

Identification using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry: Preliminary Data

Elisa Gobbato, Vesselina Kroumova, Marcella Perone, Paola Ruzza, Giacomo Fortina

Laboratorio di Microbiologia e Virologia, A.O.U. Maggiore della Carità, Novara

Key words: Mass spectrometry, Rapid identification, Bacteria

Identificazione mediante Spettrometria di Massa Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight (MALDI-TOF): dati preliminari

SUMMARY

Bacterial identification is usually allowed analyzing the phenotypic and biochemical topics of microorganisms. The traditional methods of identification require about 18-24 hours and are expensive. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) allows the identification of bacteria in few minutes.

We consider 459 bacterial strains that were identified both with MALDI TOF MS and VITEK-2.

The percentage of concordance in every group of bacteria was more than 99%, at genus level were more than 94% and at species level was more than 92%.

These preliminary data show that MALDI-TOF MS allows a rapid and precise microorganism identification.

INTRODUZIONE

L'identificazione dei microrganismi è solitamente effettuata attraverso la valutazione delle loro caratteristiche fenotipiche quali la crescita su determinati terreni di coltura, la morfologia delle colonie, la colorazione di Gram e alcune reazioni biochimiche. Sebbene queste tecniche permettano l'identificazione della maggior parte dei microrganismi con grande accuratezza, esse sono costose e prevedono tempi lunghi che oggi la moderna medicina non consente.

La tecnologia Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) è attualmente impiegata per l'identificazione di proteine in diversi ambiti della proteomica come l'identificazione di *biomarker* tumorali, allergici e di patologie degenerative del Sistema Nervoso Centrale quali, ad esempio, l'Alzheimer. In Microbiologia la stessa tecnica si è dimostrata di grande utilità per l'identificazione, in tempi brevissimi, di microrganismi (2, 5).

Bisogna anche ricordare che questa metodica era già stata utilizzata nella prima metà degli anni '70 (1) e successivamente abbandonata. Oggi è stata ripresa in considerazione della sua semplicità, economia e rapidità. MALDI-TOF è una tecnica che utilizza un laser che pulsando permette la vaporizzazione e la ionizzazione di proteine del campione. Il campione è protetto da una matrice (HCCA: α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid) che

assorbe l'energia del laser e si ionizza, successivamente trasferisce parte della sua carica alle proteine ribosomiali e di membrana contenute nel campione ionizzandole a loro volta e, contemporaneamente, proteggendole dal laser che, colpendo direttamente il campione lo distruggerebbe. Le proteine così ionizzate passano attraverso una colonna in cui viene generato il vuoto e un detector TOF (Time-Of-Flight) relaziona il tempo di volo degli ioni con il rispettivo rapporto carica/massa. Da questo viene generato un grafico delle proteine dell'intera cellula batterica e confrontato con gli spettri di altri batteri presenti nel database dello strumento. L'unicità di questo grafico permette l'identificazione del microrganismo e, il grado di corrispondenza con il grafico del database, è trasformato in un valore di *score* che va da 0 a 3 (4, 5, 6).

Questa tecnica è estremamente veloce, infatti, l'identificazione di un microrganismo si ottiene in circa 6 minuti a differenza delle tecniche convenzionali che, invece, per la stessa identificazione richiedono normalmente 18-24 ore (3, 7).

Lo studio si propone di valutare le performance di identificazione batterica dello strumento MALDI-TOF Microflex™ LT (Bruker Daltonik, Billerica, MA) su colonie di batteri provenienti da diversi materiali e cresciuti su terreni solidi diversi confrontando tali dati con normali metodi di identificazione in uso presso il nostro Laboratorio.

Corresponding author: Elisa Gobbato

Laboratorio Microbiologia e Virologia, AOU Maggiore della Carità
C.so Mazzini 18 - 28100 Novara
Tel.: 0321 3733595

MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati considerati 459 campioni consecutivi raccolti dal 01/11/2010 al 31/12/2010 nel Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera "Maggiore della Carità" di Novara. I campioni sono stati analizzati in doppio con Vitek-2 utilizzando eventualmente anche altre metodiche tradizionali in uso nella normale routine del Laboratorio (5) per osservarne la concordanza di identificazione.

Le colonie dei microrganismi presi in esame erano provenienti da materiali diversi e cresciuti su terreni solidi diversi. Per ogni campione, utilizzando un'ansa sterile da 1µl è stata prelevata una piccolissima quantità di colonia da esaminare e depositata in doppio all'interno dei pozzetti di un'apposita piastra di acciaio.

Successivamente è stato depositato 1µl di matrice, costituita da una soluzione satura di HCCA in acetonitrile al 50% e acido trifluoroacetico al 2.5%, su ogni pozzetto della piastra, lasciata asciugare all'aria e inserita nello strumento MALDI Bio Typer (Bruker Daltonik, Billerica, MA) per la lettura spettrometrica.

