Pink	+++	+++	Light Green	1	Light Green	Semi (Biotyper – Bruker ; Vitek – BioMérieux)	
	Raman	G+/G-	Red	++	++	Light Green	1-2	Light Green	Semi (Spectracell – River Diagnostic)	

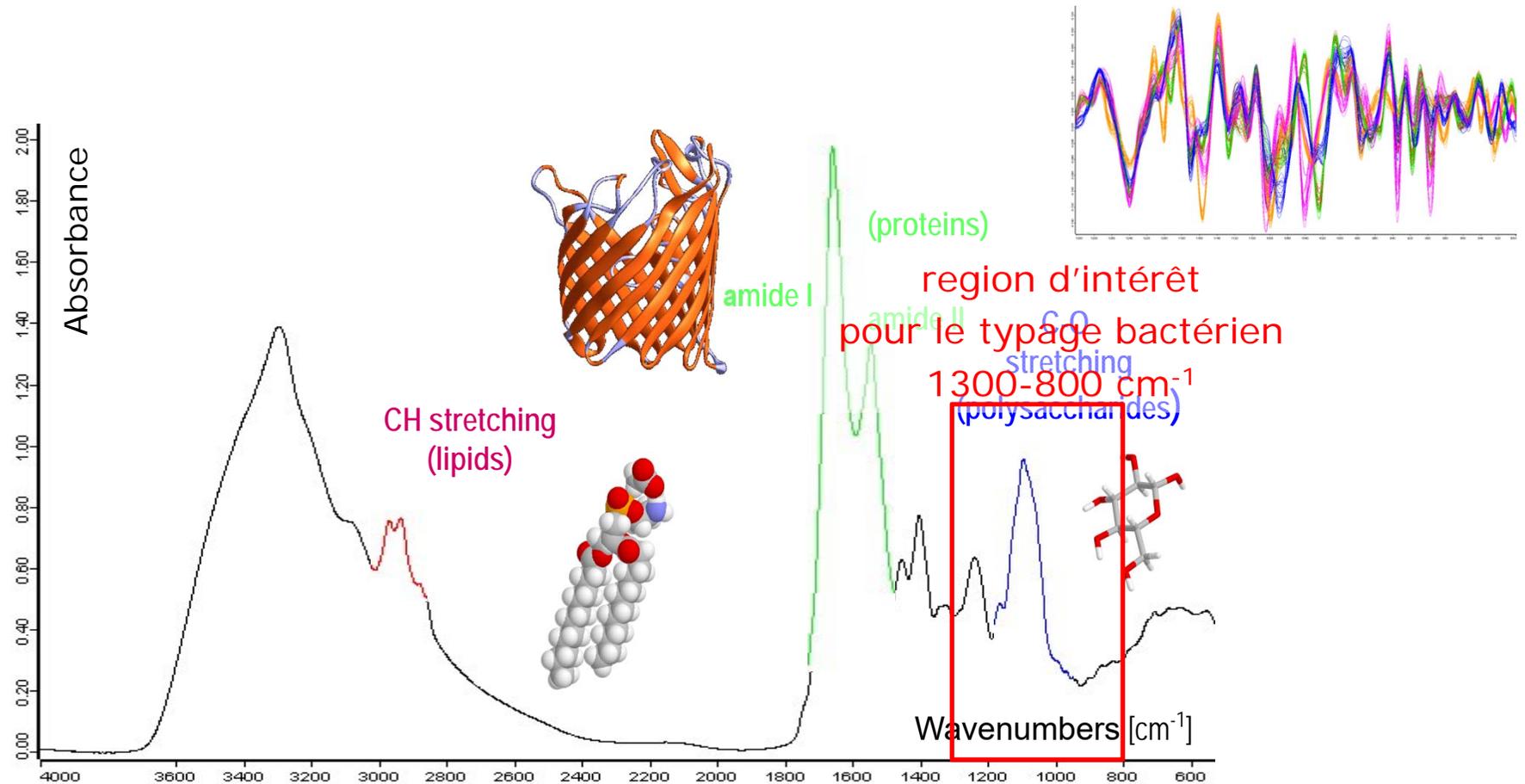
d'après Novais *et al.* EJCMIID 2019;38:427-48

