

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia

XXVIII ciclo

**Applicazione della spettrometria di massa
MALDI-TOF in microbiologia clinica**

**Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in
clinical microbiology**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Adriana Calderaro

Dottoranda:

Dott.ssa Maddalena Piergianni

*“Nessuna conoscenza, se
pur eccellente e salutare, mi darà gioia se la apprenderò per me solo. Se mi
concedesse la sapienza con questa limitazione, di tenerla chiusa in me,
rinunciando a diffonderla, la rifiuterei”*
(Lucio Anneo Seneca)

*alla mia famiglia,
a Vito.*

INDICE

Pagina

Riassunto	1
Abstract	7
Capitolo 1- Proteomica e Spettrometria di Massa	14
1.1 <u>La proteomica</u>	14
1.2 <u>Le tecniche analitiche della proteomica</u>	16
1.2.1 "Sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis" (SDS-PAGE): elettroforesi su gel di poliacrilammide.	16
1.2.2 La spettrometria di massa.	17
1.3 <u>La spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of- Flight (MALDI –TOF MS).</u>	20
1.3.1 Ionizzazione per Desorbimento Laser Assistita da Matrice (MALDI).	20
1.3.2 L'analizzatore a tempo di volo (TOF).	23
1.3.3 Il rivelatore.	25
1.3.4 Applicazioni della spettrometria di massa MALDI-TOF.	25
Capitolo 2. Identificazione mediante MALDI-TOF MS attraverso la creazione di una banca dati dedicata.	29
2.1 <u>Batteriologia</u>	31
2.1.1 <i>Borrelia</i> spp.	31
2.1.1.1 Introduzione	31
2.1.1.2 Materiali e Metodi	36
<i>Cepi utilizzati nello studio e condizioni di crescita</i>	36
<i>Preparazione dei campioni per l'analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	37
<i>Calibrazione dello strumento MALDI-TOF MS</i>	39
<i>Acquisizione degli spettri mediante MALDI-TOF MS</i>	39
<i>Implementazione della banca dati dello strumento e dendrogramma</i>	39
<i>Identificazione</i>	40
<i>Analisi Statistica</i>	40
2.1.1.3 Risultati	41
<i>Analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	41
<i>Analisi Statistica</i>	44
2.1.2 <i>Leptospira</i> spp.	46
2.1.2.1 Introduzione	46
2.1.2.2 Materiali e Metodi	48
<i>Cepi utilizzati nello studio e condizioni di crescita</i>	48
<i>Analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	50
<i>Analisi Statistica</i>	50
2.1.2.3 Risultati	50
<i>Analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	50
<i>Identificazione a livello di sierotipo mediante analisi statistica</i>	53
2.2 <u>Micologia</u>	56
2.2.1 Dermatofiti	56
2.2.1.1 Introduzione	56
2.2.1.2 Materiali e Metodi	59

<i>Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita</i>	59
<i>Analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	60
<i>Biologia molecolare: estrazione, amplificazione e sequenziamento dell'acido nucleico</i>	61
<i>Analisi Statistica</i>	62
2.2.1.3 Risultati	62
<i>Analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	62
<i>Analisi Statistica</i>	70
2.3 <u>Parassitologia</u>	71
2.3.1 <i>Trichomonas vaginalis</i>	71
2.3.1.1 Introduzione	71
2.3.1.2 Materiali e Metodi	74
<i>Ceppi di Trichomonas vaginalis e campioni clinici</i>	74
<i>Analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	74
<i>Limite di sensibilità del MALDI-TOF MS per l'identificazione di ceppi di isolamento clinico</i>	75
2.3.1.3 Risultati	75
2.4 <u>Discussione</u>	78
Capitolo 3. Identificazione mediante MALDI-TOF MS attraverso la rilevazione di marcatori specifici.	83
3.1 <u>Parassitologia</u>	83
3.1.1 <i>Entamoeba histolytica ed Entamoeba dispar</i>	83
3.1.1.1 Introduzione	83
3.1.1.2 Materiali e Metodi	87
<i>Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita</i>	87
<i>Preparazione dei campioni ed analisi mediante MALDI-TOF MS</i>	87
<i>Analisi mediante programma ClinProTools</i>	88
<i>SDS-PAGE ed estrazione delle proteine da gel</i>	89
3.1.1.3 Risultati	90
3.1.1.4 Discussione	98
Capitolo 4. Identificazione indiretta mediante MALDI-TOF MS di meccanismi di resistenza agli antibiotici.	101
4.1 <u>Batteriologia</u>	104
4.1.1. Resistenza agli antibiotici: saggio fenotipico indiretto per la ricerca di <i>Enterobacteriaceae</i> produttori di carbapenemasi.	104
4.1.1.1 Introduzione	104
4.1.1.2 Materiali e Metodi	110
<i>Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita</i>	110
<i>Saggio di idrolisi del meropenem (MHA) mediante MALDI-TOF MS: messa a punto del protocollo</i>	111
<i>Calibrazione dello strumento MALDI-TOF MS per gli intervalli di peso molecolare 100 – 1200 Da e 2000 – 20000 Da</i>	112
<i>Acquisizione degli spettri mediante MALDI-TOF MS</i>	113
<i>Criteri di interpretazione dei risultati ottenuti dal saggio di idrolisi del meropenem (MHA) mediante MALDI-TOF MS</i>	113
<i>Estrazione dell'acido nucleico (DNA) e saggio di amplificazione mediante reazione polimerasica a catena in tempo reale (Real-Time PCR)</i>	114

4.1.1.3 Risultati	115
<i>Saggio di idrolisi del meropenem mediante MALDI-TOF MS: messa a punto del protocollo</i>	115
<i>Analisi dei ceppi di riferimento mediante saggio di idrolisi del meropenem</i>	117
<i>Analisi dei ceppi di isolamento clinico mediante saggio di idrolisi del meropenem</i>	119
<i>Saggio di idrolisi del meropenem a diversi tempi di incubazione</i>	121
4.1.1.4 Discussione	123
Bibliografia.	127
PUBBLICAZIONI <i>IN EXTENSO</i> PRODOTTE NEL CORSO DEL DOTTORATO DI RICERCA.	143

Riassunto

La spettrometria di massa (MS) nata negli anni '70 trova oggi, grazie alla tecnologia Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF), importanti applicazioni in diversi settori: biotecnologico (per la caratterizzazione ed il controllo di qualità di proteine ricombinanti ed altre macromolecole), medico-clinico (per la diagnosi di laboratorio di malattie e per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici mirati), alimentare ed ambientale. Negli ultimi anni, questa tecnologia è diventata un potente strumento anche per la diagnosi di laboratorio in microbiologia clinica, rivoluzionando il flusso di lavoro per una rapida identificazione di batteri e funghi, sostituendo l'identificazione fenotipica convenzionale basata su saggi biochimici.

Attualmente mediante MALDI-TOF MS sono possibili due diversi approcci per la caratterizzazione dei microrganismi: (1) confronto degli spettri ("mass spectra") con banche dati contenenti profili di riferimento ("database fingerprints") e (2) "matching" di bio-marcatore con banche dati proteomiche ("proteome database"). Recentemente, la tecnologia MALDI-TOF, oltre alla sua applicazione classica nell'identificazione di microrganismi, è stata utilizzata per individuare, indirettamente, meccanismi di resistenza agli antibiotici.

Primo scopo di questo studio è stato verificare e dimostrare l'efficacia identificativa della metodica MALDI-TOF MS mediante approccio di comparazione degli spettri di differenti microrganismi di interesse medico per i quali l'identificazione risultava impossibile a causa della completa assenza o presenza limitata, di spettri di riferimento all'interno della banca dati commerciale associata allo strumento. In particolare, tale scopo è stato raggiunto per i batteri appartenenti a spirochete del genere *Borrelia* e *Leptospira*, a miceti filamentosi (dermatofiti) e protozoi (*Trichomonas vaginalis*).

Secondo scopo di questo studio è stato valutare il secondo approccio identificativo basato sulla ricerca di specifici marcatori per differenziare parassiti intestinali di interesse medico per i quali non è disponibile una banca dati commerciale di riferimento e la sua creazione risulterebbe particolarmente difficile e complessa, a causa della complessità del materiale biologico di partenza analizzato e del terreno di coltura nei quali questi protozoi sono isolati.

Terzo ed ultimo scopo di questo studio è stata la valutazione dell'applicabilità della spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF per lo studio delle resistenze batteriche ai carbapenemi. In particolare, è stato messo a punto un saggio di idrolisi dei carbapenemi

rilevata mediante MALDI-TOF MS in grado di determinare indirettamente la produzione di carbapenemasi in *Enterobacteriaceae*.

L'efficacia identificativa della metodica MALDI-TOF mediante l'approccio di comparazione degli spettri è stata dimostrata in primo luogo per batteri appartenenti al genere *Borrelia*. La banca dati commerciale dello strumento MALDI-TOF MS in uso presso il nostro laboratorio includeva solo 3 spettri di riferimento appartenenti alle specie *B. burgdorferi* ss, *B. spielmani* e *B. garinii*. L'implementazione del "database" con specie diverse da quelle già presenti ha permesso di colmare le lacune identificative dovute alla mancanza di spettri di riferimento di alcune tra le specie di *Borrelia* più diffuse in Europa (*B. afzelii*) e nel mondo (come ad esempio *B. hermsii*, e *B. japonica*). Inoltre l'implementazione con spettri derivanti da ceppi di riferimento di specie già presenti nel "database" ha ulteriormente migliorato l'efficacia identificativa del sistema. Come atteso, il ceppo di isolamento clinico di *B. lusitaniae* (specie non presente nel "database") è stato identificato solo a livello di genere corroborando, grazie all'assenza di mis-identificazione, la robustezza della "nuova" banca dati.

I risultati ottenuti analizzando i profili proteici di ceppi di *Borrelia* spp. di isolamento clinico, dopo integrazione del "database" commerciale, indicano che la tecnologia MALDI-TOF potrebbe essere utilizzata come rapida, economica ed affidabile alternativa ai metodi attualmente utilizzati per identificare ceppi appartenenti a questo genere.

Analogamente, per il genere *Leptospira* dopo la creazione *ex-novo* della banca dati "home-made", costruita con i 20 spettri derivati dai 20 ceppi di riferimento utilizzati, è stata ottenuta una corretta identificazione a livello di specie degli stessi ceppi ri-analizzati in un esperimento indipendente condotto in doppio cieco. Il dendrogramma costruito con i 20 MSP-Spectra implementati nella banca dati è formato da due rami principali: il primo formato dalla specie non patogena *L. biflexa* e dalla specie a patogenicità intermedia *L. fainei* ed il secondo che raggruppa insieme le specie patogene *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* e *L. borgpetersenii*. Il secondo gruppo è ulteriormente suddiviso in due rami, contenenti rispettivamente *L. borgpetersenii* in uno e *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. noguchii* nell'altro. Quest'ultimo, a sua volta, è suddiviso in due rami ulteriori: il primo comprendente la sola specie *L. noguchii*, il secondo le specie *L. interrogans* e *L. kirshneri* non separabili tra loro. Inoltre, il dendrogramma costruito con gli MSP-Spectra dei ceppi appartenenti ai generi *Borrelia* e *Leptospira* acquisiti in questo studio, e appartenenti al genere *Brachyspira* (implementati in un lavoro precedentemente condotto) mostra tre

gruppi principali separati tra loro, uno per ogni genere, escludendo possibili mis-identificazioni tra i 3 differenti generi di spirochete.

