APPLICAZIONE DELLA SPETTROSCOPIA INFRAROSSA IN TRASFORMATA DI FOURIER (FT-IR) PER LA DISCRIMINAZIONE DEI SIEROTIPI DI STREPTOCOCCUS SUIS

F.R. Massacci[2], M. Cordovana[1], L. Cucco[2], E. Albini[2], F. Piersanti[2], P. Leo[1], A. Baldaccini[1], A. Luppi[3], D. Vio[4], M. Paniccià[2], G. Pezzotti[2], C.F. Magistrali[3]

[1] BRUKER DALTONICS GMBH AND CO. KG, BREMEN, GERMANY
[2] *ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE "TOGO ROSATI", PERUGIA, ITALY*
[3] *ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA "BRUNO UBERTINI«, BRESCIA, ITALY*
[4] *ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLE VENEZIE, LEGNARO, ITALY*

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'UMBRIA E DELLE MARCHE "TOGO ROSATI"

INTRODUZIONE

- *S. suis* è un importante patogeno nei suini ed è considerato un agente zoonotico emergente [1].
- Tra i 29 sierotipi riconosciuti, la maggior parte dei casi di malattia del suino in Italia sono causati dai sierotipi 9 e 1/2 [2].
- L'identificazione del sierotipo è rilevante per valutare le capacità patogenetiche e zoonosiche di un isolato ed è un prerequisito nella scelta del vaccino.
- La spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier (FT-IR) è stata impiegata con successo nella gestione di focolai nosocomiali e nella sorveglianza routinaria delle correlazioni clonali tra isolati batterici [3,4].

OBIETTIVI

Valutare l'applicabilità dell'IR Biotyper, per la discriminazione dei ceppi di *S. suis* in base al sierotipo di appartenenza

MATERIALI E METODI

- Sono stati analizzati di 94 ceppi di *S. suis*, appartenenti a 13 sierotipi nel periodo 2017 - 2022 (Tabella 1).
- L'analisi FTIR è stata eseguita mediante il sistema IR Biotyper®, secondo le istruzioni del produttore.
- Gli spettri sono stati acquisiti nell'intero intervallo del medio infrarosso (4000–500 cm^{-1}) e la regione spettrale 1300–800 cm^{-1} è stata utilizzata per l'analisi di similarità mediante analisi gerarchica dei cluster (HCA), analisi delle componenti principali (PCA) e analisi discriminante lineare (LDA).
- Tre differenti algoritmi di machine learning (linear SVM, RBF SVM e ANN) sono stati utilizzati per sviluppare il classificatore per la differenziazione di *S. suis* a livello di sierotipo.

Tabella 1: Organo di isolamento e sierotipo dei ceppi analizzati nello studio.

	Sierotipo													
Organo di isolamento	**1**	**2**	**4**	**5**	**7**	**8**	**9**	**10**	**15**	**19**	**23**	**1/14**	**1/2**	**Totale**
Articolazione	1						1					1	1	4
Cervello	1	6	2		3	2	30	6	1		2	1	9	63
Cuore													1	1
Fegato		2					1							3
Milza							3							3
Pericardio							1							1
Polmone		2		1			1							4
Rene			2			2	1			1			5	11
ND			1				1							2
Totale	**2**	**10**	**5**	**1**	**3**	**4**	**39**	**6**	**1**	**1**	**2**	**2**	**16**	**92**

