

TITOLO	<u>Introduzione della Spettrometria di Massa nella routine del Laboratorio di Microbiologia</u>
CONTESTO	<p>La spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF (<i>matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry</i>) (MALDI-TOF MS) è stata recentemente introdotta nei laboratori di microbiologia come metodo rapido, accurato ed economico per l'identificazione di batteri, micobatteri, lieviti e funghi. Questa tecnologia costituisce un'alternativa valida e interessante ai metodi di microbiologia classica e di biologia molecolare ed è applicabile in differenti aree della diagnostica clinica e della ricerca.</p> <p>Dal punto di vista organizzativo l'utilizzo del MALDI-TOF MS migliora notevolmente i tempi e la modalità di refertazione poiché il laboratorio è in grado di comunicare al clinico la specie dell'isolato batterico entro pochi minuti dal riscontro colturale, con un anticipo di 24 ore rispetto all'impiego dei test biochimici tradizionali. Soprattutto in casi clinicamente difficili la segnalazione tempestiva del dato microbiologico può definire la diagnosi e suggerire una terapia antibiotica mirata ed efficace. L'impiego della spettrometria di massa per l'identificazione diretta delle specie microbiche da coltura è soltanto una delle possibili applicazioni di questa tecnologia nei laboratori clinici; recenti pubblicazioni scientifiche ne propongono infatti l'utilizzo per l'identificazione di germi patogeni direttamente da campione clinico (emoculture e altri materiali sterili) e per lo <i>screening</i> rapido di importanti meccanismi di antibiotico-resistenza (meticillino-resistenza; vancomicina-resistenza; produzione di β-lattamasi a spettro esteso)</p>

PROCESSO DI LABORATORIO

La spettrometria di massa MALDI-TOF è una tecnica analitica che consente di misurare in maniera estremamente accurata il peso molecolare di macromolecole di interesse biologico e di determinare la loro identità in base al rapporto massa/carica.

Preparazione del campione

La tecnica prevede che un campione batterico costituito da 10^4 - 10^6 cellule, proveniente da una brodocoltura o da una singola colonia, possa essere analizzato ottenendo in qualche minuto uno spettro di massa i cui segnali sono originati da componenti proteiche ribosomiali o loro frammenti rilasciate in seguito a lisi della parete batterica.

Porzioni di colonie fresche isolate, cresciute in piastra secondo protocolli di routine (18-24 ore), vengono deposte con il puntale di una micro pipetta al centro di uno spot di un "target plate" monouso in policarbonato con l'aggiunta di 1 μ l. di matrice realizzata in materiali organici (acido α -ciano-4-idrossicinnamico) in grado di fungere da fonte di protoni necessari alla ionizzazione dell'analita in esame. In caso di identificazione di miceti lieviti/filamentosi e micobatteri, la procedura differisce da quella standard per l'utilizzo, prima dell'inoculo della matrice, di acido formico o acido trifluoroacetico (TFA) al fine di aumentare l'efficienza di estrazione delle proteine batteriche non facilmente disponibili per l'analisi.

Introdotta il "target plate" nell'apposito vano dello strumento, la matrice viene successivamente bombardata in più punti e ripetutamente con un fascio laser pulsato con frequenza nell'ultravioletto che ne determina la disgregazione e la ionizzazione grazie alla cessione di energia. Il risultato è la disgregazione del campione in numerosissimi frammenti con carica unitaria positiva (cationi monovalenti) costituiti ognuno da porzioni oligopeptidiche associate a porzioni di matrice organica. Una volta vaporizzati (desorbimento), i frammenti vengono accelerati da un campo elettromagnetico adiacente e migrano in senso lineare attraverso il cosiddetto "tubo di volo" per raggiungere e colpire una membrana che rileverà e registrerà le masse ionizzate impattanti in tempi differenti in base alla massa stessa degli ioni.

Mediante il rilevatore di ioni, gli ioni impattanti su di esso vengono misurati nel loro rapporto massa/carica (m/z) potendo così risalire al peso molecolare della molecola analizzata.