Un'analisi più approfondita dei profili proteici ottenuti dall'analisi ha mostrato piccole differenze per ceppi della stessa specie probabilmente dovute ai diversi pattern proteici dei distinti sierotipi, come confermato dalla successiva analisi statistica, che ha evidenziato picchi sierotipo-specifici. È stato, infatti, possibile mediante la creazione di un modello statistico dedicato ottenere un "pattern" di picchi discriminanti in grado di differenziare a livello di sierotipo sia i ceppi di *L. interrogans* sia i ceppi di *L. borgpetersenii* saggiati, rispettivamente. Tuttavia, non possiamo concludere che i picchi discriminanti da noi riportati siano universalmente in grado di identificare il sierotipo dei ceppi di *L. interrogans* ed *L. borgpetersenii*; i picchi trovati, infatti, sono il risultato di un'analisi condotta su uno specifico pannello di sierotipi. È stato quindi dimostrato che attuando piccoli cambiamenti nei parametri standardizzati come l'utilizzo di un modello statistico e di un programma dedicato applicato nella routine diagnostica è possibile utilizzare la spettrometria di massa MALDI-TOF per una rapida ed economica identificazione anche a livello di sierotipo. Questo può significativamente migliorare gli approcci correntemente utilizzati per monitorare l'insorgenza di focolai epidemici e per la sorveglianza degli agenti patogeni.

Analogamente a quanto dimostrato per *Borrelia* e *Leptospira*, l'implementazione della banca dati dello spettrometro di massa con spettri di riferimento di miceti filamentosi (dermatofiti) si è rivelata di particolare importanza non solo per l'identificazione di tutte le specie circolanti nella nostra area ma anche per l'identificazione di specie la cui frequenza nel nostro Paese è in aumento a causa dei flussi migratori dalle zone endemiche (*M. audouinii*, *T. violaceum* e *T. sudanense*). Inoltre, l'aggiornamento del "database" ha consentito di superare la mis-identificazione dei ceppi appartenenti al complesso *T. mentagrophytes* (*T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*) con *T. tonsurans*, riscontrata prima dell'implementazione della banca dati commerciale. Il dendrogramma ottenuto dai 24 spettri implementati appartenenti a 13 specie di dermatofiti ha rivelato raggruppamenti che riflettono quelli costruiti su base filogenetica. Sulla base dei risultati ottenuti mediante sequenziamento della porzione della regione ITS del genoma fungino non è stato possibile distinguere *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*, conseguentemente anche gli spettri di queste due specie presentavano picchi dello stesso peso molecolare. Da sottolineare che il dendrogramma costruito con i 12 profili proteici già inclusi nel database commerciale e con i 24 inseriti nel nuovo database non riproduce l'albero filogenetico per alcune specie del genere *Tricophyton*: gli spettri MSP già presenti nel database e quelli aggiunti delle specie

T. interdigitale e *T. mentagrophytes* raggruppano separatamente. Questo potrebbe spiegare le mis-identificazioni di *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* con *T. tonsurans* ottenute prima dell'implementazione del database.

L'efficacia del sistema identificativo MALDI-TOF è stata anche dimostrata per microrganismi diversi da batteri e funghi per i quali la metodica originale è stata sviluppata. Sebbene tale sistema identificativo sia stato applicato con successo a *Trichomonas vaginalis* è stato necessario apportare modifiche nei parametri standard previsti per l'identificazione di batteri e funghi.

Le interferenze riscontrate tra i profili proteici ottenuti per i due terreni utilizzati per la coltura di questo protozoo e per i ceppi di *T. vaginalis* hanno, infatti, reso necessario l'utilizzo di nuovi parametri per la creazione degli spettri di riferimento (MSP-Spectra). L'importanza dello sviluppo del nuovo metodo risiede nel fatto che è possibile identificare sulla base del profilo proteico (e non sulla base di singoli marcatori) microorganismi cresciuti su terreni complessi che potrebbero presentare picchi nell'intervallo di peso molecolare utilizzato a scopo identificativo: metaboliti, pigmenti e nutrienti presenti nel terreno possono interferire con il processo di cristallizzazione e portare ad un basso punteggio identificativo. Per *T. vaginalis*, in particolare, la "sottrazione" di picchi dovuti a molecole riconducibili al terreno di crescita utilizzato, è stata ottenuta escludendo dall'identificazione l'intervallo di peso molecolare compreso tra 3-6 kDa, permettendo la corretta identificazione di ceppi di isolamento clinico sulla base del profilo proteico. Tuttavia, l'elevata concentrazione di parassita richiesta (10^5 trofozoiti/ml) per una corretta identificazione, difficilmente ottenibile *in vivo*, ha impedito l'identificazione di ceppi di *T. vaginalis* direttamente in campioni clinici.

L'approccio identificativo mediante individuazione di specifici marcatori proteici (secondo approccio identificativo) è stato provato ed adottato in questo studio per l'identificazione e la differenziazione di ceppi di *Entamoeba histolytica* (ameba patogena) ed *Entamoeba dispar* (ameba non patogena), specie morfologicamente identiche e distinguibili solo mediante saggi molecolari (PCR) aventi come bersaglio il DNA-18S, che codifica per l'RNA della subunità ribosomiale minore.

Lo sviluppo di tale applicazione ha consentito di superare l'impossibilità della creazione di una banca dati dedicata, a causa della complessità del materiale fecale di partenza e del terreno di coltura impiegato per l'isolamento, e di identificare 5 picchi proteici in grado di differenziare *E. histolytica* da *E. dispar*. In particolare, l'analisi statistica ha mostrato 2 picchi specifici per *E. histolytica* e 3 picchi specifici per *E. dispar*.

L'assenza dei 5 picchi discriminanti trovati per *E. histolytica* e *E. dispar* nei profili dei 3 differenti terreni di coltura utilizzati in questo studio (terreno axenico LYI-S-2 e terreno di Robinson con e senza *E. coli*) permettono di considerare questi picchi buoni marcatori in grado di differenziare le due specie.

La corrispondenza dei picchi con il PM di due specifiche proteine di *E. histolytica* depositate in letteratura (Amoebapore A e un "unknown putative protein" di *E. histolytica* ceppo di riferimento HM-1:IMSS-A) conferma la specificità dei picchi di *E. histolytica* identificati mediante analisi MALDI-TOF MS. Lo stesso riscontro non è stato possibile per i picchi di *E. dispar* in quanto nessuna proteina del PM di interesse è presente in GenBank. Tuttavia, va ricordato che non tutte le proteine *E. dispar* sono state ad oggi caratterizzate e depositate in letteratura. I 5 marcatori hanno permesso di differenziare 12 dei 13 ceppi isolati da campioni di feci e cresciuti in terreno di Robinson confermando i risultati ottenuti mediante saggio di Real-Time PCR. Per un solo ceppo di isolamento clinico di *E. histolytica* l'identificazione, confermata mediante sequenziamento della porzione 18S-rDNA, non è stata ottenuta mediante sistema MALDI-TOF MS in quanto non sono stati trovati né i picchi corrispondenti a *E. histolytica* né i picchi corrispondenti a *E. dispar*. Per questo ceppo è possibile ipotizzare la presenza di mutazioni geno/fenotipiche a livello delle proteine individuate come marcatori specifici per *E. histolytica*. Per confermare questa ipotesi sarebbe necessario analizzare un numero maggiore di ceppi di isolamento clinico con analogo profilo proteico.

L'analisi condotta a diversi tempi di incubazione del campione di feci positivo per *E. histolytica* ed *E. dispar* ha mostrato il ritrovamento dei 5 picchi discriminanti solo dopo 12 ore dall'inoculo del campione nel terreno iniziale di Robinson. Questo risultato suggerisce la possibile applicazione del sistema MALDI-TOF MS per identificare ceppi di isolamento clinico di *E. histolytica* ed *E. dispar* nonostante la presenza di materiale fecale che materialmente può disturbare e rendere difficile l'interpretazione dello spettro ottenuto mediante analisi MALDI-TOF MS.

Infine in questo studio è stata valutata l'applicabilità della tecnologia MALDI-TOF MS come saggio fenotipico rapido per la determinazione di ceppi produttori di carbapenemasi, verificando l'avvenuta idrolisi del meropenem (carbapeneme di riferimento utilizzato in questo studio) a contatto con i ceppi di riferimento e ceppi di isolamento clinico potenzialmente produttori di carbapenemasi dopo la messa a punto di un protocollo analitico dedicato.

Il saggio di idrolisi del meropenem mediante MALDI-TOF MS ha dimostrato la presenza o l'assenza indiretta di carbapenemasi nei 3 ceppi di riferimento e nei 1219 (1185 *Enterobacteriaceae* e 34 non-*Enterobacteriaceae*) ceppi di isolamento clinico inclusi nello studio. Nessuna interferenza è stata riscontrata per i ceppi di *Enterobacteriaceae* variamente resistenti ai tre carbapenemi ma risultati non produttori di carbapenemasi mediante i saggi fenotipici comunemente impiegati nella diagnostica routinaria di laboratorio: nessuna idrolisi del farmaco è stata infatti osservata al saggio di idrolisi mediante MALDI-TOF MS. In un solo caso (ceppo di *K. pneumoniae* N°1135) è stato ottenuto un profilo anomalo in quanto presenti sia i picchi del farmaco intatto che quelli del farmaco idrolizzato. Per questo ceppo resistente ai tre carbapenemi saggiati, negativo ai saggi fenotipici per la presenza di carbapenemasi, è stata dimostrata la presenza del gene *bla_{KPC}* mediante Real-Time PCR. Per questo ceppo si può ipotizzare la presenza di mutazioni a carico del gene *bla_{KPC}* che sebbene non interferiscano con il suo rilevamento mediante PCR (Real-Time PCR positiva), potrebbero condizionare l'attività della proteina prodotta (Saggio di Hodge modificato e Test di Sinergia negativi) riducendone la funzionalità come dimostrato, mediante analisi MALDI-TOF MS, dalla presenza dei picchi relativi sia all'idrolisi del farmaco sia dei picchi relativi al farmaco intatto. Questa ipotesi dovrebbe essere confermata mediante sequenziamento del gene *bla_{KPC}* e successiva analisi strutturale della sequenza amminoacidica deducibile.

L'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF MS per la verifica dell'avvenuta idrolisi del meropenem è risultato un saggio fenotipico indiretto in grado di distinguere, al pari del test di Hodge modificato impiegato comunemente nella routine diagnostica in microbiologia, un ceppo produttore di carbapenemasi da un ceppo non produttore sia per scopi diagnostici che per la sorveglianza epidemiologica. L'impiego del MALDI-TOF MS ha mostrato, infatti, diversi vantaggi rispetto ai metodi convenzionali (Saggio di Hodge modificato e Test di Sinergia) impiegati nella routine diagnostica di laboratorio i quali richiedono personale esperto per l'interpretazione del risultato e lunghi tempi di esecuzione e di conseguenza di refertazione. La semplicità e la facilità richieste per la preparazione dei campioni e l'immediata acquisizione dei dati rendono questa tecnica un metodo accurato e rapido. Inoltre, il metodo risulta conveniente dal punto di vista economico, con un costo totale stimato di 1,00 euro per ceppo analizzato. Tutte queste considerazioni pongono questa metodologia in posizione centrale in ambito microbiologico anche nel caso del rilevamento di ceppi produttori di carbapenemasi.