Contemporaneamente gli stessi campioni sono stati processati come di routine attraverso l'identificazione mediante Vitek-2 (bioMérieux, Marcy l'Etoile, F). In caso di risultati discordanti sono stati allestiti ulteriori test già utilizzati in routine quali le gallerie API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, F).

RISULTATI

Dai 459 campioni analizzati sono stati isolati 75 batteri non fermentanti, 174 Enterobatteri, 22 Enterococchi, 148 Stafilococchi, 10 Streptococchi, 27 "altri" (in questo gruppo abbiamo raccolto tutti i microrganismi di minor frequenza di isolamento) e 3 non identificati (di cui 2 non identificati da entrambi gli strumenti e 1 non identificato da VITEK-2, questi tre ceppi sono stati esclusi dalle tabelle allegate ma inclusi nei conteggi).

È stata calcolata la percentuale di concordanza di

ogni gruppo e la percentuale di concordanza totale. Dai risultati ottenuti si riscontra una concordanza totale del 96.3%, all'interno di ogni gruppo si osserva una concordanza superiore al 99% tranne che per il gruppo "altri", dove la concordanza è del 51.9%. Nel gruppo "altri" sono infatti contenuti microrganismi "rari". Degli stessi i database degli strumenti di identificazione contengono un numero limitato di ceppi e ciò determina più facilmente discordanze di identificazione. I risultati ottenuti sono riassunti nella Tabella 1 nella quale è stata considerata come identificazione di riferimento quella ottenuta con Vitek-2.

Come già detto precedentemente, in 2 casi non è stato possibile identificare il germe né con MALDI-TOF, né con i metodi tradizionali, in un caso, invece, MALDI-TOF aveva identificato un *Corynebacterium striatum* che non è stato identificato con i metodi tradizionali.

A livello di genere le percentuali di concordanza sono soddisfacenti. L'analisi ha interessato solo i generi per i quali il numero di microrganismi isolati era maggiore di 10. In questi è stata osservata una concordanza del 100% per i generi: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Streptococcus*. Per *Proteus* in 1 caso Vitek-2 ha identificato *Yersinia enterocolitica* ma la morfologia delle colonie era quella tipica del genere *Proteus*.

Il genere *Staphylococcus* ha mostrato una percentuale di concordanza del 99.3%, *Escherichia* del 93.2% e *Klebsiella* del 91.2% (Tabella 2).

Anche a livello di specie le percentuali ottenute sono tutte superiori al 92% tranne per *Enterobacter cloacae* che ha mostrato una concordanza solo del 50%, questo dato così basso è però, come già descritto in letteratura, dovuto ad una *misidentification* da parte di MALDI-TOF che identifica *E. cloacae* come *E. asburiae* (Tabella 3). Tale risultato è amplificato anche dal fatto che 4 dei 6 isolamenti appartenevano allo stesso paziente (Kroumova, dati in corso di pubblicazione).

Tabella 1. Concordanza a livello di raggruppamento

RAGGRUPPAMENTO	MALDI	VITEK2	N° CONCORDANZE	% CONCORDANZE
NON FERMENTANTI	76 ⁽¹⁾	75	75	100.0
ENTEROBATTERI	174	174	174 ⁽²⁾	100.0
ENTEROCOCCHI	22	22	22	100.0
STAFILOCOCCI	147	148	147	99.3
STREPTOCOCCHI	15	10	10	100.0
ALTRI	23	27	14	51.9
TOT. ⁽³⁾	459	459	442	96.3

NOTE:

- (1) Vitek2 in un caso aveva identificato *Burkholderia pseudomallei* che è stata conteggiata nel gruppo "Altri"
- (2) Le discordanze riscontrate a livello di genere riportate in Tabella 2 riguardavano microrganismi comunque facenti parte degli Enterobatteri, sebbene appartenenti a generi diversi.
- (3) In tabella non sono stati riportati due microrganismi "Non identificati" da entrambi i metodi e 1 *Corynebacterium acnes* identificato solo da MALDI ma sono stati conteggiati nel totale.

DISCUSSIONE

Dai risultati ottenuti da questo lavoro è possibile affermare che le percentuali di concordanza ottenute sia a livello di genere che a livello di specie, sono elevate e che le discordanze identificative

possono essere legate soprattutto al database degli strumenti stessi. Per quanto riguarda MALDI-TOF, in particolare, il database è tuttora in via di ampliamento anche a causa della scarsa diffusione che questo strumento ha avuto fino ad ora.