Analisi dei risultati

Lo strumento è collegato a un software in grado di acquisire i dati in arrivo, elaborarli in spettri di massa e confrontarli con spettri di riferimento presenti nel database interno. Gli spettri sono acquisiti in modalità lineare positiva nell'intervallo di m/z 2000-20000. Ogni spettro di massa è acquisito sommando 100 spettri (30 è il numero minimo richiesto) in modo da assicurare una media più che significativa e affidabile degli spettri acquisiti in vari punti della colonia. La banca dati del software contiene spettri di riferimento che rappresentano più di 500 specie/sottospecie di batteri, micobatteri, lieviti e funghi

significativamente rappresentativi della popolazione di interesse clinico. Per la costruzione del database sono stati utilizzati ceppi di origine clinica (80-90%) e ceppi di riferimento ATCC (10-15%). Ognuno degli spettri di riferimento è stato costruito utilizzando da 10 a 20 differenti isolati clinici (cresciuti in differenti terreni di coltura, con range di temperatura e tempi di incubazione differenti) in modo da poter includere negli spettri stessi

tutte le possibili varianti di massa derivanti sia da differenze genetiche intra-specie, sia da differenti condizioni di coltura.

Pantoea agglomerans

Acinetobacter Iwoffii

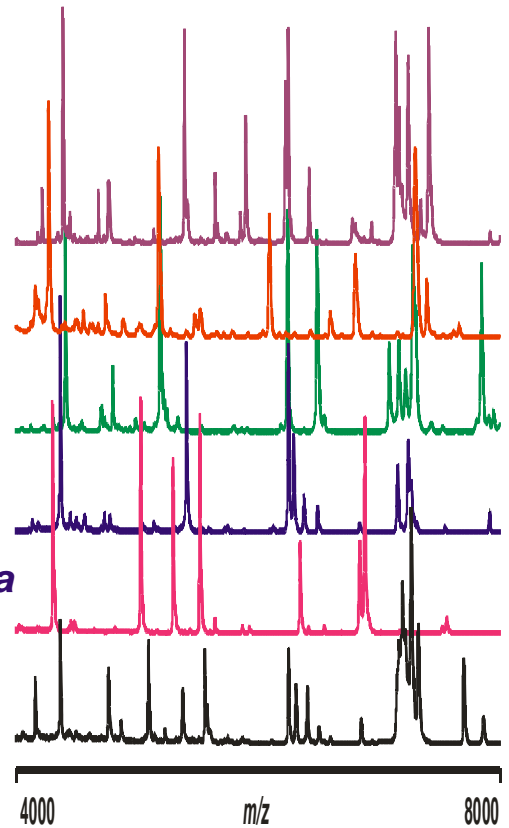
Burkholderia cepacia

Raoultella ornithinolytica

Staphylococcus aureus

Escherichia coli

Esempi di spettri di massa prodotti da VITEK MS



Il grado di corrispondenza con lo spettro tipico di ogni microrganismo presente nel database determina l'attribuzione di un cosiddetto **Valore di Confidenza** che esprime il grado di certezza con cui viene proposta l'identificazione per la specie in esame. Una corrispondenza perfetta tra lo spettro e quello univoco di un singolo organismo, o gruppo di organismi, fornisce una probabilità percentuale del 99,9. Nel caso di una singola specie proposta, se l'intervallo delle probabilità percentuali è compreso tra 60 e 99%, il **Livello di Identificazione** viene giudicato **Buono**. Se la probabilità percentuale ottenuta per qualsiasi specie proposta è < 60, l'organismo **non viene identificato** e si procederà all'identificazione con altre metodiche disponibili in laboratorio. È possibile caricare per ogni "target plate" **24** campioni, riservando a ogni ceppo due aree di analisi. Lo strumento viene calibrato utilizzando come standard un ceppo di *Escherichia coli* ATCC 8739 che dà origine nello spettro di massa a segnali noti; il ceppo ATCC viene depositato in 3 aree diverse da 8 campioni ciascuna in modo da consentire l'utilizzo di uno stesso "target plate" anche in tre sedute distinte. Per ogni seduta è possibile caricare 4 "target plate" per un totale di **96** campioni. Il tempo richiesto per la lettura di un singolo "target plate" completo e la trasmissione dei risultati è di circa 50-60 minuti.

