

MALDI-TOF mass spectrometry for the rapid identification of aetiological agents of sepsis

Roberto Degl'Innocenti, Tamara Brunelli, Loredana Ortega De Luna, Patrizia Miglietta, Mayra Sosa, Antonella Conti, Patrizia Casprini

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Misericordia e Dolce, ASL4, Prato

Key words: Sepsis, Mass-spectrometry, Blood cultures identification

Spettrometria di massa (MALDI-TOF) applicata alla identificazione rapida di agenti eziologici responsabili di sepsi

SUMMARY

Introduction: The MALDI-TOF has recently become part of the methods of microbiological investigation in many laboratories of bacteriology with advantages both practical and economical. The use of this technique for the rapid identification of the causative agents of sepsis is of strategic importance to the ability to provide the clinician with useful information for a prompt and rapid establishment of an empirical antimicrobial "targeted" therapy.

Methods: It was tested a total of 343 positive blood culture bottles from 211 patients. The samples after collection were incubated in the BACTEC FX (Becton Dickinson, USA). From these bottles were taken a few milliliters of broth culture and transferred into a vacutainer tube containing gel. This was centrifuged, the supernatant was decanted, and finally recovered the bacterial suspension on the gel. With micro-organisms recovered in this way, after several washes with distilled water, was prepared a slide for microscopic examination with Gram stain, and a plate for mass spectrometry (MS-Vitek, bioMérieux, France). Then, the same samples were inoculated on solid agar media according to the protocol in use in our laboratory. The next day was checked the possible bacterial growth on solid media; we then proceeded to the identification of the colonies by Vitek MS and / or with the system Vitek2 (bioMérieux, France).

Results: 258 (75.2%) positive vials show concordant results between direct identification and identification after growth on agar. For 83 (24.2%) positive bottles there has been full compliance with the microscopic examination but not with culture. In particular, two bottles (0.6%) have given complete discordance between the direct identification and that after growth.

Conclusions: The protocol we use for the direct identification of organisms responsible for sepsis, directly on positive bottles, seems to be a quick and inexpensive procedure, which in less than 60 minutes can give valuable feedback to the clinician.

INTRODUZIONE

La spettrometria di massa MALDI-TOF è recentemente entrata a far parte delle metodiche di indagine microbiologica in molti laboratori di batteriologia con indubbi vantaggi sia di natura pratica che economica (1, 2).

La sua applicazione nella rapida identificazione di agenti responsabili di sepsi è di importanza strategica poiché può fornire al clinico informazioni utili per la somministrazione di una pronta e rapida terapia antimicrobica empirica "mirata" (3-6). Scopo del presente lavoro è di valutare l'introduzione di questa pratica strumentale nella routine di un laboratorio di batteriologia applicandola alla diagnosi microbiologica delle sepsi.

MATERIALI E METODI

Sono state esaminati un totale di 343 flaconi risul-

tati positivi appartenenti a 211 pazienti. I campioni sono stati processati con lo strumento BACTEC FX (Becton Dickinson, France) o BactAlert (bioMérieux, France).

Da ogni flacone positivo sono stati prelevati con una siringa sterile, 5 ml di brodocoltura che venivano utilizzati per riempire una provetta vacutainer SST II Advance (Becton Dickinson), allestire un vetrino per l'esame microscopico Gram ed inoculare gli idonei terreni solidi agarizzati secondo il protocollo in uso presso il nostro laboratorio.

La provetta era quindi centrifugata a 1200g per 15 minuti, le piastre seminate incubate a 37°C per 18/36 ore.

Dopo aver eliminato il sovrantante venivano aggiunti alla provetta 2 ml di acqua distillata sterile. La patina batterica eventualmente presente sul gel, già liberata dalla parte corpuscolare del

Corresponding author: Tamara Brunelli

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Misericordia e Dolce, ASL4 Prato
Piazza dell'Ospedale 5, 59100 Prato - Tel: 0574 434719; Fax: 0574 434774
E-mail: tbrunelli@usl4.toscana.it

prelievo venoso, era risospesa per agitazione.