Indipendentemente dall'approccio identificativo utilizzato, comparato con i metodi convenzionali il MALDI-TOF MS conferisce in molti casi un guadagno in termini di tempo di lavoro tecnico (procedura pre-analitica per la preparazione dei campioni) e di tempo di ottenimento dei risultati (procedura analitica automatizzata). Questo risparmio di tempo si accentua quando sono analizzati in contemporanea un maggior numero di isolati. Inoltre, la semplicità e la facilità richieste per la preparazione dei campioni e l'immediata acquisizione dei dati rendono questo un metodo di identificazione accurato e rapido risultando più conveniente anche dal punto di vista economico, con un costo totale di 0,50 euro (materiale consumabile) per ceppo analizzato.

I risultati ottenuti dimostrano che la spettrometria di massa MALDI-TOF sta diventando uno strumento importante in microbiologia clinica e sperimentale, data l'elevata efficacia identificativa, grazie alla disponibilità sia di nuove banche dati commerciali sia di aggiornamenti delle stesse da parte di diversi utenti, e la possibilità di rilevare con successo anche se in modo indiretto le antibiotico-resistenze.

Abstract

Mass spectrometry (MS), developed in the 70's, thanks to the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) technology has been important applications in different fields: biotechnological (for the characterization and quality control of recombinant proteins and other macromolecules), medical-clinical (for laboratory diagnosis of diseases and for the development of new targeted therapeutic treatments), food and environmental.

In the last few years, MALDI-TOF has become a powerful tool in the clinical microbiology setting and has revolutionised the work-flow also in our laboratory, enabling the rapid identification of bacteria and yeasts for clinical diagnosis, replacing the conventional phenotypic identification based on biochemical assays.

Nowadays, two general MALDI-TOF MS methods have been proposed to characterize microorganisms: (1) mass spectra comparison with fingerprints database and (2) matching of biomarker masses to a proteome database. Recently, an other application of MALDI-TOF MS was proposed for the detection of β -lactamases, especially carbapenemases.

The first aim of this study was to assess the usefulness of a new implemented database for MALDI-TOF MS by using the approach of mass spectra comparison for the identification of bacteria and yeasts for which the previous identification by the commercially available database failed due to the absence, the presence of mistakes or incomplete reference spectra. In particular, this was obtained for bacteria belonging to spirochaetes of the

genera *Borrelia* and *Leptospira*, for filamentous fungi (dermatophytes) and for protozoa (*Trichomonas vaginalis*).

The second aim of this study was to evaluate specific biomarkers for the identification and the differentiation of intestinal parasites for which a reference database is not available and its creation would be difficult due to the complexity of the biological material (faeces) analysed for their detection or the culture media (Robinson's media) used for their cultivation.

The last aim of this study was the evaluation of the applicability of MALDI-TOF MS for the study of the resistance to carbapenem by Gram-negative bacteria. In particular, a carbapenem hydrolysis assay by MALDI-TOF MS was developed in order to detect the carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*.

The main results reported in this study are of some interest for the application of MALDI-TOF MS in a laboratory of clinical microbiology.

The effectiveness of a new database for the identification by MALDI-TOF MS based on the approach of mass spectra comparison was firstly proved for the genus *Borrelia*.

The commercial database of the mass spectrometer currently used in our laboratory (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Germany) for microbial identification, included only 3 reference spectra belonging to the species *B. burgdorferi sensu strictu*, *B. garinii*, and *B. spielmanii*.

The database was supplemented with the missing spectra belonging to *Borrelia* species circulating in Europe (*B. afzelii*) and in the world (such as *B. hermsii* and *B. japonica*), overcoming the lack of reference profile for these species in the commercial MALDI-TOF MS database. Moreover, the supplementation of the database with spectra deriving from other reference strains of the *Borrelia* species already present in the original database provided the evidence of the usefulness of MALDI-TOF MS for a more reliable identification of these bacteria.

The result obtained on a strain of *B. lusitaniae* not included in the original database and identified at genus level only after its supplementation as well as those obtained at species level for the other *Borrelia* spp. clinical isolates, showed that MALDI-TOF MS could be used as a rapid, cheap and reliable alternative to the conventional and routine identification methods in clinical microbiological laboratories to identify strains belonging to this genus.

Similarly, for the genus *Leptospira*, after the "ex-novo" creation of the "home-made" database with 20 reference spectra belonging to 20 reference strains, a correct

identification at species level was obtained for the same strains when a second blind independent experiment was performed.

The dendrogram obtained reflects the phylogenetic tree based on the 16SrRNA sequencing reported in the literature showing *Leptospira* species clustered according to their pathogenicity (pathogenic and saprophytic strains clearly separated into different clusters) and confirms the comparability of the results obtained by mass spectrometry and by molecular typing methods.

L. biflexa and *L. fainei* were located in a branch while *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* and *L. borgpetersenii* clustered in a separate one. The latter was further divided into two groups respectively containing, *L. borgpetersenii* on one side and *L. interrogans*, *L. kirschneri*, and *L. noguchii* on the other side.

Moreover, the dendrogram built with the MSP-Spectra of the strains belonging to the genera *Borrelia* and *Leptospira*, analysed in this study and to the genus *Brachyspira* (supplemented in a previous study) showed 3 main separated clusters, one for each genus, excluding the possible mis-identification among these 3 different genera of spirochaetes.

It was also interesting to observe little differences among the profiles of the analysed *Leptospira* strains within a given species (namely *L. interrogans* and *L. borgpetersenii*, for which more than one strain was analysed), probably due to the presence of differences among the protein patterns of distinct serovars, as subsequently confirmed by using ClinProTools statistical software that showed serovar-specific peaks.

As a matter of fact, after the creation of a statistical algorithm, it was possible to discriminate at serovar level both the *L. interrogans* and *L. borgpetersenii* strains tested. However, we cannot definitely conclude that we identified universal serovar-specific peaks, since we used a selected panel of serovars in this study.

Our results demonstrated that MALDI-TOF MS followed by the analysis with statistical software could be used as a first-line assay for the rapid, cheap and reliable identification of *Leptospira* strains also at the serovar level, limited to those analysed in this study. This features could significantly improve the approaches currently used to monitor the occurrence of epidemiological outbreaks and pathogen surveillance.

As already demonstrated for *Borrelia* and *Leptospira*, the supplementation of the mass spectrometer database with reference spectra of filamentous fungi (dermatophytes) was important not only for the identification of the dermatophytes species more frequently isolated in our area but also for the identification of those species of dermatophytes whose frequency was increased due to migration flows from endemic area (*Microsporium*

audouinii, *Trichophyton violaceum* and, *T. sudanense*). Furthermore, after the database implementation, the mis-identification of *T. interdigitale* and *T. mentagrophytes* as *T. tonsurans* observed with the original database was avoided.

The dendrogram obtained from the spectra of the 24 reference dermatophytes strains supplemented in the new in-house database revealed a clusterization that reflects the phylogenetic taxonomic tree of the dermatophytes reported in literature. However, the reference spectra of *T. interdigitale* and *T. mentagrophytes* segregated in a single cluster with low discrimination, suggesting high similarity between these two species. For this reason, besides MALDI-TOF MS, sequencing of their Internal Transcribed Spacer (ITS) region failed to distinguish between *T. interdigitale* and *T. mentagrophytes*.

Noteworthy, the dendrogram created with the 12 proteic profiles already included in the Bruker Daltonics database and those deriving from 24 dermatophytes additional strains reproduced the reference phylogenetic taxonomic tree for all genera except *Trichophyton*. In particular, the reference spectra of all the strains (both original and additional) belonging to the species *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis*, and *M. gypseum* cluster closely each other and in agreement with the phylogenetic taxonomic tree; on the contrary, the reference spectra already present in the Bruker Daltonics database of the strains belonging to the species, *T. interdigitale* and *T. mentagrophytes*, segregated separately from those implemented in this study. This latter result could explain the persisting mis-identification also after the implementation of the database.

The usefulness of MALDI-TOF MS was also investigated for microorganisms other than bacteria and fungi for which the method was initially developed. The identification protocol was applied to *Trichomonas vaginalis*, by changing in the standard parameters used for bacterial and fungal identification.

The use of new parameters setting for the creation of the reference spectra was necessary to overcome the overlapping of the peaks observed among the proteic profile obtained from the 2 media used in this study for the culture of this protozoan and those obtained from *T. vaginalis* reference strain.

As a matter of fact, metabolite, pigments and/or nutrients contained in the media may interfere with the crystallisation process of the proteins and lead to low identificative score values.

In particular, the peaks ranging from 3 to 6 kDa, including those referring to media components, were excluded from the analysis of clinical isolates.

Due to the low sensitivity of MALDI-TOF MS technology (detection limit of 10^5 trophozoites/ml) the new method did not allow the identification of *T. vaginalis* directly from clinical samples.

MALDI-TOF MS based on the detection of specific biomarkers was applied in order to identify and to differentiate *Entamoeba histolytica* (pathogenic) and *E. dispar* (non-pathogenic), the two genetically distinct but morphologically identical amoebae.

The development of this application allowed to solve the difficulty in the creation of a dedicated database due to the complexity of the faecal material and of the media used for the cultivation (LYI-S-2 axenic medium, Robinson's medium without serum, and Robinson's medium with or without *Escherichia coli*), and to identify 5 specific peaks able to differentiate *E. histolytica* from *E. dispar*. In particular, two discriminating peaks for *E. histolytica* and 3 peaks for *E. dispar* were found. These 5 peaks did not show any interference with those found for the different culture media used for amoeba cultivation. For this reason these 5 discriminating peaks may be considered potential good markers to differentiate *E. histolytica* from *E. dispar*.

The molecular weights of the 2 discriminating peaks of *E. histolytica* were found to correspond only to 2 specific proteins of *E. histolytica* present in GenBank: Amoebapore A and an unknown putative protein of *E. histolytica* HM-1:IMSS-A strain. This result confirmed the specificity of the peaks of *E. histolytica* identified by MALDI-TOF MS analysis. On the contrary, the *E. dispar* specific peaks did not have any correspondence with proteins deposited in GenBank.

In our hands, the 5 discriminating peaks allowed us to differentiate 12 (7 *E. dispar* and 5 *E. histolytica*) of the 13 *Entamoeba* spp. clinical isolates grown in Robinson's medium; the results were in agreement with those obtained by a Real-time PCR able to differentiate *E. histolytica* from *E. dispar*. For one clinical isolate identified as *E. histolytica* by Real-time PCR and by sequencing MALDI-TOF MS failed to discriminate the two species. This result allowed us to hypothesize the presence of amino acid/posttranslational differences in the proteins detected by MALDI-TOF MS for this strain. Further studies would be needed to verify this. However, when using MALDI-TOF MS as first-line diagnostic assay the identification of a similar strain, if any, in the future should be confirmed by Real-time PCR. The analysis performed at different incubation time on a faecal sample positive for *E. histolytica*, showed that specific peaks were detected even after 12h of incubation in Robinson's medium without serum, that is the first step before the transfer of an aliquot in the complete medium when the culture for protozoa is performed. This result underlines

the reliability of the discriminating peaks used in this study: they were detected also in the presence of fecal material.

