

Direct identification from Bact/Alert™ blood culture bottles by MALDI-TOF

Vesselina Kroumova¹, Elisa Gobbato¹, Tommaso Giani², Monia Mantovani¹, Marcella Perone¹, Paola Macaluso¹, Giacomo Fortina¹

¹ Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliero-Universitaria "Maggiore della Carità", Novara

² Dipartimento di Biotecnologie, Sezione di Microbiologia, Università di Siena

Key words: Bacterial identification, blood culture, mass spectrometry

Identificazione diretta da emocolture Bact/Alert™ con MALDI-TOF

SUMMARY

Bacterial identification from blood culture using traditional methods needs about 48 hours, since positization, to be performed. Rapid bacterial identification can result in clinical and economic benefits. To provide rapid pathogen identification for targeted antibiotic treatment, in this study we tested an our previously described homemade method for bacterial identification using MALDI-TOF directly from positive BACTEC blood culture, on positive BacT/ALERT blood culture. A total of 108 bacteria were identified by MALDI-TOF with a positive identification obtained for 98% of Gram negative and 84,3% of Gram positive bacteria. The average of identification score obtained using the protocol described in this study was 2,047 for Gram positive and 2,204 for Gram negative microorganisms. Data here described show that this method is also useful when BacT/ALERT bottles are used and even if these bottles have activated charcoal as inhibitor of antibiotics.

INTRODUZIONE

L'emocoltura rappresenta da sempre il gold standard per le diagnostiche batteriologiche in caso di sepsi. Quest'analisi è andata continuamente evolvendo negli anni passando dal classico metodo Castaneda a soluzioni tecnologicamente sempre più avanzate cosa che ha consentito di aumentare in modo significativo sia la sensibilità che la velocità di rivelazione del metodo (11,12,13).

Tuttavia i tempi di refertazione, nonostante alcuni tentativi di abbreviarne la durata mediante analisi diretta da emocoltura, non sono diminuiti in modo significativo. Tutto ciò fa sì che, ancora oggi, siano necessari circa due giorni dall'avvenuta positizzazione dell'emocoltura per una completa refertazione (1,2,7).

Recentemente una nuova tecnologia, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) si sta sempre più diffondendo. Tale metodica è in grado, in poco tempo, di giungere ad una precisa identificazione dei microrganismi isolati partendo da colonie. L'utilizzo di MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik) è stato dapprima limitato allo studio di queste; tuttavia ben presto si è visto che la sua potenzialità poteva consentire identificazioni anche da liquidi ed in particolare da emocolture positive (4,5).

Vari lavori hanno dimostrato la sua utilità nell'identificare i vari microrganismi direttamente da emocoltura nonostante la presenza di resine e vari materiali che potevano avere un'azione inibente sulla corretta identificazione. I risultati ottenuti analizzando flaconi BACTEC (Becton Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA) sono andati via via migliorando giungendo oggi a percentuali di identificazione superiori al 90% (8).

Queste percentuali si abbassano notevolmente quando le indagini vengono svolte su flaconi Bact/Alert (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) sia per quelle addizionate con carbone attivo sia per quelle senza carbone attivo (Bact/Alert; BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) (14,16).

Viste queste premesse abbiamo pensato di utilizzare una metodica, da noi già precedentemente impiegata con risultati soddisfacenti su emocolture positive con il sistema BACTEC (Becton Dickinson and Company, Franklin Lake, NJ, USA), per valutare se una tale procedura potesse consentire risultati soddisfacenti anche con emocolture processate con il sistema Bact/Alert (BioMerieux).

MATERIALI E METODI

Nel periodo 1 Aprile 30 giugno 2011 le emocolture rese positive con il sistema BACTEC (Becton Dickinson and Company), e identificate mediante

Corresponding author: Vesselina Kroumova

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, AOU "Maggiore della Carità"

Corso Mazzini, 18 - 28100 Novara - Tel.: 0321 3733381

E-mail: vesselina.kroumova@maggioreosp.novara.it

Vitek2 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) con identificazione $\geq 99\%$, sono state successivamente seminate sul sistema Bact/Alert (BioMerieux) seguendo questa procedura:

- i ceppi in esame, isolati da colonie pure, sono stati sospesi in 3 ml di brodo Brain Heart Infusion (BHI) per ottenere una torbidità di 0.5 McFarland. Successivamente tale sospensione è stata diluita in soluzione fisiologica al fine di ottenere una concentrazione finale variabile tra 50 e 500 UFC/mL. Concentrazioni batteriche simili a quanto si ritrova nella clinica.