Recentemente è stata realizzata e verrà a breve introdotta nella routine clinica una metodica per l'analisi con spettrometria di massa del brodo di coltura di un flacone di emocoltura risultato positivo dopo 12-18 ore di incubazione nello strumento BacT/ALERT in dotazione in laboratorio.

	<p>Flaconi di ultima generazione contenenti resine anziché carbone permettono di ottenere con un semplice processo analitico di lisi delle cellule ematiche e di filtrazione del brodo un concentrato batterico adeguato per l'analisi con VITEK MS. In un'ora dal segnale di positività è possibile comunicare al clinico una corretta identificazione batterica a conferma del dato morfologico refertato, in contemporanea con la colorazione di Gram.</p>
--	---

STRUMENTI

Il sistema VITEK MS (Biomèrieux) ha permesso l'introduzione in routine della metodologia MALDI-TOF MS per l'identificazione batterica essendo fornito di un database di spettri di riferimento dotato di marchio CE IVD. Il sistema ha creato un collegamento informatico tra lo spettrometro di massa **VITEK MS**, lo strumento **VITEK 2** (già in uso in laboratorio) per l'elaborazione del corrispondente antibiogramma e il **LIS** per la produzione del referto finale.

Il sistema è composto di:

- **Stazione di preparazione (Sample Prep Station)**

Permette mediante lettura di codici a barre l'inserimento nel sistema dei dati del campione (identificativo del materiale, anagrafica del paziente), la creazione di un link sia con la piastra dove viene inoculato il ceppo batterico in esame prima dell'introduzione nello spettrometro, sia con lo strumento VITEK 2, utilizzato per l'esecuzione dell'antibiogramma associato al campione. Si tratta di una postazione di lavoro ove ciascun operatore può preparare contemporaneamente i campioni da analizzare sia con VITEK MS che con VITEK 2. Le postazioni possono essere multiple nello stesso laboratorio in base all'organizzazione (trattamento dei campioni in base ai diversi materiali o alle diverse liste di lavoro) o addirittura in laboratori differenti. Il sistema permette la rintracciabilità dei dati in ogni fase operativa.

- **Spettrometro di massa (VITEK MS)**

Utilizza la tecnica MALDI TOF ed è connesso a un PC che riceve i dati identificativi della piastra porta-campioni, li associa ai risultati ricevuti dallo spettrometro (VITEK MS), visualizza gli spettri di massa generati e li invia al sistema applicativo Myla per l'interpretazione

- **Sistema MYLA**

È un'applicazione software ("middleware") basata sulla tecnologia Web ideata per integrare il flusso di lavoro degli strumenti connessi. Consente di ricevere dal PC dello spettrometro di massa (VITEK MS) i dati di identificazione batterica, di elaborarli, di associarli ai dati dell'antibiogramma ricevuti da VITEK 2 e di inviarli già integrati al LIS per la refertazione finale, previa validazione del dato da parte del personale competente.



**OBIETTIVI,
FINALITÀ E
VANTAGGI
OTTENIBILI**

L'elevata potenzialità del sistema MALDI-TOF MS consente di definire una serie di obiettivi che verranno prossimamente sviluppati, sia nell'ambito della diagnostica microbiologica, sia nell'ottica più generale di gestione dell'attività di laboratorio:

- IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE DI MICRORGANISMI CLINICAMENTE IMPORTANTI:

lo spettro rappresenta un profilo molecolare specifico che individua univocamente il microrganismo analizzato e ne consente l'identificazione rapida con una sensibilità e specificità pari al 90-100% a seconda della specie. A breve il software Myla verrà ulteriormente ampliato di altre 200 specie batteriche permettendo di effettuare l'identificazione di specie di più raro isolamento.