Méthodes de typage disponibles

Type	Méthode	Espèces	Pouvoir discriminant	Typabilité	Reproductibilité	Intensité de travail	Temps (jours)	Coût	Automation	
Phéno	Sérotypage	G+/G-		+++	+++		2-7		Non	
Géno	Amplification et/ou restriction	PFGE	G+/G-		++++	+++			Non	
		PCR-RFLP	BK	+++	++++		1-5		Semi (Riboprinter – Hygiena)	
		PCR-ribotypage	<i>C. Difficile</i>	+++	+++		1-2		Semi (Riboprinter – Hygiena)	
		AFLP	G+/G-	+++	+++		1-2		Non	
		Rep-PCR	G+/G-	+++	++		1-2		Semi (Diversilab - bioMérieux)	
		DNA microarray	G+/G-	+++	++++		1-2		Semi (Xmap – Bio-Rad)	
		Gène cible	G+/G-	++++	++++		1-5		Non	
	Séquençage	MLST	G+/G-		++++	++++				Non
		MLVA	G+/G-		+++	+++		2-3		Non
		CRISPR typing	BK, <i>Salmonella</i>		+++	++++		1-2		Non
	WGS	G+/G-		++++	++++				Non	
Spectro	MALDI-TOF	G+/G-		+++	+++		1		Semi (Biotyper – Bruker ; Vitek – BioMérieux)	
	Raman	G+/G-		++	++		1-2		Semi (Spectracell – River Diagnostic)	
	IR-TF ???									

d'après Novais *et al.* EJCMID 2019;38:427-48

Le spectre IR-TF d'un microorganisme



La sélectivité de la technique IR-TF est très élevée, permettant la différenciation de microorganismes appartenant à des groupes proches

La typabilité des clones dépend de leur différence de composition membranaire des polysaccharides

Objectifs

- Evaluer la capacité du IR-TF à reconnaître des clones de BGN responsables d'épidémies hospitalières.
- Comparer les résultats obtenus par IR-TF à ceux de 2 techniques de référence (MLST et PFGE)

Matériel et méthodes

- Isolats bactériens
 - *Pseudomonas aeruginosa* (n=100)
 - *Klebsiella pneumoniae* (n=16)
 - *Enterobacter cloacae* (n=23)
 - *Acinetobacter baumannii* (n=20)
- Typage par IR-TF avec l'IR-Biotyper (Bruker Optics-Daltonics GmbH)
- MLST : Tous les isolats
- PFGE : 80 isolats de *P. aeruginosa*



Daniel Martak



Matériel et méthodes

Prélèvement

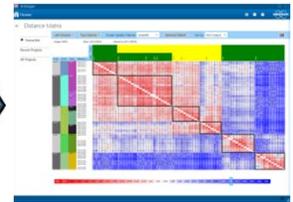
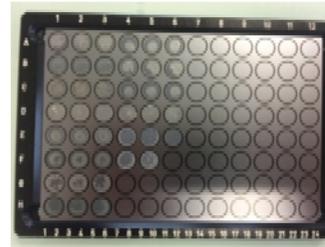
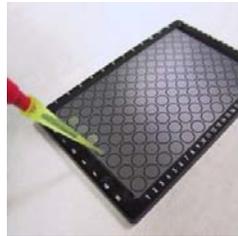
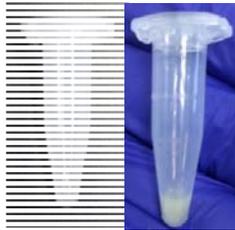
Suspension

Dépôt

Séchage

Lecture

Analyse



Transfert de culture pure dans un tube contenant 50 μ L d'éthanol à 70%

Ajout de 50 μ L d' H_2O
Préparation d'une suspension homogène

Dépôt des échantillons en triplicat

Séchage à 37°C pendant 20 à 30 min

Mesure IR-TF spectromètre (approx. 55 sec. par spot)

Analyse informatique de spectres via des dendrogrammes ou des matrices de distance