ND: not determined

RISULTATI

- L'analisi dell'intero dataset FT-IR ha identificato la regione spettrale compresa tra 1300 e 800 cm^{-1} come quella caratterizzata dal maggiore potere discriminante per la sierotipizzazione di *S. suis*.
- Le analisi multivariate PCA/LDA hanno evidenziato una chiara separazione dei sierotipi 4, 7, 9, 10 e 23 (Figura 1).
- Il deviation plot ha confermato la discriminazione dei sierogruppi 1, 1/2, 2, 5, 8, 9, 1–14, 15 e 19 nello spazio multidimensionale (Figura 2).
- L'unica sovrapposizione significativa è stata osservata tra i sierotipi 1/2 e 2 e tra i sierotipi 1 e 1–14, risultati sostanzialmente indistinguibili dal punto di vista spettrale.
- L'algoritmo di *machine learning* che ha fornito le migliori prestazioni è risultato essere la RBF-SVM.
- Il classificatore ha evidenziato un'accuratezza del 91% (86/94 isolati) considerando i sierotipi 2 e 1/2 come classi separate. Quando i sierotipi 2 e 1/2 sono stati considerati come un'unica classe, l'accuratezza del classificatore è aumentata al 98,9% (93/94 isolati).

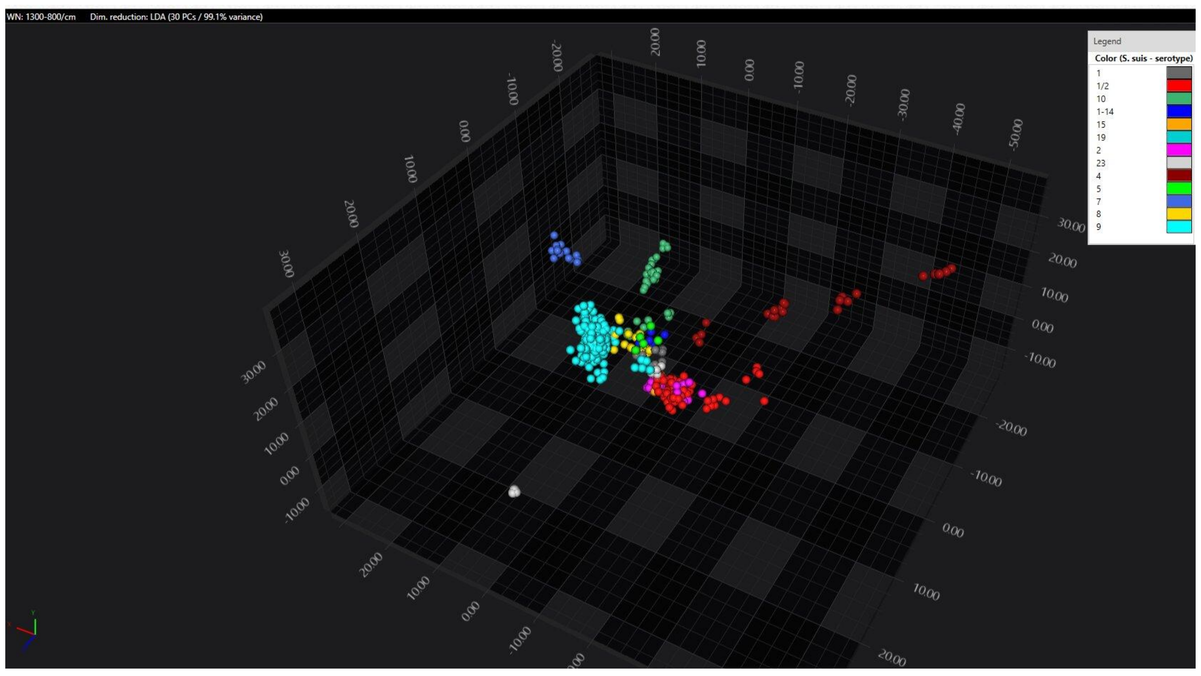

Figura 1: Scatterplot tridimensionale PCA/LDA che mostra il clustering dei sierotipi di S. suis ottenuto mediante IR Biotyper. Ogni forma geometrica rappresenta uno spettro (sono state riportate tutte le repliche), mentre il colore identifica i diversi sierotipi. L'analisi LDA è stata eseguita utilizzando 30 componenti principali, che spiegano complessivamente il 99,1% della varianza.