L'impiego di una tecnica così sofisticata è stato ed è in parte ostacolato dai costi elevati dell'apparecchiatura che non tutti i laboratori riescono a sostenere, anche se, impiegato quotidianamente, questo sistema comporta un risparmio in materiali consumabili e consente l'analisi rapida di centinaia di campioni con minimo impiego di personale dedicato. Infatti i costi per l'esecuzione delle identificazioni con MALDI-TOF MS

ammontano all'incirca al 22%-32% dei costi sostenuti con i metodi fenotipici tradizionali.

-IDENTIFICAZIONE MICROBICA DIRETTA DA FLACONI DI EMOCOLTURA entro un'ora dal momento della segnalazione della positività, con un risparmio di 24-48 ore sulla refertazione rispetto al metodo tradizionale.

-SVILUPPO DI UN DATABASE DI RIFERIMENTO più ampio e flessibile. Questo sarà possibile entro pochi mesi, combinando l'attuale software che gestisce il flusso di lavoro e contiene un database di ceppi per lo più di valenza clinica, con un software contenente oltre 3000 spettri per un totale di circa 2000 specie. L'aspetto "flessibile" di questo nuovo sistema consiste nella possibilità di passare dall'uno all'altro database a seconda della necessità e di modificare e aggiungere alla banca dati spettri di microrganismi già analizzati al fine di confrontare tali profili tra loro, oltre che con spettri di riferimento. Questo permetterà di utilizzare la tecnologia MALDI-TOF MS non solo a scopo strettamente diagnostico ma anche per studi epidemiologici e soprattutto di ricerca clinica.

-MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI ANALISI DEGLI SPETTRI PER L'IDENTIFICAZIONE DI MECCANISMI DI RESISTENZA ANTI-MICROBICA: il sistema di analisi così descritto consentirà di confrontare in dettaglio lo spettro di massa ottenuto da un antibiotico in assenza e in presenza di uno specifico isolato. Eventuali modificazioni chimiche indotte dal microrganismo determinano infatti cambiamenti nella massa del composto antibiotico che, rilevati dallo spettrometro di massa, possono confermare o meno la presenza di meccanismi di resistenza. Individuare in poche ore un fenotipo di resistenza permette di indirizzare tempestivamente il clinico sulla scelta terapeutica, specialmente se si tratta di pazienti critici e rappresenta una segnalazione molto utile dal punto di vista epidemiologico per il controllo e la diffusione delle infezioni nosocomiali più gravi.

-NETWORK TRA IL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA CENTRALE E LABORATORI ESTERNI: con VITEK MS è possibile pensare di individuare diverse postazioni di lavoro addirittura in laboratori differenti, dove posizionare più stazioni di preparazione tutte connesse al sistema. Questo consente a più operatori di laboratorio di preparare i campioni e inserirne i dati nel sistema contemporaneamente e da postazioni diverse, con conseguente guadagno di tempo e significativa ottimizzazione del flusso di lavoro. Considerato che la strumentazione monouso può essere trasportata a distanza senza alcun pericolo di deterioramento del campione, è possibile organizzare l'invio del materiale da parte dei laboratori esterni dotati della stazione di preparazione verso un laboratorio centrale munito dello strumento VITEK MS e messo in rete con loro. In un futuro, anche medi e piccoli laboratori potranno quindi usufruire dei vantaggi della tecnologia MALDI-TOF MS con il minimo della strumentazione.

BIBLIOGRAFIA	<ol style="list-style-type: none"> 1. Wieser A., Schneider L., Jung J, Schubert S.. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93: 965–974 2. 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: 1614–1619 3. Emonet S., Shah H. N., Cherkaoui A., Schrenze J.. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology Clin Microbiol Infect 2010; 16: 1604–1613 4. 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: 1620–1625 5. Hyman J.M., Walsh J.D.. Improved method for the immediate identification of pathogens in BacT/ALERT standard aerobic blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. Milan, 21st ECCMID conference, May, 2011; Poster P1825 6. Seng P., Drancourt M., Gouriet F., La Scola B., Fournier P.E., Rolain J.M., Raoult D.. Ongoing revolution in bacteriology :routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry CID 2009; 49: 543-551
	<p><i>Testo redatto da</i> Dr.ssa Paola Cichero - Dr.ssa Silvia Carletti</p>