Résultats – Comparaison IR-TF / MLST

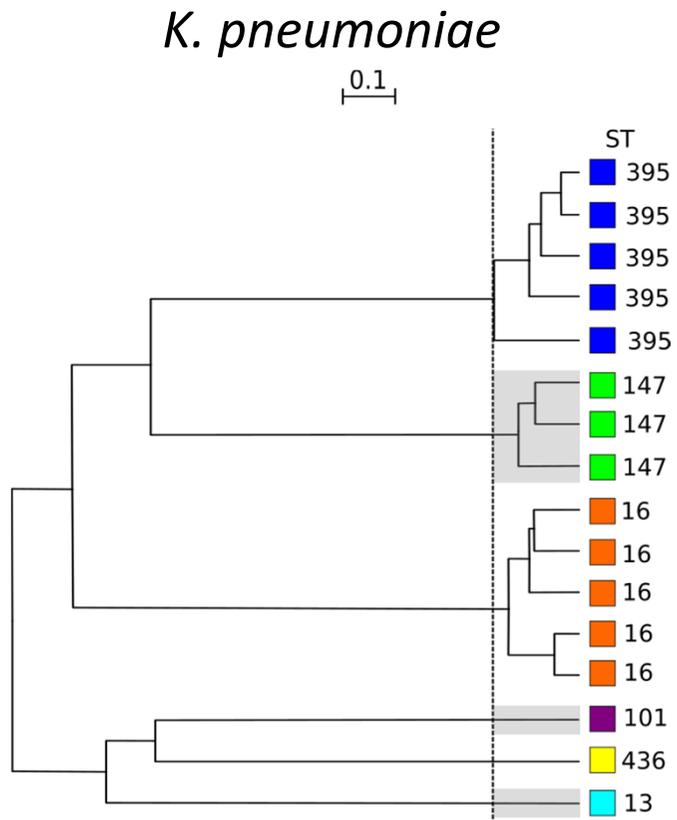


Fig 1 : Dendrogramme obtenu par typage IR-TF de 16 isolats de *K. pneumoniae*.
Méthode de création des clusters : Euclidian average linkage.

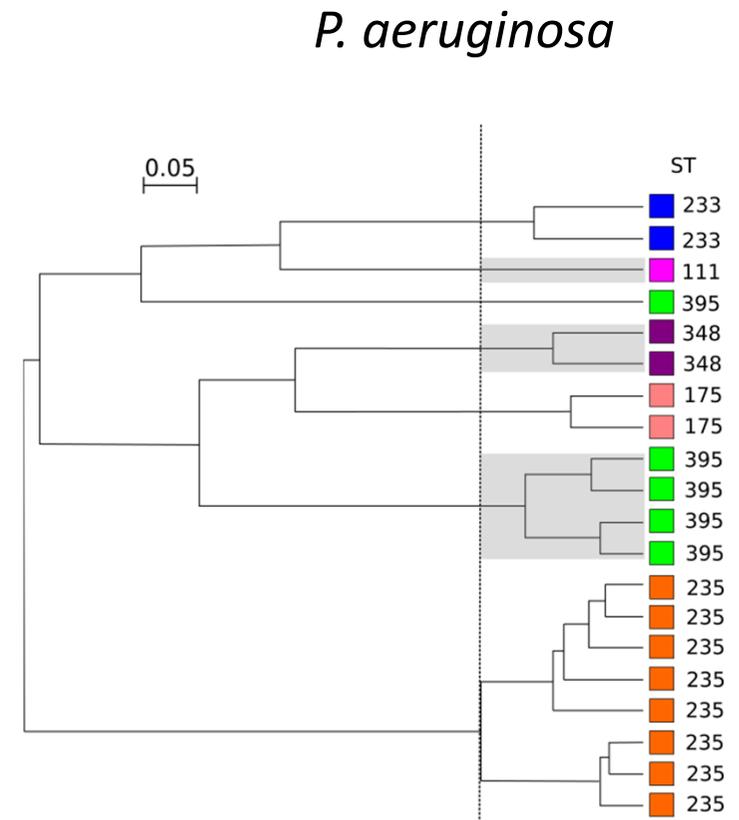


Fig 2 : Dendrogramme obtenu par typage IR-TF de 20 isolats de *P. aeruginosa*.
Méthode de création des clusters : Euclidian average linkage.