Finally, we evaluated the applicability of MALDI-TOF MS as a rapid phenotypic assay for the detection of carbapenemase-producing bacterial strains, by developing a modified protocol based on the hydrolysis of the meropenem used as reference carbapenem both on reference and clinical strains.

The meropenem hydrolysis assay by MALDI-TOF MS was performed on 3 reference strains and on 1219 clinical isolates (1185 *Enterobacteriaceae* and 34 non-*Enterobacteriaceae*).

All results obtained, except one, were concordant with those obtained by the conventional phenotypic assays (Modified Hodge Test, MHT and disk diffusion inhibition Test, Sinergy Test, ST) routinely used in the majority of the diagnostic microbiology laboratories. The discordant result was referred to a *Klebsiella pneumoniae* strain, nonsusceptible to carbapenems and carbapenemase non-producer as assessed by MHT and ST, but positive to Meropenem Hydrolysis Assay (MHA). The spectra obtained by MHA showed the presence of both the peaks of intact meropenem and those of the hydrolysed drug. For this strain the genotypic analysis confirmed the MHA result by revealing the presence of the *bla*_{KPC} gene.

This is consistent with a low-expression of carbapenemase and it would have been missed by using only MHT and ST. This hypothesis should be confirmed by sequencing of the *bla*_{KPC} gene and by the analysis of the deduced amino acid sequence.

The meropenem hydrolysis assay by MALDI-TOF MS revealed to be an indirect phenotypic assay able to distinguish, as MHT commonly used as first line assay in clinical diagnostic laboratory, a carbapenemase-producing from a carbapenemase-non-producing strain both for diagnostic purpose and epidemiological surveillance.

Compared to conventional methods used in the routine diagnostic laboratories which require trained personnel for the interpretation of the result and long execution times, the MHA by MALDI-TOF MS showed several advantages. The simple and easy preparation of samples, as well as the immediate acquisition of the data makes this technique a fast, cheap and reliable method for the detection of carbapenemase-producing strains.

In conclusion, compared MALDI-TOF MS, independently from the approach used for the identification of microorganisms, confer in most cases a significant gain of both technician working time (preanalytical procedure to prepare samples) and turnaround time (automated analytical procedure to obtain results).

The time effectiveness gained with MALDI-TOF identification compared with conventional identification approaches is even more accentuated when several isolates are analysed in parallel.

Finally, the flexibility of the system, simplicity in the sample preparation, and the automatic acquisition of the data makes MALDI-TOF MS a rapid, accurate, and cost-effective (about 0.50/1.00 Euros per sample) method for microbial characterization and identification.

All these results demonstrated that MALDI-TOF MS is becoming an important tool both in clinical and in experimental microbiology, thanks to the high efficiency in the microbial identification, due to the availability of both new commercial and in-house libraries, and to the possibility to successfully detect the bacterial resistance to antibiotic.

Capitolo 1. Proteomica e Spettrometria di Massa

1.1 La proteomica

La proteomica è considerata una scienza estremamente giovane, infatti venne definita per la prima volta solo nel 1995 come “l’insieme dei prodotti funzionali espressi da un genoma” (Kahn et al., 1995). Tuttavia, già in precedenza Norman G. Anderson, aveva intuito l’importanza di un progetto proteoma: riteneva infatti che i veri attori biologici, su cui concentrarsi per comprendere i meccanismi molecolari dell’insorgenza delle malattie ed il più intimo meccanismo di azione dei farmaci, fossero le proteine (Anderson e Anderson, 1982). Coniato per analogia con il vocabolo “genomica”, il termine proteomica definisce l’analisi sistematica di un profilo di proteine (in un tessuto, in una cellula o in un comparto subcellulare) in un preciso istante questo permette di decodificare le informazioni derivanti dalla genomica, identificando la proteina codificata dalla sequenza di un particolare gene e determinandone struttura, funzione e possibili modificazioni post-traduzionali (Wilkins et al., 1996).

La proteomica risulta essere una scienza più complessa della genomica (Pandey, 2000), in particolare, per due elementi che caratterizzano un proteoma: la grande complessità e l’elevato dinamismo (Alberts, 2009). Il primo è correlato alla molteplicità delle molecole proteiche che possono derivare dall’espressione di un singolo gene. Infatti, una delle scoperte più rilevanti di questa nuova era post-genomica è la non assoluta validità del vecchio paradigma secondo cui ad un gene corrisponde una proteina: da un singolo gene può avere origine un eterogeneo gruppo di proteine a causa di modificazioni post-traduzionali o processi di “splice variant”, che caratterizzano il prodotto maturo incrementando la variabilità di una singola proteina. Isoforme, varianti e prodotti di modificazione post-sintetica non vengono così evidenziati con la sola informazione genomica. Parte della ricerca proteomica è volta a fornire una fotografia di uno stato cellulare, cioè una rappresentazione spaziale e temporale del suo contenuto proteico, comprendente anche tutte le varianti molecolari che dai singoli geni hanno origine. Progetti di questo tipo sono definiti più recentemente come “proteomica sistematica” o “profili di espressione proteica”.

L’elevato dinamismo, secondo elemento che caratterizza un proteoma, rispecchia l’eterogeneo contenuto proteico di una cellula, che cambia a seconda delle condizioni in cui essa si trova (fase del ciclo cellulare, condizione di stress, trattamento farmacologico e/o stato patologico) (Anderson e Anderson, 1988). Conseguenza dell’elevato dinamismo

dell'espressione genica è lo sviluppo di molteplici progetti rivolti alla caratterizzazione specifica delle differenze del contenuto proteico nei diversi compartimenti subcellulari, nei complessi multiproteici e nei sistemi implicati nella trasduzione del segnale. Elemento essenziale in questo tipo di analisi è la determinazione quantitativa del contenuto proteico, soprattutto in relazione a fenotipi cellulari prodotti da agenti diversi.

Un'altra caratteristica peculiare della proteomica è l'approccio alla ricerca rispetto alle classiche scienze biologiche. Con le tecniche classiche un ricercatore avanza un'ipotesi a priori confermandola o smentendola con un esperimento realizzato ad hoc; al contrario, con la proteomica, l'approccio più utilizzato è l'analisi in "toto" del sistema di interesse. Il confronto fra un tessuto sano ed uno malato, ad esempio, può mostrare un gran numero di proteine alterate. Ma è solamente l'identificazione di tutte queste proteine e della loro funzione che permette, a posteriori, di comprendere il complesso meccanismo di insorgenza e progressione di una malattia (Jungblut et al., 1999). Questo tipo di analisi consente di comprendere e stabilire l'identità, la quantità, la struttura e le funzioni biochimiche e cellulari di tutte le proteine in un organismo, inoltre, permette di descrivere come queste proprietà varino nello spazio, nel tempo o in un determinato stato fisiologico (figura 1.1).

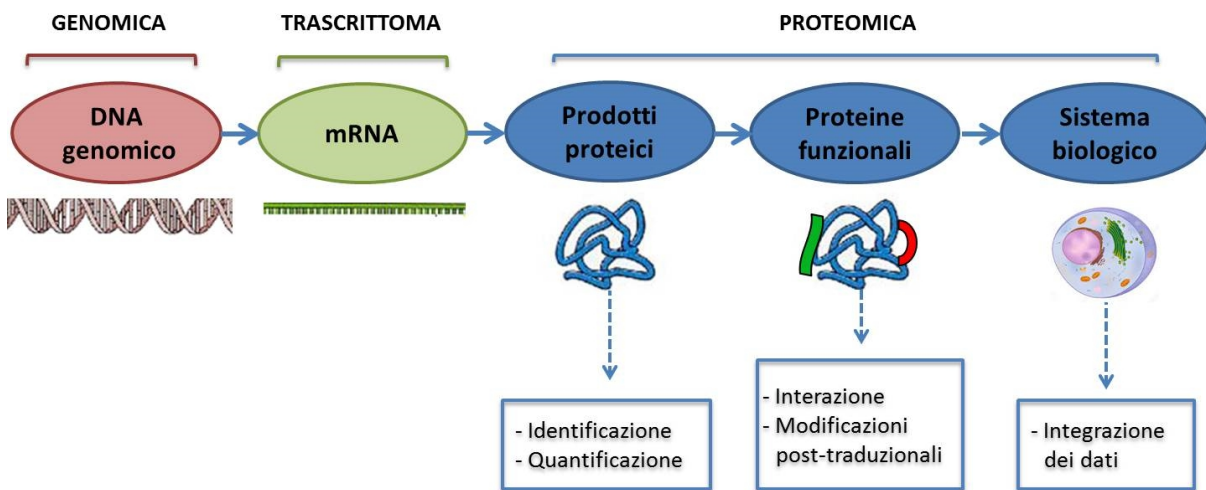


Figura 1.1. Dalla genomica alla proteomica: integrazione delle informazioni dal genoma al proteoma per la comprensione dei sistemi biologici.

La proteomica, si basa sull'impiego di tecniche molto diverse tra loro che prevedono la combinazione di approcci sperimentali, informatici e biochimici che permettono l'identificazione e la caratterizzazione di un numero elevato di proteine differenti. Molte di queste tecniche sono ancora in fase di perfezionamento soprattutto in termini di semplicità, automatizzazione nonché sensibilità: proteine o peptidi poco rappresentati o sconosciuti,

che potrebbero risultare rilevanti, possono rischiare di essere celate da altre proteine abbondantemente rappresentate.

Nella sua espressione più classica, il termine proteomica indica lo studio condotto attraverso la separazione di un determinato campione proteico per mezzo di elettroforesi bidimensionale (2-DE), seguita dall'identificazione dei singoli "spot" mediante l'ausilio della spettrometria di massa (Del Rio et al., 2003; Crawford et al., 2005).