In seguito 1mL di tale diluizione era introdotto nelle due fiaschette Bact/Alert (Aerobia, AE; Anaerobia, ANA. BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) e contemporaneamente in ciascuna fiaschetta veniva introdotto 5mL di sangue umano sterile proveniente da sacche per trasfusione sottoposte a controllo di qualità microbiologico.

Le fiaschette così seminate venivano incubate per 18h o fino alla loro positività.

Tutti i flaconi risultati positivi venivano successivamente trattati secondo questa procedura:

Protocollo per la separazione (cellule ematiche e batteriche) e per l'estrazione proteica per l'analisi con MALDI TOF MS

Sono stati centrifugati 2 mL di brodo da emocoltura positiva per rimuovere le cellule ematiche. Una quota di surnatante è stata inoculata in una vial contenente brodo Brain Heart Infusion (BHI; Alifax, Padova, Italy) e incubata nello strumento HB&L (Alifax, Padova, Italy) a 37° C. Questo strumento, utilizzando una tecnologia Light Scattering, permette di monitorare la crescita e quantificare la concentrazione batterica (9).

La crescita batterica è stata monitorata in continuo e bloccata alla torbidità di 0.4-0.6 McFarland. Successivamente abbiamo utilizzato il protocollo sviluppato da Bruker Daltonik (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany) per l'estrazione delle proteine.

Sono stati introdotti in una provetta (Eppendorf, Hamburg, Germany) 1.5 mL di brodocoltura dalla vial HB&L e successivamente centrifugati.

Dopo aver eliminato il surnatante, sono stati aggiunti alla provetta 0.3 mL di acqua ultrapura e centrifugato.

Il pellet ottenuto è stato quindi risospeso con 0.3 mL di acqua ultrapura e 0.9 mL di etanolo 96% (EtOH). Il campione è stato poi vortexato e centrifugato a 13000 x g per circa 2 minuti. La provetta è stata quindi lasciata a temperatura ambiente per alcuni minuti al fine di rimuovere i residui di EtOH.

Al pellet sono stati aggiunti 50 μ L di acido formico al 70% e miscelato attraverso pipettamento,

successivamente sono stati aggiunti 50 μ L di acetonitrile e miscelati con cura. Dopo un'ulteriore centrifugazione a 13000 x g per 2 minuti, 0.5-1 μ L del surnatante è stato dispensato su una piastrina MALDI MSP96 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), lasciata asciugare all'aria, successivamente su ogni spot di campione è stato dispensato 1 μ L di matrice.

Come matrice è stata utilizzata una soluzione satura di HCCA (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) in un solvente organico (50% acetonitrile (ACN), 2.5% trifluoroacetico (TFA) acid in distilled water).

MALDI TOF misurazione e identificazione degli spettri

Gli spettri di massa sono stati acquisiti utilizzando uno spettrometro di massa Microflex™ LT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) dotato di un laser ad azoto da 60 Hz.

Gli spettri sono stati acquisiti in modo lineare positivo per range di massa tra 2000-20000 m/z. Il software specifico Bruker Biotyper 2.0 Automation Wizard (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) acquisisce automaticamente gli spettri controllando anche l'intensità del laser. È stato fissato un limite a 1500 m/z.

Di norma, per ogni spot, vengono accumulati 240 laser shots in gruppi di 40 shots alla volta.

Per la calibrazione degli spettri, è stato usato lo standard batterico Bruker (lisato di *Escherichia coli*). Per l'identificazione degli spettri sono stati usati il software MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) e il database MALDI Biotyper contenente gli spettri per più di 3700 microrganismi.

Il software genera una lista di probabili identificazioni di specie elencati in base al valore log(score). Questo valore, che va da 0 a 3 (da 0 a 100% di pattern match), riflette la concordanza dei picchi dei campioni con quelli contenuti nel database e la loro intensità.

Per una sicura identificazione a livello di specie sono necessari valori di log(score) >2.0, per una sicura identificazione a livello di genere, invece, i valori log(score) devono essere compresi tra 1.7 e 2.0. Per valori <1.7 i campioni sono considerati non identificabili. Questi valori soglia sono stati determinati empiricamente in base alle informazioni contenute nell'intero database MALDI Biotyper.

