

IMPIEGO DEL MALDI-TOF PER L'IDENTIFICAZIONE DI SPECIE BATTERICHE CLINICAMENTE RILEVANTI PER IL POLLAME

Drigo I.^{1*}, Pascoletti S.¹, Gobbo F.², Catania S.², Moret C.¹, Agnoletti F.¹, Bano L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sez. Territoriale di Treviso, Vicolo Mazzini 4, 31020 Villorba (TV)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT3 Sez. Diagnostica di Padova, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD)

*Corresponding Author. Email: idrigo@izsvenezie.it, Tel: +39 0422 302 302

Summary

Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) has emerged as a new, fast and reliable tool for bacterial identification. In the present study this proteomics-based method has been applied for the identification of bacterial pathogens of relevant interest for poultry. Strains of *Escherichia coli* (n=10), *Salmonella gallinarum* (n=10), *Salmonella pullorum* (n=2), *Ornithobacterium rhinotracheale* (n=12), *Riemerella anatipestifer* (n=4), *Clostridium perfringens* (n=10), *Clostridium septicum* (n=10), *Enterococcus cecorum* (n=10), *Pasteurella multocida* (n=5), *Gallibacterium anatis* (n=10), *Mycoplasma gallisepticum* (n=10), *Mycoplasma synoviae* (n=13) and *Mycoplasma iowae* (n=9) routinely isolated from Italian poultry flocks and identified by conventional techniques (biochemical or biomolecular methods) were tested by MALDI TOF MS technology. Three different protein extraction methods were used and the achieved protein fingerprint signatures were matched with spectra included in the database provided by the instrument supplier. All strains belonging to *C. septicum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. multocida*, *R. anatipestifer* and *O. rhinotracheale* species were correctly identified with score ≥ 2.0 . *Salmonella* species were correctly identified only at genera level. Misidentification or not reliable identification for some *E. cecorum*, *G. anatis* and *Mycoplasma spp* were observed. Failure on obtaining a good identification for above mentioned strains are attributable to the absence of adequate reference spectra in the MALDI Biotyper database. In conclusion, MALDI-TOF is a valid tool for identification of pathogens of poultry interest even if, for some species (e.g. *Mycoplasma spp*) further extension of the instrument database and optimization of extraction protocols should to be implemented.

INTRODUZIONE

La spettrometria di massa basata sulla tecnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) è stata recentemente introdotta nei laboratori di diagnostica microbiologica e si è dimostrata un valido e veloce strumento per l'identificazione batterica. Numerosi studi in campo umano hanno infatti dimostrato come questa tecnica possa efficacemente sostituire i test fenotipici classici per l'identificazione della maggior parte dei patogeni batterici routinariamente isolati dai campioni clinici (1-4).

Il principio su cui si basa la tecnologia MALDI-TOF è la possibilità di separare

una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z). Il campione opportunamente trattato viene irradiato con un laser pulsato che ne permette il desorbimento e la ionizzazione, gli ioni così prodotti vengono accelerati grazie all'esposizione ad un campo elettrico e separati in base alla loro m/z attraverso la corsa lungo un tubo di volo posto sottovuoto (5). Nel caso specifico dell'identificazione batterica, il materiale di partenza è un estratto proteico del microorganismo mescolato con un'ideale matrice che ne favorisce la ionizzazione. Il risultato della corsa è costituito da uno spettro proteico che risulta differente tra microorganismi appartenenti a diverse specie e nel quale vengono riportati i valori m/z di tutte le proteine ionizzate. Il passaggio finale che porta all'identificazione è la comparazione di questi fingerprints proteici con un database di spettri di referenza mediante l'uso di specifici algoritmi i quali generano una lista di possibili specie di appartenenza con un valore indicante l'affidabilità di ciascun abbinamento (1, 6). Numerosi studi hanno valutato e messo in luce l'utilità e l'affidabilità della spettrometria di massa in ambito umano ma i dati sono ancora mancanti per quanto riguarda l'applicazione in campo veterinario (1-4, 7, 8). Lo scopo di questo lavoro preliminare è stato quindi quello di valutarne l'applicazione per l'identificazione di specie batteriche clinicamente rilevanti per il pollame.