1.2 Le tecniche analitiche della proteomica

1.2.1 "Sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis" (SDS-PAGE): elettroforesi su gel di poliacrilammide

La separazione elettroforetica fu introdotta da O' Farrell e Klose nel 1975 (O'Farrel et al., 1975; Klose et al., 1975). Tale tecnica permette ad esempio di separare miscele di proteine in soluzione facendole migrare in risposta ad un campo elettrico. Una miscela di proteine può, infatti, essere separata in base al punto isoelettrico, rappresentato dal pH al quale la carica elettrica netta della proteina è nulla. Le proteine vengono fatte migrare attraverso un gradiente di pH fino a che la somma delle cariche positive e negative si annullano ("isoelettrofocusing") e la proteina non sarà più in grado di muoversi, indipendentemente dalla forza del campo elettrico applicato. La focalizzazione isoelettrica può essere combinata con l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in SDS per ottenere separazioni ad altissima risoluzione (SDS-PAGE o elettroforesi su gel di poliacrilammide). La prima migrazione, ovvero la focalizzazione isoelettrica, avviene in un cilindro molto ristretto successivamente caricato, in presenza di SDS, in un gel di poliacrilammide. Questa volta, le proteine migreranno ortogonalmente rispetto alla migrazione in isoelettrofocusing e verranno separate in base alla loro massa. Modificando la concentrazione del polimero, è possibile privilegiare la separazione in specifici intervalli di peso molecolare (PM). Le proteine così separate possono essere ulteriormente analizzate. Con la combinazione di queste due tecniche le uniche proteine a non poter essere separate sono quelle caratterizzate da identico punto isoelettrico e da stessa massa. Tuttavia, mediante elettroforesi bidimensionale è possibile separare proteine che differiscono di un singolo aminoacido, a patto che questa differenza modifichi il PM della molecola stessa (Figura 1.2) (Herbert, 1999). I limiti dell'elettroforesi bidimensionale risiedono nell'impossibilità di separare molecole idrofobiche (come le proteine di membrana) di identificare proteine con un PM che non rientra nel pannello dei markers utilizzati come standard o proteine presenti a basse concentrazioni.

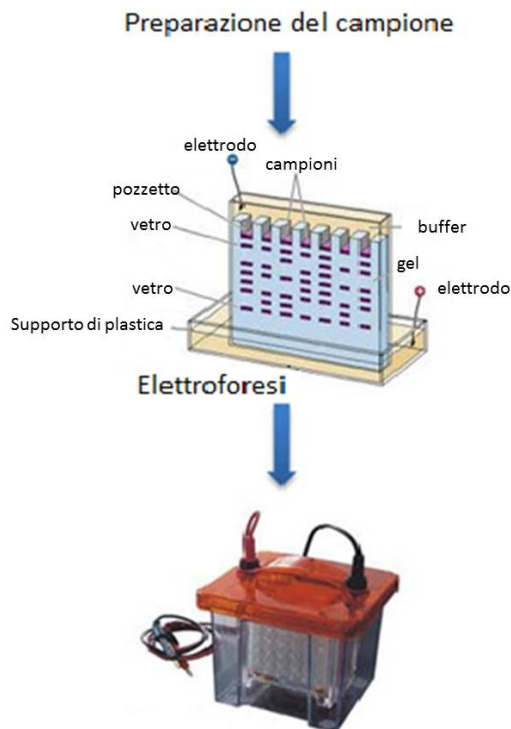


Figura 1.2. Separazione delle proteine mediante SDS-PAGE. Modificata da www.proteomics.case.edu/proteomics/westernblot.html.

1.2.2 La spettrometria di massa

Il ridotto rischio di errore nella misurazione e la possibilità di effettuare analisi a livelli di sensibilità eccezionalmente elevati ha reso la spettrometria di massa uno strumento particolarmente adatto ad analizzare le quantità proteiche tipiche delle analisi proteomiche. L'identificazione di una proteina può essere oggi effettuata a partire da limitate informazioni strutturali sulla componente proteica, mediante ricerca di similitudini o identità in banche dati di sequenze amminoacidiche sempre più curate e mediante algoritmi di ricerca sempre più sofisticati. Tra le strategie principali utilizzate in tale ambito vi è la tecnica del "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF) (Rappsilber et al., 2002) che presenta buona sensibilità e adattabilità di analisi anche in un numero elevato di campioni. Una serie di algoritmi disponibili commercialmente o in rete permette di valutare in termini di significatività statistica l'analita oggetto di studio mediante il confronto tra "impronta sperimentale" ed "impronta virtuale" (James et al., 1994). La spettrometria di massa si è rivelata efficace non solo nell'identificazione delle proteine ma anche nella determinazione di modificazioni post-traduzionali (Jensen et al., 2004) e più recentemente anche nell'ambito della quantificazione relativa delle proteine in presenza o assenza di marcatura isotopica (Romijn et al., 2003).

Uno spettrometro di massa consiste di quattro componenti principali: la sorgente, dove avviene la ionizzazione dell'analita e il passaggio allo stato gassoso; l'interfaccia, che assicura la desolvatazione, il trasporto e la focalizzazione degli ioni verso l'analizzatore; l'analizzatore, dove gli ioni sono separati in funzione del loro rapporto massa su carica (m/z); il rivelatore (detector), che permette di rilevare e registrare gli ioni (Figura 1.3).

Il principio su cui si basa è la separazione di una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) generalmente tramite campi elettrici e magnetici, statici o oscillanti (Lewis et al., 2000). La presenza della carica, positiva o negativa è un presupposto essenziale per poter analizzare le molecole mediante spettrometro di massa; in assenza di carica, infatti, non sarebbero soggette all'azione di campi elettrici o magnetici presenti negli analizzatori. Una volta generati, gli ioni devono essere selezionati, separati e indirizzati al rivelatore (detector). Per ottenere una buona risoluzione tutti gli analizzatori sono mantenuti in condizioni di alto vuoto (pressione minima di 10^{-6} mbar), grazie a pompe che aspirano l'aria all'interno dello strumento; questo permette di separare gli ioni in base alla quantità di moto. Le molecole di gas atmosferico eventualmente presenti, infatti, colliderebbero con gli ioni, variandone l'energia cinetica, peggiorando il rapporto segnale/rumore di fondo e, di conseguenza, la risoluzione. Il diagramma che riporta l'abbondanza relativa di ogni ione in funzione del rapporto massa/carica è il cosiddetto spettro di massa. Esso comprende picchi con valori di massa/intensità corrispondenti a tutti gli analiti presenti nella sostanza (ovvero tutte le molecole che possiedono una massa e sono ionizzabili). Il numero di picchi osservati in uno spettro di massa è sempre maggiore di quello atteso anche perché ogni picco è accompagnato da picchi satelliti, prodotti da ioni contenenti isotopi dei vari elementi (Croxatto et al., 2012).

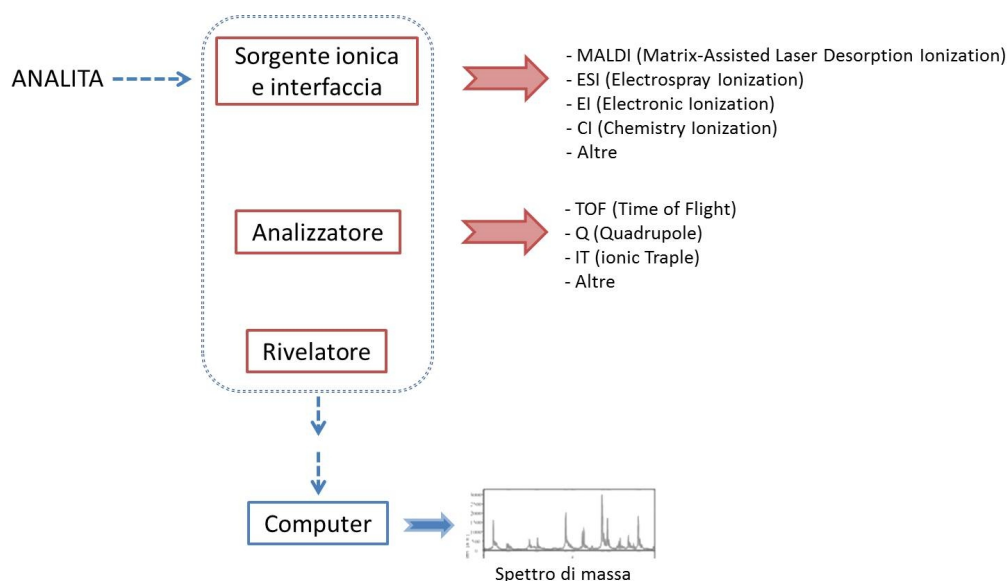


Figura 1.3. Rappresentazione schematica delle componenti di uno spettrometro di massa.

Sebbene tutti i principi dei moderni analizzatori di massa fossero ben noti sin dagli anni quaranta, la ionizzazione di biopolimeri intatti come peptidi, proteine, carboidrati ed oligonucleotidi è stata per lungo tempo una fase limitante per l'analisi degli stessi (Grossert et al., 2001). Fino alla fine degli anni sessanta, la ionizzazione veniva realizzata attraverso impatto elettronico (EI) (Neir, 1947) o ionizzazione chimica (CI) (Munson e Field 1966). Nell'EI, la ionizzazione del campione avviene mediante il bombardamento di molecole gassose con un fascio di elettroni ad alta energia. La CI produce ioni $[M+H]^+$ attraverso un blando processo di trasferimento di protone ad una molecola campione esposta ad un forte eccesso di gas reagente ionizzato. Entrambe queste tecniche di ionizzazione richiedono un campione da analizzare relativamente volatile ed inducono un'estensiva decomposizione dell'analita limitandone l'uso solo a piccole molecole. Tali limitazioni sono state superate con l'introduzione di nuovi metodi di ionizzazione, tra questi il desorbimento da campo ("Field desorption") (Beckey, 1969), la spettrometria di massa di ioni secondari ("Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS") (Benninghoven et al., 1978), il bombardamento con atomi veloci (Fast Atom Bombardment, FAB) (Barber et al., 1981) e desorbimento in plasma (Plasma Desorption, PD) (Vestal, 2001). Pur avendo un grande impatto sulla spettrometria di massa applicata alla biologia, le sopracitate tecniche innovative di ionizzazione presentavano comunque i limiti connessi al PM delle molecole da analizzare (< di 20 kDa) ed alla quantità di campione da analizzare. Lo sviluppo a metà degli anni '80 dei metodi di ionizzazione "soft", quali la ionizzazione per desorbimento laser assistita da matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) (Tanaka et al., 1988) e la ionizzazione per elettronebulizzazione ("Electrospray Ionization, ESI") (Yamashita e Fenn

1984), ha permesso di determinare in modo routinario la sequenza amminoacidica di peptidi, proteine intere e complessi proteici, di verificare la corrispondenza tra struttura primaria di una proteina e sequenza codificata nel DNA, e, infine, di identificare possibili modificazioni post-trasduzionali di una proteina (Reinders et al., 2004).

1.3 La spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight (MALDI –TOF MS)

La spettrometria di massa MALDI-TOF è una tecnica analitica che permette l'analisi di macromolecole polari come peptidi, proteine e DNA, in generale, di biopolimeri in una gamma di massa in teoria illimitata ma che nella pratica va da 1 a 500 KDa. E' un metodo molto sensibile, che consente di utilizzare quantità molto ridotte di campione (da 10^{-3} a 10^{-6} pmoli) con un'accuratezza dello 0.1 - 0.01 % (Croxatto et al., 2012). Per tali ragioni la spettrometria di massa MALDI-TOF è considerata una delle tecniche più potenti negli studi di proteomica.