RISULTATI

Sono stati isolati 73 microrganismi con le caratteristiche indicate in Materiali e Metodi. Delle 146 fiaschette seminate se ne sono positivate 120. I generi dei microrganismi isolati ed utilizzati per

le sospensioni sono stati: *Acinetobacter* (3), *Enterobacter* (3), *Escherichia* (10), *Enterococcus* (4), *Klebsiella* (7), *Micrococcus* (3), *Pseudomonas* (7), *Staphylococcus* (30), *Streptococcus* (5), *Stenotrophomonas* (1).

Le specie microbiche sono state: *A. baumannii* (2), *A. jejuni* (1), *E. cloacae* (3), *E. coli* (10), *E. faecalis* (3), *E. faecium* (1), *K. pneumoniae* (7), *M. luteus* (3), *P. aeruginosa* (6), *P. putida* (1), *S. aureus* (11), *S. epidermidis* (15), *S. haemolyticus* (2), *S. hominis* (2), *S. mitis* (1), *S. pneumoniae* (2), *S. pyogenes* (1), *S. simulans* (1), *S. maltophilia* (1) per una distribuzione batterica che rappresenta la normale flora batterica isolata da emocolture presso il nostro Laboratorio (6).

Le 120 emocolture positivate sono state sottoposte, seguendo il protocollo precedentemente illustrato, all'identificazione mediante MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH).

Dei 120 campioni nei quali i microrganismi inoculati sono effettivamente cresciuti, 12 (10%) non sono stati identificati dall'analisi mediante spettrometro di massa MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH), da notare che 8 di questi 12 campioni appartengono a coppie delle stesse emocolture. Nella tabella 1 si evidenzia come la percentuale di identificazione da parte di MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH) per i Gram negativi è risultata pari al 98% mentre tale percentuale scendeva all'84,3% per i Gram positivi, valore tuttavia di molto superiore a quanto riportato da numerosi lavori della letteratura (10,14,16).

In definitiva sono stati identificati 108 microrganismi isolati da emocolture (90%) di questi 105 (97.2%) dimostravano perfetta concordanza sia a livello di genere che di specie con la stessa identificazione effettuata con Vitek 2 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). In particolare per quanto riguarda i generi la suddivisione dei 105 ceppi con identificazione concordante era la seguente: *Acinetobacter* (3), *Enterobacter* (6), *Escherichia* (18), *Enterococcus* (8), *Klebsiella* (12), *Pseudomonas* (8), *Staphylococcus* (44), *Streptococcus* (5), *Stenotrophomonas* (1).

Mentre per quanto riguarda le specie la suddivisione mostrava: *A. baumannii* (2), *A. jejuni* (1), *E. cloacae* (6), *E. coli* (18), *E. faecalis* (6), *E. faecium* (2), *K. pneumoniae* (12), *P. aeruginosa* (7), *P. putida* (1), *S. aureus* (17), *S. epidermidis* (22), *S. haemolyticus* (1), *S. hominis* (4), *S. pneumoniae* (1), *S. pyogenes* (2), *S. simulans* (2), *S. maltophilia* (1).

Gli score di identificazione sono risultati essere in media di 2,118. Per i microrganismi Gram positivi lo score medio è risultato essere di 2,047 mentre, per i microrganismi Gram negativi lo score

medio è di 2,204.

Gli score medi di ogni genere sono riportati in tabella 2.

A livello di specie, invece, sono stati riscontrati gli score medi riportati in tabella 3.

Nella tabella 4 sono illustrati gli score divisi in funzione delle indicazioni che la ditta produttrice indica come accuratezza di identificazione. Come si può vedere solo 13 microrganismi, il 12,4%, hanno mostrato uno score di 1,8 o inferiore, valore che indica bassa sicurezza a livello di genere, mentre ben 74 ceppi (70,5%) hanno avuto uno score di 2 o superiore valore che indica buona sicurezza di identificazione sia a livello di genere che di specie.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti sono certamente soddisfacenti e si avvicinano a quelli riportati in letteratura utilizzando fiaschette BACTEC (Becton Dickinson and Company) migliorando notevolmente quelli ottenuti con flaconi Bact/Alert (BioMerieux).