MATERIALI E METODI

Ceppi. Sono stati inclusi nello studio un totale di 120 ceppi appartenenti alle seguenti specie: *Escherichia coli* (n=10), *Salmonella gallinarum* (n=10), *Salmonella pullorum* (n=2), *Ornithobacterium rhinotracheale* (n=12), *Riemerella anatipestifer* (n=4), *Clostridium perfringens* (n=10), *Clostridium septicum* (n=10), *Enterococcus cecorum* (n=10), *Pasteurella multocida* (n=5), *Gallibacterium anatis* (n=10), *Mycoplasma gallisepticum* (n=10), *Mycoplasma synoviae* (n=13), *Mycoplasma Iowae* (n=9) e *Mycoplasma melagridis* (n=3). Tutti i ceppi sono stati identificati mediante test biochimici convenzionali e/o mediante test biomolecolari e coltivati in opportuni terreni e adeguate condizioni di crescita.

Preparazione del campione. Tutti i campioni sono stati analizzati in due repliche. Per valutare l'influenza del tipo di estrazione sul numero e l'affidabilità dell'identificazione tutti i microorganismi ad eccezione dei micoplasmi, sono stati sottoposti ad analisi diretta, estrazione "in situ" con etanolo e acido formico al 70% e ad estrazione completa con etanolo, acido formico al 70% e acetonitrile. Data la difficoltà ad ottenere una quantità adeguata di pellet batterico i micoplasmi sono stati sottoposti solo ad estrazione classica a partire da una brodocoltura.

Identificazione mediante MALDI-TOF MS. L'identificazione è stata effettuata utilizzando lo strumento Microflex LT (Maldi Biotyper, Bruker Daltonics) equipaggiato con il software FlexControl (versione 3.3, Bruker Daltonics). Gli spettri sono stati acquisiti automaticamente in linear positive mode con un range da 2 a 20 kDa. Per la ionizzazione del campione è stata utilizzata come matrice una soluzione satura di HCCA (Alpha-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid, Bruker Daltonics) in 50% di aceto nitrile e 2,5% di acido trifluoroacetico come da indicazioni del produttore. L'analisi automatica degli spettri grezzi è stata

eseguita con il software MALDI Biotyper RT Classification (versione 3.1, Bruker Daltonics) utilizzando una libreria di 4613 spettri di referenza. In accordo con i criteri proposti dalla ditta produttrice l'identificazione è stata considerata valida a livello di specie per scores $x \geq 2,0$, a livello di genere per scores $1,7 \leq x < 2$ mentre non è stata considerata affidabile per valori di scores $x < 1,7$.

Implementazione del database con ceppi di campo e referenza di Mycoplasma spp.
Per l'implementazione del database ciascun ceppo è stato estratto con procedura classica e i campioni sono stati analizzati in 12 repliche. Gli spettri ottenuti sono stati ispezionati e quelli considerati outlier sono stati eliminati. Gli spettri rimanenti sono stati analizzati mediante il software MALDI Biotyper 3 (versione 3.1, Bruker Daltonics) e inseriti nel database come MSPs (Main Spectra).

RISULTATI

Degli 83 microorganismi testati con tutti e tre i metodi di estrazione 11/83 (13.25%), 4/83 (4.8%) e 2/83 (2.4%) ceppi hanno dato rispettivamente dopo analisi diretta, estrazione “in situ” e estrazione completa scores $x < 1,7$ e quindi identificazioni non affidabili sia a livello di genere che di specie. Lo strumento ha restituito identificazioni con scores $x \geq 2,0$ in 65/83 ceppi (78.31%) non sottoposti ad estrazione, in 74/83 (89.1%) dei campioni estratti con metodica “in situ” e in 78/83 (94%) dei ceppi con estrazione completa. Il numero di ceppi con score $1,7 \leq x < 2$ (identificazione di genere) è risultato invece essere di 9/83 (10.8%), 5/83 (6%) e 3/83 (3,6%) rispettivamente per l'analisi diretta, l'estrusione “in situ” e l'estrusione etanolica (Tabella 1). Da questi dati è emerso quindi che l'estrusione classica seppur più laboriosa e lunga, consente l'identificazione di un maggior numero di specie con risultati migliori anche in termini di ripetibilità.