1.3.1 Ionizzazione per Desorbimento Laser Assistita da Matrice (MALDI)

Il desorbimento del laser, principio su cui attualmente la tecnologia MALDI si fonda, è stato per la prima volta utilizzato da Posthumus nel 1978 (Posthumus et al., 1978) per produrre peptidi intatti in fase gassosa a partire da campioni solidi. Questa tecnica di volatilizzazione richiedeva la stretta conoscenza dei parametri fisici dei peptidi analizzati (come ad esempio lunghezza d'onda d'assorbimento, volatilità, etc.) e non consentiva l'osservazione di peptidi intatti con PM > di 1000 Da. Tali limitazioni sono state superate grazie allo sviluppo delle metodiche FAB e PD. La metodica FAB, introdotta da Micheal Barber utilizza una matrice liquida per inglobare l'analita prima della sua ionizzazione attraverso irradiazione con atomi di argon o xenon (Barber et al., 1981). L'impiego di una matrice è anche alla base della metodica PD che, con l'introduzione della nitrocellulosa (Jonson et al., 1986) e del glutatione (Alai et al., 1986), ha permesso la ionizzazione di proteine con PM fino a 20 kDa. I primi successi arrivarono quando due gruppi indipendenti, quello di Hillenkamp e Karas (1985-1988) (Hillenkamp e Karas, 1990) e quello di Tanaka (1988) (Tanaka et al., 1988), combinarono la tecnologia laser con l'utilizzo di una matrice per assistere il desorbimento/ionizzazione degli analiti consentendo la visualizzazione di molecole con masse anche superiori a 100.000 Da. Tale tecnologia subì un repentino sviluppo con il cambiamento della lunghezza d'onda del laser, con la scoperta di nuove matrici e con l'evoluzione di metodi di preparazione del campione (Karas et al., 1990, Strupat et al., 1991; Beavis et al., 1992; Vorm et al., 1994).

Le matrici utilizzate per la tecnologia MALDI sono acidi di basso PM che permettono l'assorbimento di una radiazione UV/IR e la trasmissione dei fotoni emessi dal laser all'analita garantendone il passaggio allo stato gassoso senza danneggiarlo. La matrice co-cristallizza il campione evitando l'aggregazione di molecole dell'analita e impedisce la distruzione del campione assorbendo la potenza del laser e trasferendo al campione l'energia necessaria al desorbimento (Figura 1.4). Il desorbimento diventa così indipendente dalle proprietà intrinseche dell'analita, mentre la scelta della matrice diventa un punto cruciale sia in funzione del tipo di campione da analizzare sia in funzione del tipo di analisi condotta (modalità lineare o reflector) (Croxatto et al., 2012).

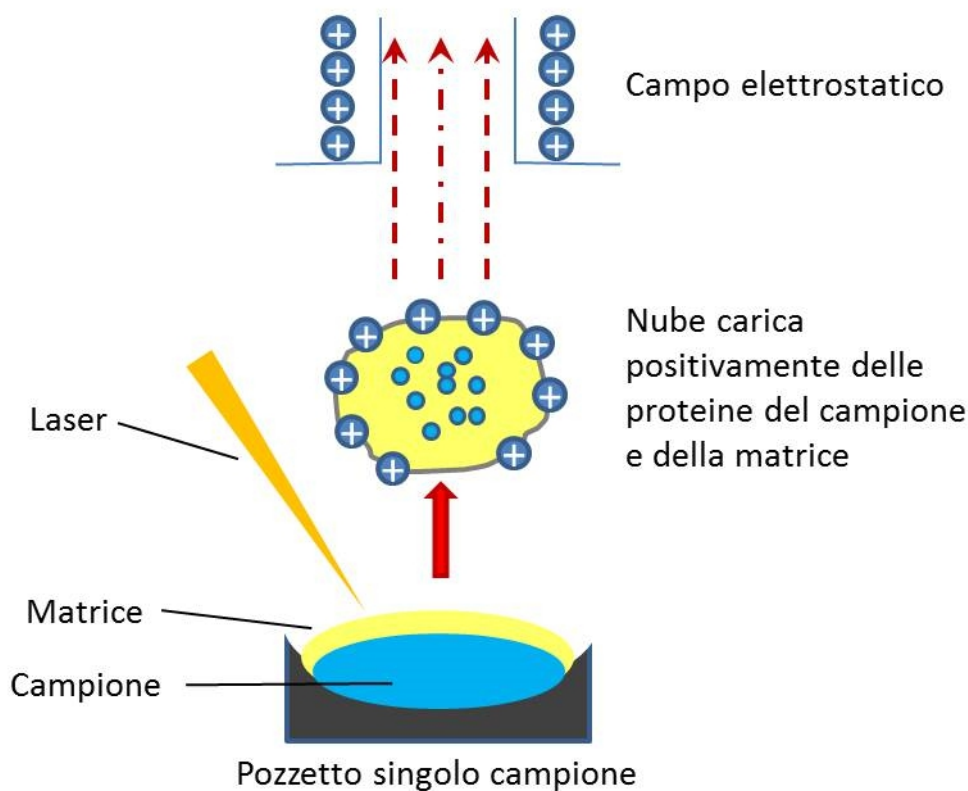


Figura 1.4. Rappresentazione schematica del processo di ionizzazione. Modificata da Croxatto et al., 2012.

La classificazione delle matrici dipende dalla loro temperatura di sublimazione: l'aumento di tale valore è direttamente proporzionale all'energia liberata. Un numero elevato di materiali sono stati saggiati come matrici e soltanto pochi sono risultati essere soddisfacenti. Le principali matrici diventate oggi di uso routinario nelle analisi di proteomica sono molecole organiche con basso peso molecolare che generalmente contengono gruppi funzionali acidi, in grado di cedere facilmente un protone all'analita; tra queste si annoverano l'acido sinapico (SA) per proteine aventi peso molecolare superiore a 15 KDa (Reinders et al., 2004), l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA) (Beavis et al., 1992) usato con peptidi e

proteine di peso molecolare inferiore a 15 kDa ed alcuni derivati benzoici come l'acido di-idrossibenzoico (DHB) per peptidi molto piccoli, (Aebersold et al., 2001) (Tabella 1.1). La matrice, inoltre, non deve presentare reattività chimica nei confronti del campione, deve avere un'elevata stabilità nel vuoto e un'elevata assorbanza alle lunghezze d'onda del laser (Aebersold et al., 2001).

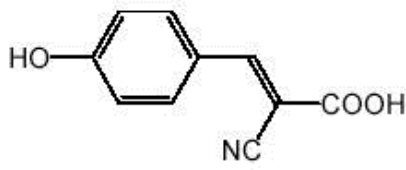
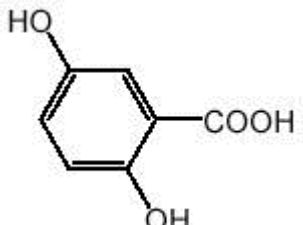
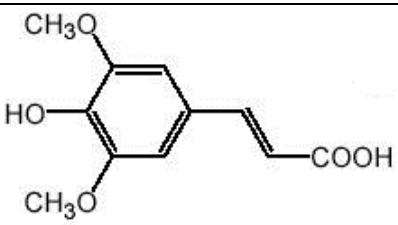
Matrice	Massa monoisotopica [M+H] ^{ca}	Applicazioni
 <p>acido α-ciano-4-idrossicinnamico</p>	190,0502	Peptidi e Proteine di piccole dimensioni (>10 kDa) Lipidi Carboidrati
 <p>acido 2,5-di-idrossibenzoico</p>	155	Peptidi Proteine Carboidrati Glicoproteine Glicolipidi Polimeri Lipidi Molecole organiche
 <p>acido sinapinico</p>	225,0763	Peptidi Proteine di grosse dimensioni (10-150 kDa) Glicoproteine Proteine di membrana
2,4,6-tri-idroacetofenone	-	Oligonucleotidi < 3,5 kDa
acido 3-idrossipicolinico	-	Oligonucleotidi
6-aza-2-tiotimina	-	DNA

Tabella 1.1. Matrici più utilizzate per le analisi MALDI-TOF MS e relative applicazioni.

La selezione della la matrice è seguita dalla scelta del metodo di cristallizzazione della soluzione da analizzare su un apposito supporto, prima di essere inserito nello spettrometro di massa. La tipologia di cristallizzazione varia in base alla natura dell'analita ed al tipo di analisi da condurre e può condizionare la riproducibilità, la risoluzione e, in generale, la qualità dei risultati. Le indicazioni relative ai metodi da adottare sono

molteplici, ma è sempre l'esperienza dell'operatore a determinare la scelta del tipo di cristallizzazione da usare. I due metodi maggiormente utilizzati per le analisi di peptidi preparati in soluzione sono: il metodo della goccia secca ed il metodo della preparazione a "sandwich". Nel primo metodo una soluzione satura di matrice è direttamente mescolata al campione e depositata sul pozzetto della piastra dedicata, provvedendo alla sua evaporazione sotto vuoto. I cristalli generati da questo metodo sono piuttosto grossi e a rischio di eterogeneità e questo può portare ad ottenere somma di più spettri, bassa risoluzione e bassa riproducibilità. Nel metodo della preparazione a "sandwich" un primo strato di matrice satura viene depositato sulla piastra "target" dedicata utilizzando un solvente molto volatile dalla cui veloce evaporazione si generano cristalli di matrice. Si provvede poi al deposito di una goccia di analita seguita da un altro strato di matrice. I cristalli generati sono piccoli e omogenei garantendo una buona riproducibilità. La presenza di eventuali sali e molecole organiche (contaminanti) può interferire con la cristallizzazione della matrice nonché competere con la ionizzazione dei peptidi e sopprimerne il segnale. La formazione di addotti tra peptidi e contaminanti può portare nello spettro a misure ambigue. In genere, per eliminare tali "contaminanti" è sufficiente il lavaggio del deposito cristallizzato con una goccia di acqua acidulata.

Una volta che il campione è cristallizzato sulla piastra dedicata all'analisi MALDI, tale supporto viene inserito all'interno dello strumento mediante un sistema che permette il mantenimento del vuoto sia all'interno della sorgente di ionizzazione che dell'analizzatore, impedendo così l'ingresso nello spettrometro a molecole di ossigeno, azoto ed altri gas presenti nell'aria. La presenza di queste molecole, infatti, provocherebbe collisioni con le molecole dell'analita e determinerebbe la frammentazione delle stesse e la possibilità di reazioni chimiche indesiderate, come ad esempio ossidazioni.

1.3.2 L'analizzatore a tempo di volo (TOF).

La sorgente MALDI è in genere associata a un analizzatore a tempo di volo TOF (Time Of Flight). Il concetto di separazione degli ioni secondo il loro rapporto massa/carica in funzione del loro tempo di volo risale al 1946 (Stephens et al., 1946), ma l'elettronica di acquisizione e rivelazione non erano ancora sufficientemente sviluppate per poter rendere utilizzabile questo tipo di analizzatore. Solo anni dopo, in seguito allo sviluppo della sorgente MALDI (Karas et al., 1988), l'analizzatore TOF iniziò ad essere efficacemente utilizzato: a seguito dell'irradiazione con luce laser avvengono essenzialmente due processi, ovvero l'ablazione o desorbimento del cristallo e la ionizzazione dell'analita. Gli ioni prodotti sono espulsi a pacchetti che vengono accelerati da una differenza di potenziale

decescente (da 20 a 15kV) che conferisce la stessa energia cinetica agli ioni formati. Tali ioni vengono quindi trasferiti nel tubo di volo nel quale viene generato un alto vuoto (10^{-7} mbar). A questo punto si separano in base alla loro massa ed il tempo impiegato per arrivare al detector è proporzionale alla radice quadrata del loro rapporto massa/carica (m/z) (Figura 1.5). Maggiore sarà la massa della proteina, più lentamente raggiungerà il detector. Il tempo di volo è quindi inversamente proporzionale alla massa.