Tabella 2. *Concordanze a livello di genere tra MALDI-TOF e VITEK2*

CLASSE	N° MALDI	N° Vitek2	N° CONCORDANZE	GENERE	% CONCORDANZA
NON FERMENTANTI	76	75	75		
	13	13	13	<i>Acinetobacter</i>	100
	54 ⁽¹⁾	53	53	<i>Pseudomonas</i>	100
	9	9	9	<i>Stenotrophomonas</i>	100
TOT.	76	75	75		100
ENTEROBATTERI	174	174	165		
	4	4	4	<i>Citrobacter</i>	100
	24 ⁽²⁾	21	21	<i>Enterobacter</i>	100
	69	74	69	<i>Escherichia</i>	93.2
	33 ⁽³⁾	34 ⁽⁴⁾	31	<i>Klebsiella</i>	91.2
	2	2	2	<i>Morganella</i>	100
	14 ⁽⁵⁾	13	13	<i>Proteus</i>	100
	3	3	3	<i>Providencia</i>	100
	3	0	0	<i>Raoultella</i>	0
	3	3	3	<i>Salmonella</i>	100
	19	19	19	<i>Serratia</i>	100
	0	1	0	<i>Yersinia</i>	0
TOT.	174	174	165		94.8
ENTEROCOCCHI					
	22	22	22	<i>Enterococcus</i>	100
STAFILOCOCCI					
	147	148 ⁽⁶⁾	147	<i>Staphylococcus</i>	99.3
STREPTOCOCCI					
	15 ⁽⁷⁾	10	10	<i>Streptococcus</i>	100
ALTRI	23	27	14		51.9

NOTE:

- (1) Vitek2 in un caso aveva identificato *Burkholderia pseudomallei*;
- (2) Vitek2 aveva identificato in due casi *Escherichia hermannii* e in un caso *Escherichia coli*;
- (3) Vitek2 in 2 casi aveva identificato *Escherichia hermannii* mentre MALDI aveva identificato *Klebsiella pneumoniae*.
- (4) Vitek2 in tre casi aveva identificato *Klebsiella oxytoca* mentre MALDI aveva identificato *Raoultella ornithinolytica*
- (5) MALDI aveva identificato *Proteus mirabilis* ma Vitek2 aveva identificato *Yersinia enterocolitica*
- (6) Vitek2 in un caso aveva identificato *Propionibacterium acnes*;
- (7) Vitek2 aveva identificato: in due casi *Kokuria rosea*, in due casi *Granulicatella adiacens* e in un caso *Pediococcus pentosaceus*.

Tabella 3. *Concordanza a livello di specie.*

MICROORGANISMO	N° TOT	% CONCORDANZA	NOTE
<i>A. baumannii</i>	9	100	
<i>P. aeruginosa</i>	51	100	
<i>S. hominis</i>	11	100	
<i>P. mirabilis</i>	13	100	
<i>S. aureus</i>	59	100	
<i>E. faecalis</i>	17	100	
<i>E. coli</i>	69	98.6	
<i>S. epidermidis</i>	61	98.4	
<i>K. pneumoniae</i>	24	96	
<i>S. marcescens</i>	14	92.9	
<i>E. cloacae</i>	14	50	(1)

NOTA:

- (1) La concordanza è così bassa perché MALDI-TOF ha identificato in altri 6 casi *E. asburiae* problema identificativo già riportato in letteratura (Kroumova, dati in corso di pubblicazione).

È molto probabile che con l'aumento di informazioni presenti nel database le identificazioni che si otterranno in un prossimo futuro si dimostreranno sempre più corrette in quanto lo strumento effettua un'identificazione di tipo proteomico e non fenotipico. Bisogna poi sottolineare che la possibilità di ottenere, con lo strumento MALDI-TOF, un'identificazione in tempi molto più rapidi appare interessante per le importanti ricadute cliniche che questo comporta.

A fronte di questo è corretto considerare che al momento attuale l'operatività mediante MALDI-TOF risulta ancora per buona parte manuale e con un percorso non completamente rintracciabile. Riteniamo, tuttavia, che molto rapidamente tali limiti saranno superati visti gli indubbi vantaggi che la rapidità dell'identificazione comporta nella diagnostica microbiologica. I dati da noi ottenuti, seppur preliminari, mostrano che l'introduzione della tecnologia Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) consente una rapida e certa identificazione microbiologica che riduce radicalmente il tempo nella diagnostica batteriologica, cosa che inevitabilmente ci obbligherà ad un'importante revisione dell'organizzazione del settore di Batteriologia che dovrà accompagnarsi ad una diversa "filosofia" di lavoro che porti il Microbiologo Clinico a svolgere un ruolo sempre più attivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975; 47: 219-25.
2. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'homme G. Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* 2010, 48 (5): 1549-54.
3. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *CMI* 2010; 16 (11): 1614-9.
4. Ferreira L, Sánchez-Juanes F, González-Ávila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 2010; 48 (6): 2110-5.
5. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, et al. Real time identification of bacteria and yeast in positive blood culture broths by MALDI-TOF-mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1542-8.
6. Gravet A, Camdessouens-Miehé G, Gessier M, et al. Bilan de l'utilisation en routine de la spectrométrie de masse dans un laboratoire hospitalier de microbiologie. *Pathologie Biologie* 2010, article in press.
7. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *CID* 2009; 49: 543-51.