Per quanto riguarda le singole specie prese in considerazione, tutti i *C. speticum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. multocida*, *R. antipestifer* e *O. rhinotracheale* hanno dato una corretta identificazione di specie con scores $x \geq 2$. 9/10 *E. cecorum* sono stati correttamente identificati a livello di specie (score $x \geq 2$) mentre il restante ceppo solo a livello di genere. Sono state identificate a livello di genere con score $x \geq 2$ anche tutte le *Salmonella spp.* 2/10 *G. anatis* hanno dato un'identificazione non affidabile, 1/10 un'identificazione con score $1,7 \leq x < 2$ mentre i restanti 7 ceppi sono stati correttamente identificati.

Per quanto riguarda i micoplasmi, identificazioni con score $x \geq 2$ sono state ottenute solo per 6/37 (16,21%) campioni. *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. melagridis* hanno sempre restituito identificazioni inaffidabili con score intorno a 1 ma tale dato trova riscontro nel fatto che nessun microorganismo appartenente a queste specie è presente nel database dello strumento. Dei 12 *M. gallisepticum* analizzati solo 5 (41.6%) sono stati correttamente identificati, 6 (50%) sono stati erroneamente classificati come *M. ovipneumoniae* e 1 (8.3%) non ha presentato appaiamenti significativi con nessuno dei batteri presenti nel database (Tabella 1).

Specie	n°	Score			% ID corretta
		<1,7	1.7≤x<2	≥2	
<i>Enterococcus cecorum</i>	10	/	1 (10%)	9 (90%)	100%
<i>Clostridium septicum</i>	10	/	/	10 (100%)	100%
<i>Clostridium perfringens</i>	10	/	/	10 (100%)	100%
<i>Escherichia coli</i>	10	/	/	10 (100%)	100%
<i>Salmonella gallinarum</i>	10	/	/	10 (100%)	100% genere
<i>Salmonella pullorum</i>	2	/	/	2 (100%)	100% genere
<i>Pasteurella multocida</i>	5	/	/	5 (100%)	100%
<i>Riemerella anatipestifer</i>	4	/	/	4 (100%)	100%
<i>Ornitobacterium rhinotracheale</i>	12	/	/	12 (100%)	100%
<i>Gallibacterium anatis</i>	10	2 (20%)	2 (20%)	6 (60%)	80%
<i>Mycoplasma synoviae</i>	13	13 (100%)	/	/	0%
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	12	1 (8,3%)	5 (41,6%)	6 (50%)	41.6%
<i>Mycoplasma iowae</i>	9	9 (100%)	/	/	0%
<i>Mycoplasma melagroidis</i>	3	3 (100%)	/	/	0%

Tabella 1. Specie e numero di ceppi analizzati. Valori di score ottenuti e percentuale di identificazione corretta dopo confronto con gli spettri di riferimento inclusi nel database dello strumento.

Tutti i *Mycoplasma spp* indicati in tabella 1 e comprendenti sia ceppi di riferimento che di campo, sono stati quindi nuovamente analizzati e utilizzati per l'implementazione del database dello strumento e l'affidabilità e l'utilità dell'implementazione è stata valutata analizzando in doppio cieco 8 ceppi di campo due per ogni specie presa in considerazione. Utilizzando il database implementato tutti i microorganismi sono stati correttamente identificati con scores ≥ 2.4 (Tabella 2).

Specie	n°	Database Bruker (scores, media±dev.st)	Database implementato (scores, media±dev.st)
<i>Mycoplasma synoviae</i>	2	1,25±0,08	2,58±0,04
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	2	1,33±0,03	2,73±0,05
<i>Mycoplasma iowae</i>	2	1,47±0,26	2,59±0,03
<i>Mycoplasma melagroidis</i>	2	1,28±0,09	2,40±0,07

Tabella 2. Risultati ottenuti per 8 ceppi di campo di *Mycoplasma spp* utilizzando il database Bruker e il database implementato con i ceppi di campo.