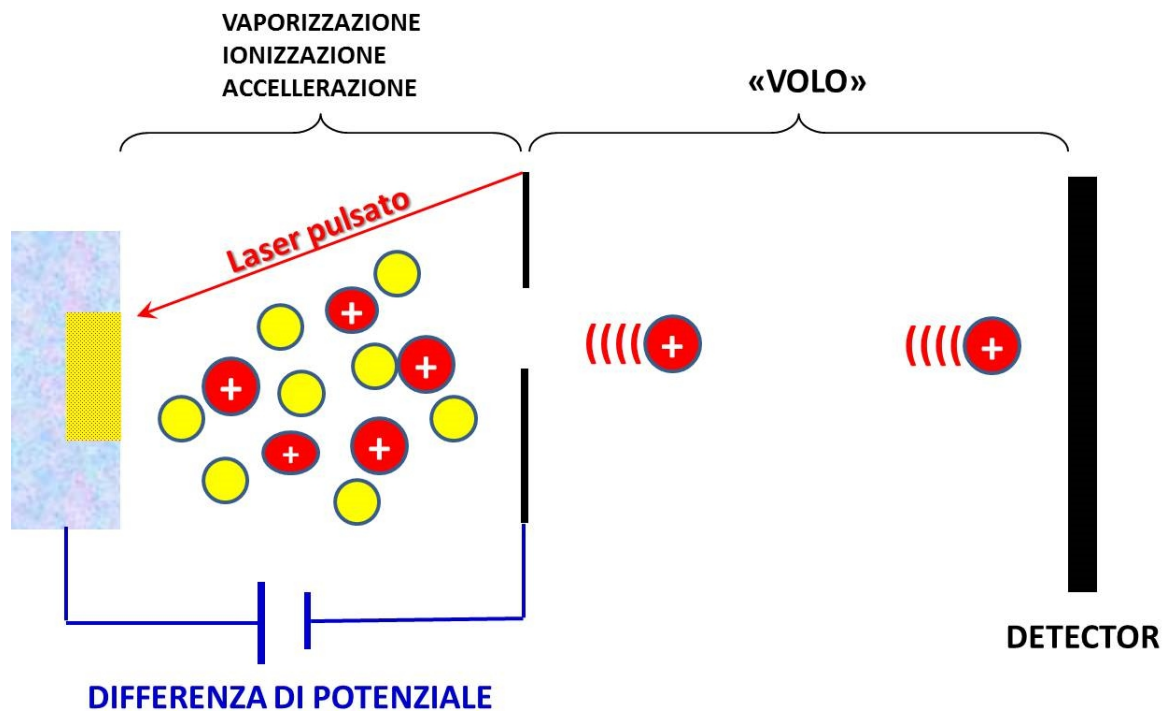


Figura 1.5. Rappresentazione grafica del percorso che subisce un campione all'interno di uno spettrometro di massa MALDI-TOF.

Le qualità del MALDI-TOF risiedono nella sua sensibilità (subpicomolare), tolleranza ai sali e ai tamponi, mentre un punto debole è rappresentato dalla risoluzione. La risoluzione R di un analizzatore definisce la sua capacità di separare ioni con rapporto m/z simile ed è definita dalla formula: $R = (m/z) / \Delta(m/z)$ dove Δ è la differenza tra i due picchi. Per un TOF senza particolari accorgimenti la risoluzione è dell'ordine di 1000 parti per milione (ppm) (Zhou et al., 1992) ed è riferita come l'ampiezza del picco a mezza altezza. Le cause principali di questo limite sono la distribuzione dell'energia cinetica iniziale non uniforme, piccole differenze del tempo di volo (gli ioni non sono esattamente generati nello stesso momento o luogo e di conseguenza non necessariamente acquisiscono la stessa energia cinetica iniziale) e collisioni verificabili nel processo di desorbimento e ionizzazione che possono aumentare la dispersione in tempo ed energia. A fronte di queste imperfezioni del sistema alcuni accorgimenti permettono di aumentare notevolmente la risoluzione e la precisione della misurazione. L'utilizzo di un tubo di volo più lungo può, ad esempio,

migliorare la precisione della misura. Un ulteriore accorgimento che ha migliorato notevolmente la risoluzione è stata l'introduzione di un "reflector" elettrostatico all'estremità del tubo di volo. Il riflettore elettrostatico ideato da Mamyrin Karataev nel 1971 (Mamyrin et al., 1973) è composto da una serie di anelli o griglie che agiscono come uno specchio elettrostatico facendo penetrare più o meno gli ioni in profondità a seconda della loro energia cinetica fino a conferirli un'energia nulla, per poi rifletterli nella direzione opposta. Ioni con stessa massa ma con più energia risultano essere riflessi e riaccelerati in tempi successivi con il risultato di fare arrivare al detector ioni con ugual m/z nello stesso momento. Con questo accorgimento la risoluzione può arrivare fino a 20000 ppm.

1.3.3 Il rivelatore.

Il rivelatore è un sistema che permette di convertire e registrare l'informazione portata da sorgenti ed analizzatori. Tutti i rivelatori possiedono una superficie in grado di raccogliere gli ioni e neutralizzare la carica attraverso meccanismi di raccolta o donazione di elettroni. Si realizza quindi un trasferimento di elettroni ed un flusso di corrente che può essere amplificato ed infine convertito in un segnale processabile da un computer. La maggioranza dei rivelatori funziona ad impatto ionico o per cattura ionica.

Gli ioni prodotti nella sorgente e separati dall'analizzatore, in funzione del rapporto m/z , raggiungono il rivelatore con correnti ioniche che vanno da 10^9 a 10^{17} A. Il segnale che verrà generato sarà direttamente proporzionale al numero di ioni che raggiungono il detector e verrà trasformato in uno spettro di massa che costituisce una sorta di impronta digitale del campione analizzato (Lewis et al., 2000).

1.3.4 Applicazioni della spettrometria di massa MALDI-TOF

La spettrometria di massa MALDI-TOF trova oggi importanti applicazioni in diversi settori: biotecnologico (in cui è estremamente importante effettuare la caratterizzazione ed il controllo di qualità di proteine ricombinanti ed altre macromolecole), medico-clinico (in cui lo studio delle proteine è essenziale per la diagnosi di patologie e per lo sviluppo di nuovi trattamenti terapeutici mirati), alimentare ed ambientale.

La tecnologia MALDI-TOF MS consente di analizzare simultaneamente ed in tempi rapidi miscele complesse di proteine o peptidi senza la necessità di una preventiva separazione. Per tale motivo, una delle principali applicazioni, riguarda l'identificazione di proteine a partire dall'analisi dei peptidi generati mediante digestione enzimatica ("peptide mass fingerprinting"). Recenti ed interessanti applicazioni di questa tecnologia riguardano inoltre l'analisi diretta di cellule intere. E' possibile infatti analizzare cellule batteriche (Krishnamurthy, 1996a; Krishnamurthy, 1996b; Krishnamurthy, 2000; English, 2003;

Warscheid, 2004), allo scopo di identificare i microrganismi sulla base del loro caratteristico profilo di espressione proteica, oltre che cellule di mammifero (Zhang, 2006), allo scopo di valutare differenze qualitative e quantitative nell'espressione proteica di due popolazioni di cellule, generare profili proteici diagnostici indice di stati patologici ed identificare proteine importanti in diversi processi cellulari (differenziazione, trascrizione, traduzione) e proteine di membrana. Recentemente è stata dimostrata la possibilità di generare mediante MALDI-TOF MS mappe proteiche di sottili sezioni di tessuto e di ricostruire la distribuzione spaziale delle proteine (Chaurand 2004). Le potenzialità di questo tipo di analisi sono estremamente interessanti per lo studio di molte patologie, in quanto è possibile descrivere, oltre che la distribuzione delle proteine all'interno del tessuto, anche la distribuzione di composti a basso peso molecolare, come farmaci o metaboliti. Questo consente la valutazione di variazioni nell'espressione proteica in tessuti specifici dopo la somministrazione sistematica di farmaci.

Inoltre, la tecnologia MALDI-TOF MS mostra ottime potenzialità nell'applicazione all'analisi di fluidi biologici (siero, urine, ecc.), allo scopo di identificare biomarcatori proteici ("biomarkers") indice di stati patologici. Attraverso la ricerca di biomarcatori specifici, infatti, la tecnologia MALDI-TOF può essere utilizzata anche per la diagnosi di tumori, artrite reumatoide, allergie, morbo di Alzheimer (Marvin et al., 2003). Tuttavia, l'analisi di proteine in fluidi biologici mediante spettrometria di massa è complicata a causa della complessità della matrice biologica e dalla presenza di sali non volatili che possono sopprimere la ionizzazione degli analiti.

Infine, la spettrometria di MALDI-TOF rappresenta un efficiente potenziale strumento anche per gli studi epidemiologici e per le classificazioni tassonomiche (Croxatto et al., 2012).

A proporre per la prima volta l'applicazione della MS per la caratterizzazione di batteri furono Anhalt e Fenselau nel 1975 (Anhalt e Fenselau, 1975), i quali dimostrarono che a partire da estratti batterici provenienti da microrganismi di diversi generi e di diverse specie era possibile ottenere un profilo proteico univoco. Con l'avvento della tecnica di ionizzazione "soft" (Tanaka e Fenn, 2002) è stato possibile estendere l'applicazione della MALDI-TOF MS all'analisi di cellule batteriche intere obliterando la fase di pretrattamento del campione (Holland et al., 1996, Croxatto et al., 2012). La capacità del MALDI-TOF MS di caratterizzare rapidamente microrganismi ha favorito la sua potenziale applicazione in un contesto multidisciplinare che include non solo la diagnosi medica ma anche il monitoraggio ambientale e il controllo di qualità degli alimenti (Croxatto et al., 2012).

Attualmente sono due gli approcci proposti per la caratterizzazione mediante MALDI-TOF MS dei microrganismi: **(1)** confronto degli spettri ("mass spectra") con banche dati contenenti profili di riferimento ("database fingerprints") e **(2)** "matching" di biomarcatori con banche dati proteomiche ("proteome database") (Croxatto et al., 2012).

(1) Confronto degli spettri.

In questo primo approccio viene analizzato il profilo proteico dell'intera cellula. Lo spettro ottenuto è confrontato con quelli di riferimento precedentemente raccolti e depositati in librerie commercialmente disponibili

Estremamente vantaggiosa risulta la possibilità di identificare i batteri, direttamente da colonia cresciuta su terreno solido mediante "deposizione diretta" del campione su di un supporto dedicato senza la necessità di effettuare estrazione.

Questo approccio rapido e semplice rende questa tecnologia facilmente applicabile alla diagnostica di laboratorio e fornisce la possibilità di sviluppare specifiche banche dati contenenti spettri con picchi specifici ed unici che possono essere utilizzate per l'identificazione a livello di specie e sub-specie di un microrganismo indipendentemente dalle condizioni di coltura utilizzate per la crescita del microrganismo stesso (Carbonelle et al., 2007; Croxatto et al., 2012).