Résultats - Comparaison IR-TF / MLST

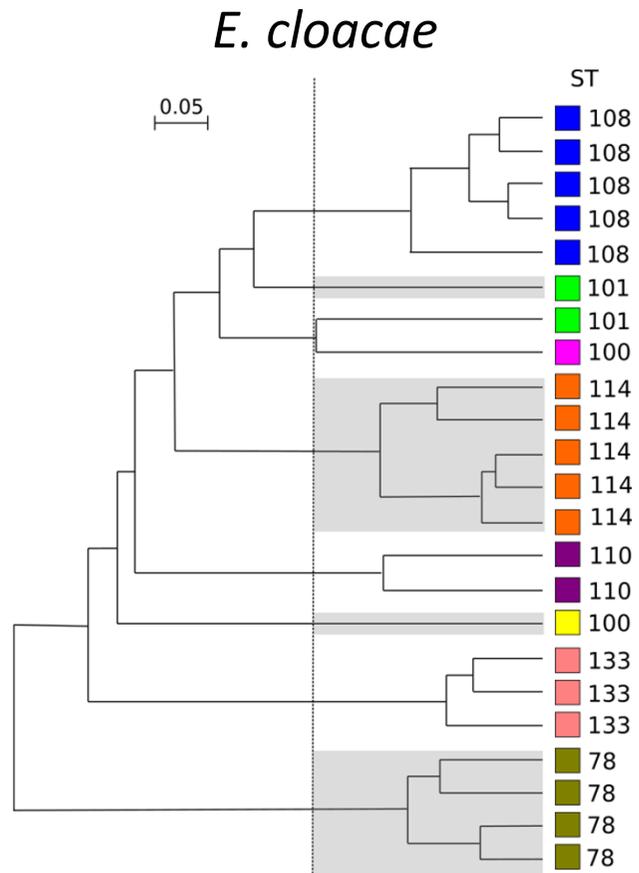


Fig 3 : Dendrogramme obtenu par typage IR-TF de 23 isolats de *E. cloacae*. Méthode de création des clusters : Euclidian average linkage.

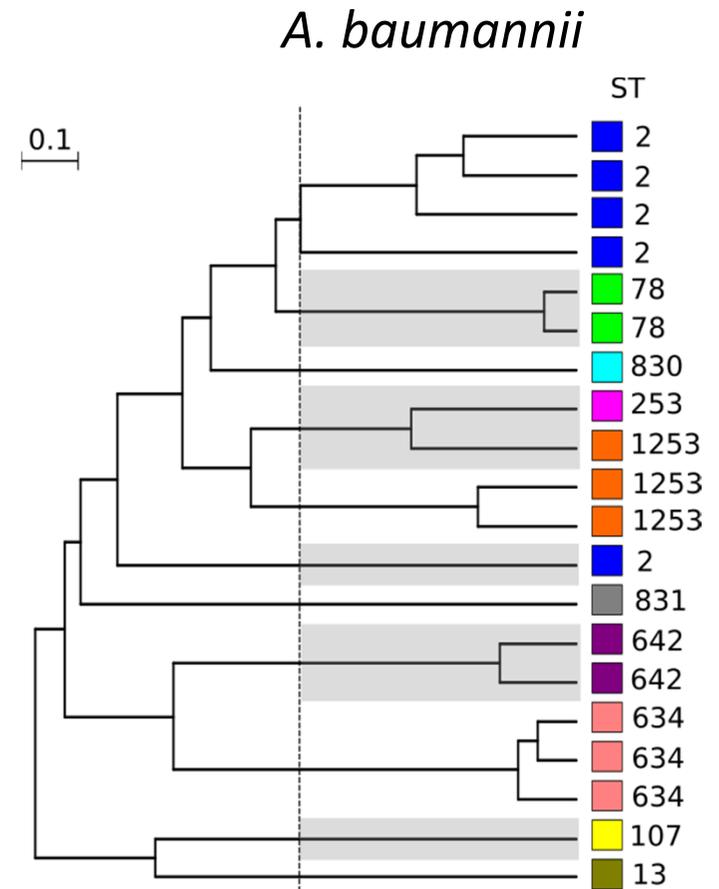


Fig 4 : Dendrogramme obtenu par typage IR-TF de 20 isolats de *A. baumannii*. Méthode de création des clusters : Euclidian average linkage.