Riteniamo che i motivi di questo miglioramento siano da ricercare nella procedura utilizzata che prevede un passaggio in brodo e consente in questo modo di limitare l'azione inibente di sostanze, non ancora ben identificate, presenti nel substrato e che impediscono una corretta identificazione, in particolare nei Gram positivi. Da notare che la differenza nella percentuale di identificazione tra Gram negativi e Gram positivi non si registra, quando l'indagine viene effettuata partendo da colonie, come già illustrato da Schmidt (14).

Tutto ciò sembra indicare che la causa di questa minor efficienza nell'identificazione non sia solo legata a sostanze inibenti eventualmente presenti ma, anche, ad un'insufficiente concentrazione di materiale proteico presente nel campione in esame, carenza che la metodica da noi utilizzata supera, prevedendo la stessa, di operare con tutti i campioni che raggiungono una concentrazione standard (0,5 McF). Questa procedura pur non eliminando del tutto il fenomeno lo attenua in modo significativo. Il miglioramento delle performance nei confronti dei Gram positivi è particolarmente marcato per i generi *Staphylococcus* ed *Enterococcus* che mostrano percentuali di corretta identificazione vicini al 90% per il primo e del 100% per il secondo anche se, evidentemente, tali dati dovranno essere confermati da statistiche più numerose. Per il genere *Streptococcus* invece i risultati sono meno positivi registrandosi una percentuale di corretta identificazione del 50%.

È giusto sottolineare tuttavia che la metodica da noi proposta porta a risultati soddisfacenti anche per i Gram negativi. In questo caso il dato più importante non è tanto l'aumento della percentua-

le di identificazione, pure presente, quanto l'aumento dei valori di score che risultano più elevati rispetto ad altri lavori della letteratura consentendo un'acquisizione dei dati in modalità automatica e non manuale cosa che richiederebbe oltre ad

Tabella 1. Percentuali di corretta identificazione nelle 120 emocolture.

	N° EMOC.	NO. IDENTIF	TOT ID.	%
GRAM POSITIVI	59	11	70	84,3
GRAM NEGATIVI	49	1	50	98,0
			120	

Tabella 2. Media degli score per i singoli generi riscontrati nelle emocolture concordanti

	N°	%	SCORE
ACINETOBACTER	3	2,86	2,138
ENTEROBACTER	6	5,71	2,245
ESCHERICHIA	18	17,14	2,257
ENTEROCOCCUS	8	7,62	2,107
KLEBSIELLA	12	11,43	2,198
PSEUDOMONAS	8	7,62	2,11
STAPHYLOCOCCUS	44	41,90	2,035
STREPTOCOCCUS	5	4,76	2,053
STENOTROPHOMONAS	1	0,95	2,002
	105	100	2,118

Tabella 3. Media degli score per le singole specie riscontrate nelle emocolture concordanti.

	N°	%	SCORE
<i>A. baumannii</i>	2	1,90	2,182
<i>A. jejuni</i>	1	0,95	2,05
<i>E. cloacae</i>	6	5,71	2,245
<i>E. coli</i>	18	17,14	2,257
<i>E. faecalis</i>	6	5,71	2,182
<i>E. faecium</i>	2	1,90	1,884
<i>K. Pneumoniae</i>	12	11,43	2,198
<i>P. aeruginosa</i>	7	6,67	2,118
<i>P. putida</i>	1	0,95	2,058
<i>S. aureus</i>	17	16,19	2,22
<i>S. epidermidis</i>	22	20,95	1,927
<i>S. haemolyticus</i>	1	0,95	1,557
<i>S. hominis</i>	4	3,81	1,953
<i>S. pneumoniae</i>	1	0,95	1,915
<i>S. pyogenes</i>	2	1,90	1,852
<i>S. simulans</i>	2	1,90	2,322
<i>S. maltophilia</i>	1	0,95	2,002
	105	100	2,118

Tabella 4. Score medi

	N°	%
≤ 1,8	13	12,38
1,8 ≤ SCORE ≤ 2	18	17,14
2 ≤ SCORE ≤ 2,3	52	49,52
> 2,3	22	20,95
	105	100,00

un tempo più lungo anche la presenza di un operatore qualificato (6,10,15).