DISCUSSIONE

L'identificazione batterica nei laboratori di microbiologia clinica è classicamente basata sull'esecuzione di test fenotipici e/o biochimici spesso laboriosi, *time-consuming* e alcune volte difficilmente interpretabili e che quindi portano frequentemente a risultati imprecisi. Alternativamente ai metodi fenotipi, negli ultimi anni sono stati sviluppati e sempre più utilizzati anche metodi di biologia molecolare basati sulla PCR o sul sequenziamento. Queste metodiche possiedono sicuramente un maggior potere discriminante rispetto ai metodi classici d'identificazione e hanno permesso di ridurre notevolmente i tempi di risposta sono però più costose e richiedono personale con specifiche competenze. La tecnologia MALDI-TOF è stata largamente utilizzata in passato come strumento di ricerca per l'analisi di proteine e solo recentemente è stata applicata alla microbiologia clinica. Comparata con i metodi fenotipici convenzionali o con quelli biomolecolari questa tecnica risulta essere molto più rapida, caratterizzata da alto throughput e da un costo ridotto dei reagenti. Numerosi lavori pubblicati negli ultimi anni allo scopo di valutare l'efficienza e affidabilità di questa metodica in campo umano hanno evidenziato una corretta identificazione in più del 85% delle specie considerate (1-4, 7, 8). In questo studio, escludendo i microorganismi appartenenti al genere *Mycoplasma* che non sono contenuti nel database dello strumento, e considerando solo i risultati ottenuti con estrazione etanolica la percentuale di corretta identificazione a livello di specie con score $\times 2$ è risultata superiore al 93% e quindi perfettamente in linea con i dati riportati in letteratura. Nessun problema di identificazione è stato infatti riscontrato per *C. speticum*, *C. perfringens*, *E. coli*, *P. multocida*, *R. antipestifer* e *O. rhinotracheale*. Alcuni problemi di identificazione sono stati riscontrati invece per *E. cecorum* e *G. anatis* e tale insuccesso può essere spiegato dal numero ridotto di spettri di referenza contenuti nel database dello strumento, rispettivamente 4 per *E. cecorum* e 2 per *G. anatis*. Per quanto concerne i micoplasmi, delle 4 specie prese in considerazione 3 (*M. iowae*, *M. synoviae* e *M. melagridis*) non erano incluse nel database e per tale motivo nessuno dei microorganismi è stato identificato né a livello di specie né di genere. Nel database erano invece presenti due ceppi di riferimento di *M. gallisepticum* ma nonostante ciò una corretta identificazione è stata ottenuta solo in 6 dei 13 ceppi; dei restanti *M. gallisepticum*, 6 sono stati erroneamente identificati come *M. ovipneumoniae* (scores compresi tra 1,750 e 2.4) mentre un ceppo non ha dato alcun appaiamento significativo con nessuno dei ceppi presenti nel database. I ceppi di campo analizzati sono stati quindi utilizzati per l'implementazione del database dello strumento e una prova a doppio cieco con 8 ceppi di campo ha successivamente dimostrato che la mancanza o l'errata identificazione era ascrivibile alla mancanza di adeguati spettri di referenza.

CONCLUSIONI

I nostri risultati dimostrano che lo strumento MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) è in grado di sostituire efficacemente i convenzionali metodi di identificazione dei patogeni aviari riducendo notevolmente il costo e il tempo di risposta. Tuttavia, quanto evidenziato per i microorganismi appartenenti al genere *Mycoplasma*, sottolinea come per alcune specie sia necessaria l'implementazione del database sia con ceppi di referenza che di campo e l'ottimizzazione del protocollo di estrazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom 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. *J Clin Microbiol.* 2010 May;48(5):1549-54.
2. Cherkaoui A, Hibbs J, Emonet S, Tangomo M, Girard M, Francois P, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1169-75.
3. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab.* 2009;55(7-8):289-96.
4. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009 Aug 15;49(4):543-51.
5. Lartigue MF. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for bacterial strain characterization. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:230-5.
6. Demirev PA, Fenselau C. Mass spectrometry for rapid characterization of microorganisms. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* 2008;1:71-93.
7. Van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010 Mar;48(3):900-7.
8. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):693-6.