Résultats - Comparaison IR-TF / MLST

Species	Adjusted Rand	Typing method	Adjusted Wallace coefficients (95% CI) when compared with	
			FTIR	MLST
<i>P. aeruginosa</i>	0.936	FTIR		1.000 (1.000-1.000)
		MLST	0.879 (0.735-1.000)	
<i>K. pneumoniae</i>	1	FTIR		1.000 (1.000-1.000)
		MLST	1.000 (1.000-1.000)	
<i>E. cloacae</i>	0.946	FTIR		1.000 (1.000-1.000)
		MLST	0.929 (0.878-0.979)	
<i>A. baumannii</i>	0.755	FTIR		0.915 (0.830-1.000)
		MLST	0.642 (0.338-0.947)	

Tableau 1 : Adjusted Rand Index (ARI) et Adjusted Wallace Index (AWI) pour les différentes espèces bactériennes testées.

→ IR-TF différencie les STs

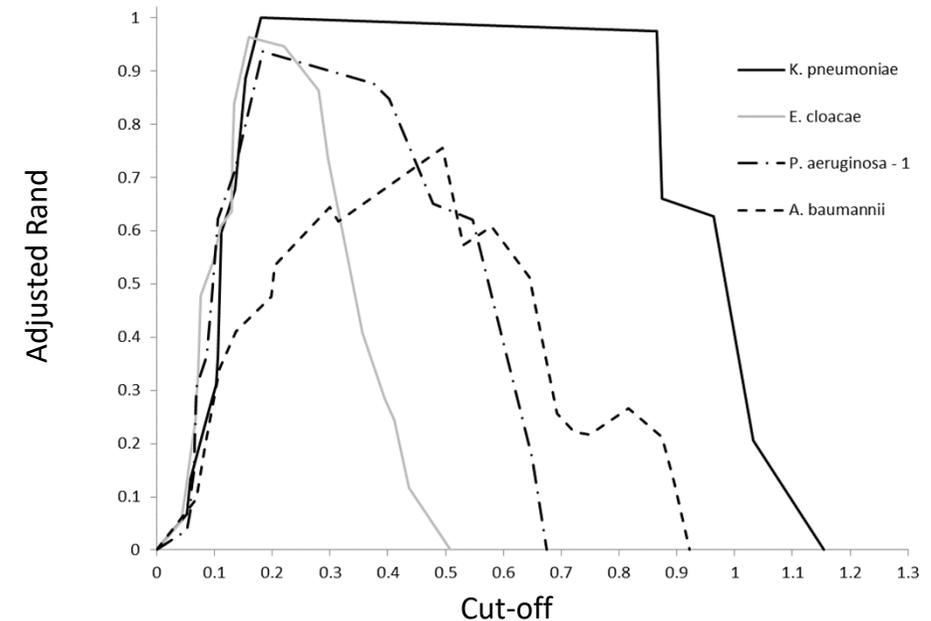
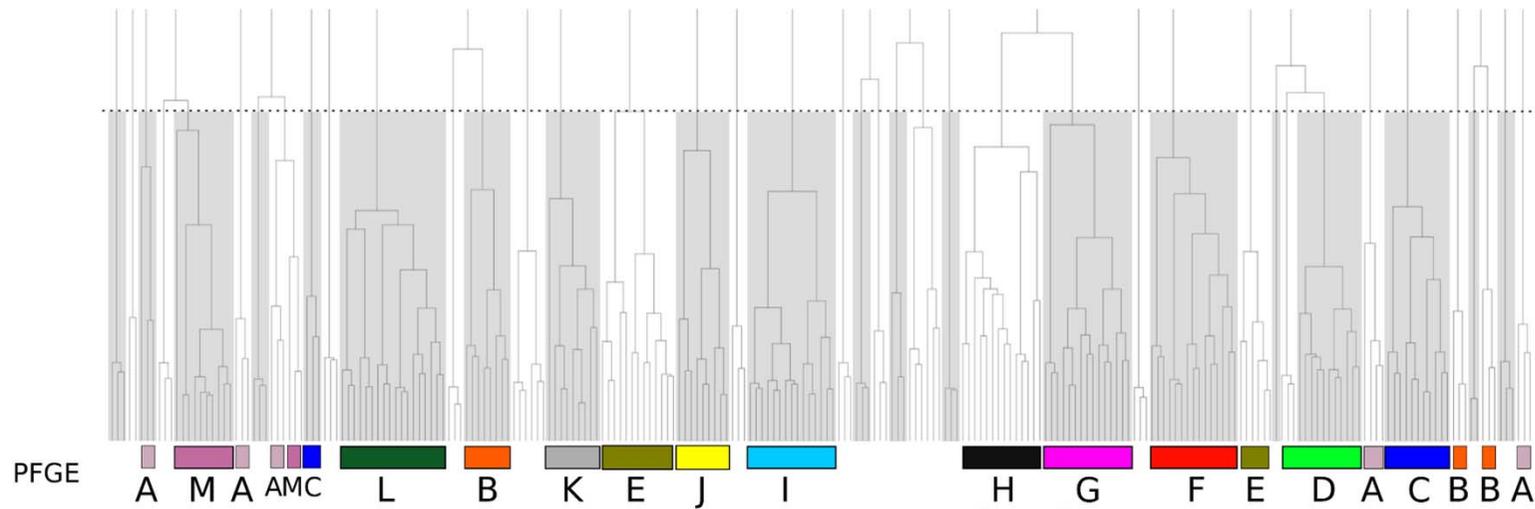