Bisogna anche riconoscere che, a fronte dei vantaggi precedentemente illustrati, il metodo da noi proposto aumenta i tempi di esecuzione dell'identificazione tramite MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH) che passano, a seconda delle metodiche proposte, da 15/55 minuti a 75/145 minuti. Tuttavia un tale aumento del TAT non modifica in modo significativo il valore clinico della risposta tramite MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH) che, come è stato dimostrato da Ellington (3), ha significative ricadute sull'impostazione di una corretta terapia antibiotica. Infatti questi Autori hanno paragonato la risposta ottenuta con MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH) a quella con la colorazione di Gram effettuata all'atto della positivizzazione dell'emocoltura ed hanno evidenziato come la terapia antibiotica, grazie all'identificazione del microrganismo responsabile, veniva corretta in quasi 1 caso su 5, (18,5%) e che in 1 caso ogni 15 (6,5%) l'informazione ottenuta da MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH) era in grado di incidere in modo positivo sulla sorveglianza delle infezioni ospedaliere e sulle complicanze ad esse correlate.

In definitiva riteniamo che la metodica qui proposta, già dimostratasi efficace nell'identificazione di emocolture positive processate con flaconi BACTEC (Becton Dickinson and Company), si sia dimostrata ancora più importante per consentire risultati soddisfacenti anche con emocolture positive che utilizzano flaconi Bact/Alert (BioMerieux) anche se addizionate con carbone attivato.

BIBLIOGRAFIA

1. Bruins M.J., Bloembergen P., Ruijs G.J.H.M., Wolfhagen M.J.H.M. Identification and susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. *J Clin Microbiol* 2004. 42 (1): 7-11
2. De Cueto M., Ceballos E., Martinez-Martinez L., Perea E.J., Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol* 2004. 42 (8): 3734-3738
3. Ellington M.J., Bentley N., Pai S., Gouliouris T., Greatorex J., Brown N.M. Aliyu S.H. 2011. MALDI-TOF identification from BacT/Alert blood culture in Cambridge, UK. *21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)* Abstract id: 124445.
4. Ferreira L., Sánchez-Juanes F., Muñoz-Bellido J.L., González-Buitrago J.M. Rapid method for direct identification of bacteria in urine and blood culture samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: intact cell vs. extraction method. *Clin Microbiol Infect* 2011. 17 (7): 1007-1012
5. Ferroni A., Suarez S., Beretti J.L. Dauphin B., Bille

- E., Meyer J., Bougnoux M.E., Alanio A., Berche P., Nassif X. Real time identification of bacteria and yeast in positive blood culture broths by MALDI-TOF-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010. 48: 1542-1548
6. Haigh J.D., Ball D., Eydmann M., Millar M., Wilks M. Direct identification of microorganisms from the bioMérieux BacT/Alert blood culture system by MALDI-TOF is possible. *21st European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)* 2011. Abstract id: 128162.
 7. Kerremans J.J., Goessens W.H.F., Verbrugh H.A., Vos M.C. Accuracy of identification and susceptibility results by direct inoculation of Vitek 2 cards from positive BACTEC cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004. 23: 892-898
 8. Kroumova V., Gobbato E., Basso E., Mucedola L., Giani T., Fortina G. Direct identification of bacteria in blood culture by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: a new methodological approach. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011. 25 (15): 2247-2249.
 9. Kroumova V., Gobbato E., Macaluso P., Tamburelli S., Marini F., Perone M., Orlandi S., Viviani M., Fortina G. Preliminary indication for antibiotic susceptibility tests in less than six hours in positive blood cultures. *Microbiologia Medica* 2010. 25 (1): 24-26.
 10. La Scola B., Raoult D. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 2009. 4: e8041.
 11. Murdoch D.R., Greenlees R.L. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. *J Clin Pathol* 2004. 57: 199-201.
 12. Rohner P., Peppey B., Auckenthaler R. Advantage of combining resin with lytic BACTEC blood culture media. *J Clin Microbiol* 1997. 35 (10): 2634-2638.
 13. Ruiz-Castaneda M. Laboratory diagnosis of brucellosis in man. *Bull W. H. O.* 1961. 24: 73-74.
 14. Schmidt V., Jarosch A., März P., Sander C., Vacata V., Kalka-Moll W. Rapid identification of bacteria in positive blood culture by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2011. (Epub ahead of print).
 15. Stevenson L.G., Drake S.K., Murray P.R.. Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010, 48: 444-447.
 16. Szabados F., Michels M., Kaase M., Gatermann S. The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT™ (bioMérieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low. *Clin Microbiol Infect* 2011.17 (2): 192-195.