La sospensione batterica (in parte utilizzata per l'allestimento di un antibiogramma automatico o manuale) era trasferita per ulteriori lavaggi, sempre con acqua distillata sterile, in una micropipetta Eppendorf o filtrata con filtri Millipore da 0.45µm.

Con i microrganismi così recuperati (dal *pellet* della micropipetta o dalla superficie del filtro) erano allestiti due spot per il Vitek-MS (Axima Shimadzu, commercializzato da bioMérieux) e ricoperti di 1 µl di matrice HCCA (alpha-cyano-4-hydroxy-cinnamic acid).

Il vetrino era quindi osservato al microscopio.

Gli esiti della microscopia e del VitekMS venivano poi referati.

Il giorno successivo veniva controllata l'eventuale crescita batterica sui terreni solidi e si procedeva quindi alla identificazione finale dei microrganismi per mezzo di Vitek MS e/o di Vitek2 (bioMérieux).

RISULTATI

Sono stati analizzati 343 flaconi di emocolture che appartenevano a 211 pazienti (Tabella 1).

Nella nostra casistica il 15% degli isolati è costituito da *E. coli*, il 10% da *S. aureus* mentre gli isolamenti di stafilococchi coagulasi negativi (SCN) erano pari al 43% (Figura 1).

Altri microrganismi si ritrovano con frequenze inferiori al 6% (Figura 1).

I microrganismi sono stati raggruppati, traendo spunto dalla letteratura (9), in "probabili patogeni" e "probabili contaminanti"; tale raggruppamento, a nostro avviso, rende meglio valutabile la performance dello spettrometro di massa nell'identificazione diretta (senza subcoltura) dei microrganismi. Nella Tabella 2 è possibile osservare i microrganismi isolati suddivisi per flacone e per paziente: nei pazienti era considerata una concordanza del 100%, quando almeno un'identificazione diretta era concordante con l'isolato identificato da coltura.

Tabella 1. Campioni esaminati.

	Totale campioni	Campioni positivi MALDI diretto	Concordanza (%)
Flaconi	343	258	75.2
Pazienti	211	156	73.9