Figure 5 : Adjusted Rand index (ARI) en fonction des différents cut-off. ARI calculé en comparant FTIR et MLST.

Résultats - Comparaison IR-TF / PFGE



Pulsotype	Jours							
	J1	J2	J3	J4	J8	J9	J10	J11
A		■				■	■	■
B	■		■		■	■		■
C	■	■	■			■		■
D	■		■	■	■			
E					■	■	■	■
F	■			■	■	■		
G				■	■		■	■
H			■	■	■		■	
I		■	■				■	■
J		■		■		■		
K		■		■				■
L	■	■	■			■	■	
M	■	■		■		■		

Figure 6 : Dendrogramme obtenu par typage FTIR de 80 isolats de *P. aeruginosa*. Méthode de création des clusters : Euclidian average linkage.

Pulsotype A totalement éclaté, pulsotype B : 2 isolats mal classés

Pulsotypes complètement reconstitués

Résultats - Comparaison IR-TF / PFGE

Typing method (reference)	Adjusted Wallace coefficients (95% CI) when compared with	
	IRBT	PFGE
IRBT		0.965 (0.944 - 0.985)
PFGE	0.719 (0.629-0.808)	

Tableau 2 : Adjusted Wallace Index (AWI) calculés en comparant le typage IR-TF et PFGE de 80 isolats de *P. aeruginosa*.

→ IR-TF différencie les différents pulsotypes et classe les isolats épidémiques ensembles

IR-TF discrimine clones *Kp* définis par WGS (Dinkelacker, JCM 2018)
IR-TF reconnaît les K-types de *Kp* (Rodrigues, mSystems 2020)
IR-TF aide à gestion d'épidémie *Kp* ST147 KPC-3 (Silva, EJCMID 2020)

IR-TF reconnaît ST *Ab* (Sousa, J Photochem Photobiol B Biol 2014)