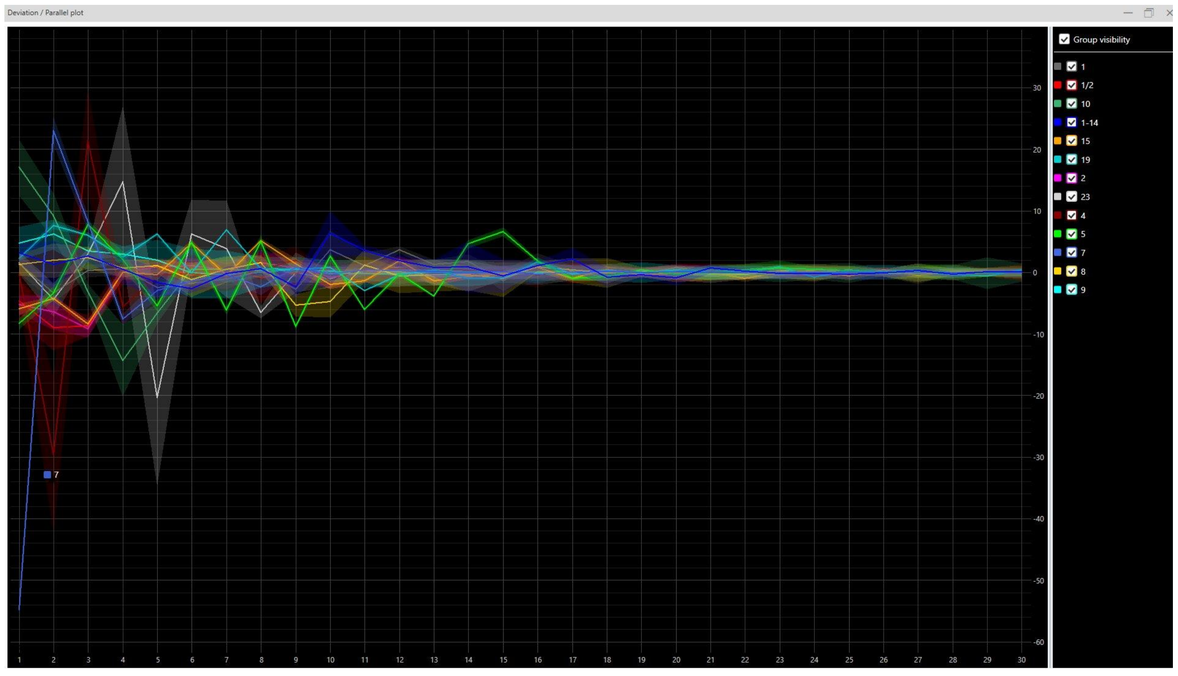

Figura 2: Deviation plot che mostra la separazione di tutti gli isolati di S. suis nello spazio spettrale IR multidimensionale.

CONCLUSIONI

- La spettroscopia FT-IR rappresenta uno strumento rapido, affidabile ed economicamente vantaggioso per la discriminazione dei sierotipi di *S. suis*. Le sue elevate prestazioni, la facilità d'uso e la compatibilità con approcci di *machine learning* ne supportano la potenziale implementazione nei flussi di lavoro diagnostici ed epidemiologici di routine.
- La possibilità di identificare rapidamente sierotipi di *S. suis* di rilevanza clinica e zoonosica rappresenta un importante vantaggio per le attività di sorveglianza, il monitoraggio di ceppi emergenti e le indagini di focolaio.

REFERENCES
[1] Segura M, Fittipaldi N, Calzas C, Gottschalk M. (2017) Trends Microbiol 25, 585–599
[2] Cucco L, Paniccià M, Massacci FR et al. (2022) Emerg. Infect. Dis. 28, 139–147
[3] Wang-Wang JH, Bordoy AE, Martró E, et al. (2022) Front. Microbiol. 13, 897161
[4] Cordovana M, Mauder N, Join-Lambert O, et al. (2022) J. Microbiol. Methods, 201, 106564