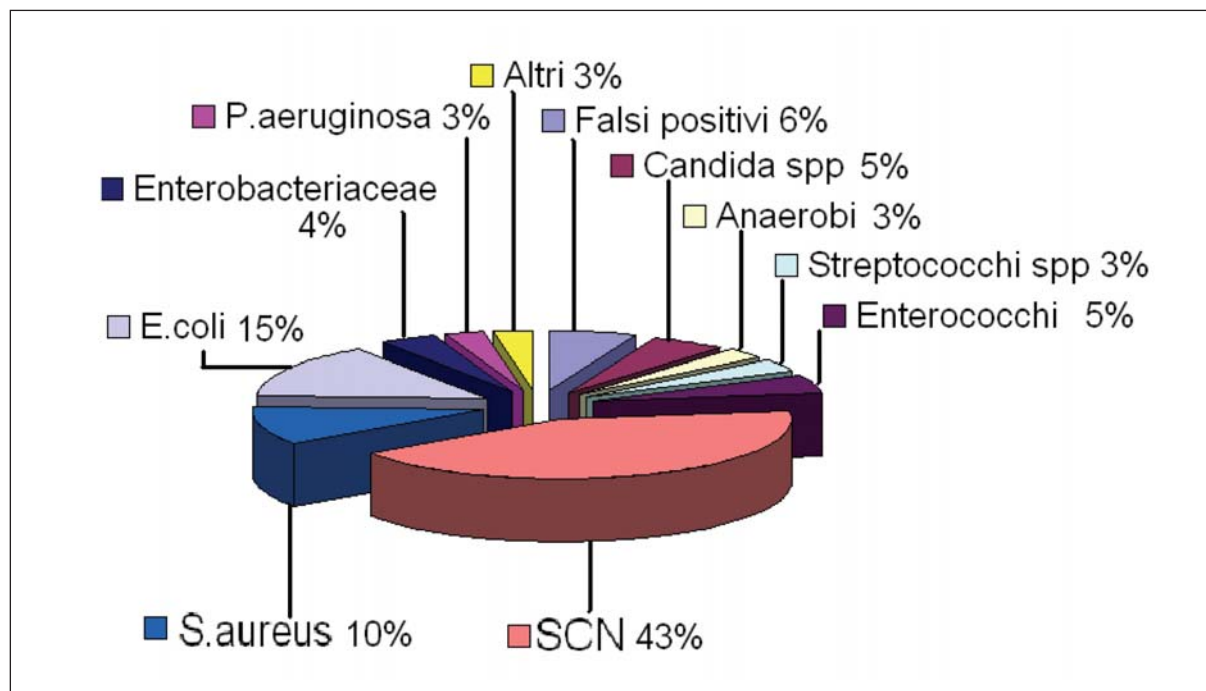


Figura 1. Isolati.

Su 343 flaconi positivi, 258 (pari al 75.2 %) presentavano piena concordanza fra identificazione diretta, microscopia e identificazione dopo crescita su agar; 85 (pari al 24.8 %) erano concordanti con l'esame microscopico ma non con l'esame colturale (Tabella 1 e Tabella 2).

Di questi 85, in 83 flaconi nessuna identifica-

zione è stata possibile con la spettrometria e in altri due flaconi l'identificazione diretta non concordava né con quella microscopica né con quella dopo crescita in coltura (*Microsporium canis* e *Aspegillus flavus* all'identificazione diretta vs *S. aureus* nella coltura in entrambi i casi).

Tabella 2. Concordezza tra MALDI-TOF diretta da flacone e dopo coltura (totale pazienti e totale flaconi) nell'identificazione dei microrganismi, valutata per numero di flaconi e per numero di pazienti, raggruppando i microrganismi come descritto nel testo.

Gruppi	Microrganismi	N° Pazienti			N° Flaconi		
		Correttamente identificati direttamente da flacone	Totale pazienti identificati da coltura	Concordezza (%)	Correttamente identificati direttamente da flacone	Totale flaconi identificati da coltura	Concordezza (%)
PP	<i>E. cloacae</i>	1	1	100.0	1	1	100.0
PP	<i>E. coli</i>	31	31	100.0	50	50	100.0
PP	<i>K. pneumoniae</i>	4	4	100.0	4	4	100.0
PP	<i>M. morgani</i>	1	1	100.0	4	4	100.0
PP	<i>P. mirabilis</i>	2	2	100.0	2	2	100.0
PP	<i>P. aeruginosa</i>	5	6	83.3	6	7	85.7
PP	<i>H. influenzae</i>	1	1	100.0	2	2	100.0
PP	<i>L. monocytogenes</i>	2	2	100.0	2	2	100.0
PP	<i>S. faecium</i>	2	3	66.7	2	3	66.7
PP	<i>S. faecalis</i>	8	8	100.0	18	20	90.0
PP	<i>S. pneumoniae</i>	1	2	50.0	1	3	33.3
PC	<i>S. mutans</i>	0	2	0.0	0	2	0.0
PC	<i>S. anginosus</i>	2	3	66.7	4	5	80.0
PP	<i>S. aureus</i>	20	22	90.9	56	69	81.2
PC	<i>S. capitis</i>	1	5	20.0	1	6	16.7
PC	<i>S. epidermidis</i>	37	47	78.7	58	72	80.6
PC	<i>S. gallolyticus</i>	1	1	100.0	1	1	100.0
PC	<i>S. haemolyticus</i>	4	10	40.0	6	12	50.0
PC	<i>S. hominis</i>	16	24	66.7	19	28	67.9
PC	<i>S. lugdenensis</i>	0	2	0.0	0	3	0.0
PC	<i>M. luteus</i>	1	1	100.0	1	1	100.0
PC	<i>C. perfringens</i>	0	1	0.0	0	1	0.0
PC	<i>P. asaccarolyticus</i>	0	1	0.0	0	1	0.0
PC	<i>P. acnes</i>	2	4	50.0	2	4	50.0
PC	<i>B. cereus</i>	0	2	0.0	0	2	0.0
PC	<i>M. osloensis</i>	0	1	0.0	0	1	0.0
Lieviti	<i>C. albicans</i>	0	2	0.0	0	2	0.0
Lieviti	<i>C. glabrata</i>	0	3	0.0	0	11	0.0
Lieviti	<i>C. parapsilosis</i>	1	6	16.7	1	7	14.3
	Falsi Positivi	13	13	100.0	17	17	100.0
	Totale	156	211	73.9	258	343	75.2
PC= probabile contaminante PP= probabile patogeno							

Nelle Tabelle 2, 3 e 4 è possibile osservare come per il gruppo dei probabili patogeni la percentuale di concordanza raggiunga il 94% per i pazienti ed un valore di poco inferiore al 90 % per i flaconi.