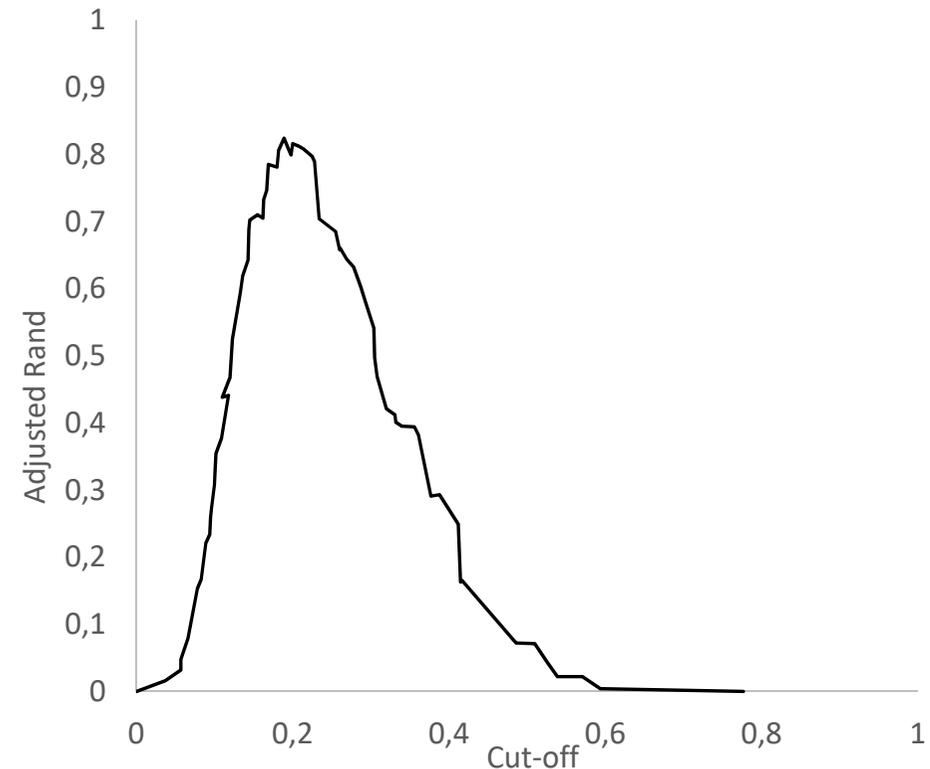


Figure 7 : ARI en fonction des différents cut-off. ARI obtenu par comparaison des résultats de typage obtenus pour 80 isolats de *P. aeruginosa* en FTIR et PFGE.

Les autres Gram négatifs

- *E. coli*
 - IR-TF reconnaît O:157 dans matrice alimentaire (Davies, Food Microbiol 2012)
 - IR-TF différencie 8 UPEC, distingue ST131 et ses sous-types (Novais, *unpubl.*)
- *Salmonella enterica*
 - IR-TF discrimine les sérogroupes B, C1, C2, C3, D1 mais pas/mal les sérotypes (Preisner, Food Res Int 2012)
 - IR-TF discrimine sérogroupes B, C, D, E et sérotypes S. Rissen, S. Enteritidis, S. Sentenberg (Campos, Int J Food Microbiol 2018)

Les Gram positifs

- *S. aureus*
 - Reconnaît les sérotypes capsulaires 5 et 8 (Grunert, JCM 2013)
 - Comparable à *spa*-typing et PFGE (Johler, Syst App Microbiol 2016)
- *S. pneumoniae*
 - Excellente concordance IR-TF/sérototype (Burckhardt, IJMM 2019)
- *E. faecium*
 - Pas au point

Conclusions

- Intérêt en clinique (mais aussi en agroalimentaire)
- IR-TF détecte rapidement les clones épidémiques
 - Rapide (<3h)
 - Abordable (~ 10 €/isolats + Machine)
 - Série possible (31 isolats en triplicat/plaque)
 - Au laboratoire : SM MALDI-TOF → IR-TF
- La suite
 - Corréler WGS et spectre IR-TF sur un grand nombre d'isolats d'une espèce
 - Définir des *cut-off* adaptés aux épidémies
 - Standardisation des méthodes, des instruments (IR-Biotyper, Bruker 2016)

Méthodes de typage disponibles

Type	Méthode	Espèces	Pouvoir discriminant	Typabilité	Reproductibilité	Intensité de travail	Temps (jours)	Coût	Automation	
Phéno	Sérotypage	G+/G-		+++	+++		2-7		Non	
Géno	Amplification et/ou restriction	PFGE	G+/G-		++++	+++			Non	
		PCR-RFLP	BK		+++	++++		1-5	Semi (Riboprinter – Hygiena)	
		PCR-ribotypage	<i>C. Difficile</i>		+++	+++		1-2	Semi (Riboprinter – Hygiena)	
		AFLP	G+/G-		+++	+++		1-2	Non	
		Rep-PCR	G+/G-		+++	++		1-2	Semi (Diversilab - bioMérieux)	
		DNA microarray	G+/G-		+++	++++		1-2	Semi (Xmap – Bio-Rad)	
		Gène cible	G+/G-		++++	++++		1-5	Non	
	Séquençage	MLST	G+/G-		++++	++++				Non
		MLVA	G+/G-		+++	+++		2-3	Non	
		CRISPR typing	BK, <i>Salmonella</i>		+++	++++		1-2	Non	
	WGS	G+/G-		++++	++++				Non	
Spectro	MALDI-TOF	G+/G-		+++	+++		1		Semi (Biotyper – Bruker ; Vitek – BioMérieux)	
	Raman	G+/G-		++	++		1-2		Semi (Spectracell – River Diagnostic)	
	IR-TF	G+/G-		++++	+++		1		IR-Biotyper (Bruker)	

d'après Novais *et al.* EJCMIID 2019;38:427-48