Estremamente bassa, invece, la sensibilità di identificazione dei lieviti (flaconi 5%, pazienti 9.1%). I probabili contaminanti presentavano una con-

cordezza del 70% nei flaconi e del 72% dei pazienti.

La concordanza dei falsi positivi (flaconi segnalati positivi dagli strumenti, ma negativi alla spettrometria diretta, alla microscopia ed alla coltura) ha il 100%.

Da sottolineare alcuni casi particolari (Tabella 5) che si sono presentati alla nostra attenzione.

Tabella 3. Concordezza tra identificazione diretta e dopo coltura valutata per numero di isolati.

	Numero isolati	Concordezza (%)
Candida	20	5.0
Probabile Contaminante	139	70
Probabile Patogeno	167	89
Falsi positivi	17	100.0

Tabella 4. Concordezza tra identificazione diretta e dopo coltura valutata per numero di pazienti

	Numero isolati	Concordezza (%)
Candida	11	9.1
Probabile Contaminante	104	62
Probabile Patogeno	83	94
Falsi positivi	13	100.0

Tabella 5. *Casi particolari.*

	Tipo Flacone	Esame Microscopico (*)	1° Spot	2° Spot	Coltura
Paziente 1	Aerobio	cpc+bcn	<i>S. faecium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>S. faecium</i> <i>S. faecalis</i>
Paziente 1	Anaerobio	cpc	<i>S. faecium</i>	<i>S. faecium</i>	<i>S. faecium</i> <i>S. faecalis</i>
Paziente 2	Aerobio	cpg+cpc	<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecalis</i>	<i>S. faecalis</i> <i>S. haemolyticus</i>
Paziente 3	Aerobio	cpg	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. haemolyticus</i> <i>S. faecalis</i>
Paziente 4	Aerobio	bcn	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani</i> <i>S. maltophilia</i>
Paziente 4	Anaerobio	bcn	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>
Paziente 4	Aerobio	bcn	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani</i>	<i>M. morgani</i> <i>P. mirabilis</i>
Paziente 5	Aerobio	bcn	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i>

(*): cpc=cocchi Gram positivi catenelle; cpg= cocchi Gram positivi grappolo; bcn= bacilli Gram negativi

Paziente 1: un flacone per aerobi che microscopicamente presentava cocchi Gram positivi a catenella e bacilli Gram negativi. La spettrometria identificava nel primo pozzetto uno *S. faecium* e nel secondo *P. aeruginosa*. La coltura evidenziava entrambi i batteri, ma, in quantità minore, era presente anche *S. faecalis*. Per lo stesso paziente nel flacone per anaerobi la spettrometria identificava in entrambi i pozzetti *S. faecium* pur presentando alla coltura *S. faecium* e *S. faecalis*, quest'ultimo sempre in quantità nettamente inferiore a *S. faecium*.

Paziente 2: flacone aerobio con cocchi Gram positivi a grappolo ed a catenelle. VitekMS identificava in entrambi i pozzetti *S. faecalis*. La coltura evidenziava *S. faecalis* e, in minor quantità, *S. haemolyticus*.

Paziente 3: flacone aerobio con cocchi Gram positivi a grappolo. Vitek2 identificava in entrambi i pozzetti *S. haemolyticus*. La coltura evidenziava *S. haemolyticus* e, in minor quantità, *S. faecalis* inversamente a quanto succedeva per il paziente 2.

Paziente 4: due flaconi per aerobi per i quali la spettrometria ha identificato in tutti e quattro i pozzetti *M. morgani*, la coltura presentava per entrambi la crescita di *M. morgani*, ma nel primo caso si osservava la presenza numericamente inferiore di *S. maltophilia* e nel secondo caso di *P. mirabilis*. Nel flacone per anaerobi VitekMS identificava *P. mirabilis* confermato dalla coltura.

Paziente 5: flacone aerobio. Nel primo pozzetto VitekMS identificava *P. aeruginosa* e nel secondo *K. pneumoniae*. La coltura presentava la crescita di entrambi i batteri.

DISCUSSIONE

Una rapida identificazione del microrganismo responsabile di sepsi direttamente dal flacone di coltura, ridurrebbe i tempi nella applicazione di una terapia antimicrobica mirata e, conseguentemente, i tempi di degenza, con un vantaggio indiscutibile sia per il paziente sia per l'economia sanitaria (3, 7).

Il sistema da noi utilizzato permette in un tempo breve (mediamente un'ora dallo scarico del flacone positivo dallo strumento) di comunicare al clinico (nel 75% dei casi) l'identità del microrganismo responsabile del processo infettivo, permettendo quindi l'instaurazione di una terapia antimicrobica o la eventuale correzione di quella in atto sulla base anche, e soprattutto, dell'epidemiologia locale. Da sottolineare che, se prendiamo in con-

siderazione solo il gruppo dei probabili patogeni, la percentuale di concordanza raggiunge l'89% per i flaconi e il 94% per i pazienti.

Da osservare, inoltre, la bassa percentuale di identificazione, ma anche di isolamento, di lieviti, di anaerobi e di batteri non frequentemente ritrovati in campioni biologici come il sangue, dovuta in parte alla bassa concentrazione dei microrganismi nei campioni stessi, ma anche alla manualità nella preparazione degli *spot* che è, nella nostra esperienza, campione e operatore dipendente.

Per gli stafilococchi coagulasi negativi (SNC non *epidermidis*) la bassa percentuale di identificazione, a nostro avviso, non riveste una particolare importanza, in quanto batteri frequentemente isolati da campioni ematici contaminanti (8, 9).

Da sottolineare i campioni descritti in tabella 5

dove era presente più di un microrganismo. In accordo con i dati della letteratura (3, 6) anche nel nostro studio i campioni che presentavano più di un microrganismo non venivano correttamente identificati.

CONCLUSIONI

Il protocollo da noi usato per la identificazione diretta di microrganismi responsabili di sepsi direttamente sui flaconi positivi, sembra essere una procedura rapida ed economica, che in meno di 60 minuti può dare risposte importanti al clinico. In base anche ai dati della letteratura (7), le percentuali di concordanza fra l'identificazione diretta e dopo coltura sia per i flaconi (75.2%) che per i pazienti (73.9%), suggeriscono che, l'introduzione nella pratica di laboratorio di questa procedura, possa permettere al clinico di intervenire rapidamente con presidi medici appropriati, con importanti vantaggi di natura etica, medica, economica, riducendo anche la possibilità di sviluppo di nuove resistenze.

BIBLIOGRAFIA

- Bizzini A, Greub G. Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1616-7.
- Brunelli T, Degl'Innocenti R, Conti A, Casprini P. Use of Maldi-TOF Mass spectrometry in direct microorganism identification in clinical laboratories. *Clin Diagn Microb* 2010; 25: 151-3.
- Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1620-5.
- Christner M, Rohde H, Wolters M, Sobottka I, Wegscheider K, Aepfelbacher M. "Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry fingerprinting. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1584-91.
- Fothergill A, Kasinathan V, Hyman J, et al. Rapid identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles by using a lysis filtration method and MALDI-TOF mass spectrum analysis with SARAMIS Database. American Society for Microbiology 112th General Meeting, San Francisco CA June 16-19; 2012.
- Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1481-3.
- Vlek AL, Bonten MJ, Boel CH. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*. 2012; 7: e32589.
- Washer LL, Chenoweth C, Kim HW, et al. Blood culture contamination: a randomized trial evaluating the comparative effectiveness of 3 skin antiseptic interventions. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013; 34: 15-21.
- Weinstein MP, Towns M, Quartey SM, et al. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology and outcome of bacteraemia and fungemia in adults. *Clin Inf Dis* 1997; 24: 584-602.