(2) "Matching" di biomarcatori con banche dati proteomiche

Con questo secondo approccio, marcatori di natura proteica associati ad un microrganismo ignoto sono identificati confrontando il peso molecolare di tali marcatori con quello di proteine note il cui genoma è già stato sequenziato e depositato in letteratura (Demirev et al., 1999; Croxatto et al., 2012). Tuttavia, questo approccio è limitato a quei microrganismi il cui genoma è stato interamente sequenziato. Tra i marcatori batterici identificati mediante MALDI-TOF MS, circa la metà sono proteine ribosomiali, la cui caratteristica basicità rappresenta un tratto biochimico favorevole per un'efficiente ionizzazione durante il processo MALDI. Inoltre, la lisi delle cellule batteriche per mezzo di solventi organici ed in condizioni di acidità ha favorito l'estrazione delle proteine ribosomiali combinata con l'utilizzo di una matrice specifica. In uno studio condotto su *Escherichia coli* nel 2001 da Ryzhov e Fenselau (Ryzhov e Fenselau, 2001) sono state caratterizzate mediante MALDI MS oltre alle proteine ribosomiali anche un numero abbondante di "nucleic acid-binding protein" e "cold-shock protein".

Recentemente, la tecnologia MALDI-TOF MS, oltre alla sua applicazione classica nella diagnosi microbiologica (identificazione di microrganismi), è stata utilizzata per individuare, indirettamente, meccanismi di resistenza agli antibiotici (Hrabák et al., 2011a). Questo approccio include: il rilevamento di cambiamenti nel corredo proteico di batteri e funghi indotti dall'esposizione agli antibiotici (Frickman et al., 2014), l'identificazione dell'antibiotico e delle relative molecole modificate/degradate (Burckhardt and Zimmermann, 2011, Hrabák et al., 2011a,b), l'identificazione di proteine responsabili della resistenza (Lupo et al., 2013), la scoperta di mutazioni nei geni responsabili del meccanismo di resistenza (Frickman et al., 2014). In particolare, negli ultimi anni numerosi studi hanno valutato l'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF per individuare ceppi produttori di β -lattamasi (Hrabák et al., 2011a) in batteri Gram-negativi (Tzouvolakis et al., 2012). Particolare attenzione è stata riservata alle *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (Ertapenem, Meropenem, Imipenem) che attualmente rappresentano una grave e crescente minaccia per la salute pubblica (Hrabák et al., 2013). È stato recentemente sviluppato un saggio in grado di rilevare la produzione di prodotti di idrolisi dei carbapenemi formati in seguito all'azione di particolari enzimi β -lattamici, le carbapenemasi. Il ritrovamento di questi prodotti di idrolisi indica, indirettamente, la presenza di un ceppo resistente ai carbapenemi (Wang et al., 2013).

Capitolo 2. Identificazione mediante MALDI-TOF MS attraverso la creazione di una banca dati dedicata.

Negli ultimi anni, la spettrometria di massa mediante tecnologia MALDI-TOF è diventata un potente strumento per la diagnosi di laboratorio in microbiologia clinica rivoluzionando il flusso di lavoro per una rapida identificazione di batteri e funghi (Bizzini et al., 2010; De Carolis et al., 2012; Calderaro et al., 2013a; Calderaro et al., 2014 a,b,c). Questa tecnologia, infatti, sta rimpiazzando l'identificazione fenotipica convenzionale basata su saggi biochimici routinariamente impiegati per la ricerca di microrganismi in campioni clinici (Bizzini et al., 2011). I metodi convenzionali, inoltre, pur consentendo l'identificazione di un'ampia varietà di microrganismi risultano costosi, richiedono lunghi tempi di esecuzione e personale esperto per l'interpretazione dei risultati. L'identificazione e la caratterizzazione dei microrganismi mediante MALDI-TOF MS avviene principalmente, come descritto nel Capitolo 1, attraverso il confronto degli spettri generati dall'analisi di cellule intere con spettri di riferimento precedentemente raccolti in librerie commercialmente disponibili ("database"). Questo approccio rapido e semplice rende questa tecnologia facilmente applicabile alla diagnostica di laboratorio e fornisce la possibilità di sviluppare specifiche banche dati che possono essere utilizzate per l'identificazione di un microrganismo indipendentemente dalle condizioni di crescita (Carbonelle et al., 2007; Croxatto et al., 2012). Lo sviluppo di questo approccio ha permesso l'identificazione microbica a livello di specie. L'identificazione dei diversi microrganismi avviene sfruttando sia le molteplici differenze riscontrate tra le varie specie a livello delle proteine ribosomiali, sia l'alta conservazione delle stesse in ceppi appartenenti alla stessa specie. Per questa ragione, l'identificazione di batteri e funghi avviene in un intervallo compreso tra 2.000 e 20.000 Da, "range" in cui ricade il peso molecolare della maggior parte di queste proteine. Le proteine ribosomiali, oltre a risultare altamente conservate all'interno della stessa specie, sono facilmente ionizzabili e minimamente influenzate dalle condizioni di crescita microbica, per questa ragione rappresentano il pattern proteico ideale per la formazione di uno spettro specie-specifico. L'identificazione del microrganismo in esame avviene mediante un programma dedicato collegato allo strumento che confronta ciascun spettro ottenuto con quelli di riferimento presenti all'interno di una banca dati attraverso un approccio statistico di analisi multivariata che include posizione ed intensità del picco. Il programma calcola un punteggio identificativo arbitrario, il cosiddetto "Valore di Confidenza" o "score" che riflette il grado di

corrispondenza con lo spettro di riferimento di ogni microrganismo presente ed esprime il grado di certezza con cui viene proposta l'identificazione per il microrganismo in esame:

- nessun identificazione (punteggio < 1.7);
- identificazione a livello di genere (punteggio > 1.7 e < 2.0);
- identificazione a livello di specie (punteggio \geq 2.0).

Le ragioni per le quali questo tipo di analisi può portare ad assenza di identificazione (punteggio < 1.7), ad una mis-identificazione oppure può limitarsi ad un'identificazione solo a livello di genere (punteggio > 1.7 e < 2.0) (Croxatto et al., 2012) possono essere ricondotte a due principali motivi: 1) una banca dati incompleta che presenta per una determinata specie assenza o presenza limitata di spettri di riferimento o 2) una scarsa quantità del microorganismo riconducibile ad un'errata preparazione del campione (Weiser et al., 2011).

Dati di letteratura mostrano come una banca dati completa e rappresentativa sia un requisito essenziale per un'accurata identificazione mediante MALDI-TOF MS. Un aggiornamento frequente del "database" dello strumento con spettri di riferimento diversi da quelli attualmente inclusi nella banca disponibile può significativamente migliorare la prestazione del sistema nell'identificazione (Croxatto et al., 2012). Numerosi studi (Seng et al., 2009; Croxatto et al., 2012, Calderaro et al., 2014a,b,c,) hanno dimostrato, grazie alla costruzione ed all'utilizzo di una banca dati fatta in casa e allo sviluppo di un protocollo di preparazione dei campioni, l'efficacia identificativa del sistema MALDI-TOF. Permane, tuttavia, ad oggi la necessità di "database" e protocolli di estrazione proteica standardizzati (Bizzini et al., 2011).

Primo scopo di questo studio è stato, pertanto, verificare e dimostrare l'efficacia identificativa della metodica MALDI-TOF MS mediante l'approccio di comparazione degli spettri di differenti microrganismi di interesse medico per i quali l'identificazione risultava impossibile a causa della completa assenza o presenza limitata di spettri di riferimento all'interno della banca dati commerciale associata allo strumento.

In particolare sono stati presi in considerazione batteri appartenenti a spirochete del genere *Borrelia* e *Leptospira*, a miceti filamentosi (dermatofiti) e protozoi (*Trichomonas vaginalis*).

2.1 Batteriologia

2.1.1 *Borrelia* spp.

2.1.1.1 Introduzione

Le spirochete del genere *Borrelia* fanno parte della famiglia *Spirochaetaceae*, ordine *Spirochaetales*, e sono batteri Gram-negativi microaerofili, dotati di metabolismo di tipo fermentativo. Morfologicamente sono cellule spiraliformi dotate di un movimento serpentiforme, presentano 15-20 flagelli, organi deputati al movimento, che corrono attraverso la duplice membrana citoplasmatica interna ed esterna che riveste il cilindro protoplasmatico (Figura 2.1) (Bendinelli et al., 2006).

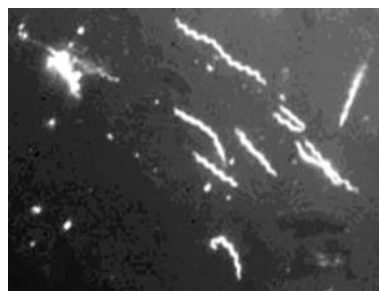


Figura 2.1. *Borrelia burgdorferi*. Modificata da Steere et al. 2001.

Le borrelie sono batteri estremamente esigenti, per questo la loro crescita *in vitro* risulta lenta e difficile. La coltura di questi batteri può essere condotta a 30° C solo nel terreno liquido Barbour, Stoenner, Kelly (BSK) modificato di tipo II, addizionato con siero di coniglio al 6 % (Bendinelli et al., 2006).

Le spirochete del genere *Borrelia* di interesse medico sono trasmesse all'uomo mediante il morso di un artropode vettore (zecche o pidocchi) e comprendono gli agenti eziologici della malattia di Lyme o borreliosi e quelli delle cosiddette febbri ricorrenti.

La borreliosi di Lyme (LB) è una sindrome multisistemica che interessa cute, articolazioni, sistema nervoso centrale e periferico e l'occhio (Oschmann et al., 1999) descritta per la prima volta nell'omonima contea del Connecticut, dove nel solo anno 1975 si manifestarono 12 casi di artrite reumatoide giovanile (Franz e Krause, 2003). La borreliosi si presenta generalmente con la comparsa di un eritema cronico migrante localizzato nelle prime fasi della malattia per poi disseminare nelle fasi successive con manifestazioni cliniche differenti a seconda della specie di *Borrelia* coinvolta (Aguero-Rosenfeld et al., 2005) (Figura 2.2).






Eritema migrante

Paralisi facciale

Ginocchio gonfio

Figura 2.2. Manifestazioni cliniche multiorgano della borreliosi di Lyme. Modificata da: www.cdc.gov/lyme/signs_symptoms/index.html.

Gli agenti eziologici della borreliosi, trasmessi all' uomo da zecche del genere *Ixodes*, sono le borrelie comprese nel complesso *B. burgdorferi complex*, comprendente 11 specie strettamente correlate geneticamente, suddiviso in *B. burgdorferi sensu stricto* (*ss*), che comprende soltanto la specie *B. burgdorferi* e in *B. burgdorferi sensu lato* (*sl*), che comprende 10 specie. In particolare 3 specie appartenenti al complesso *Borrelia burgdorferi sl*, *B. garinii*, *B. afzelii* e *B. burgdorferi* sono patogene. Negli Stati Uniti (USA) la malattia di Lyme è causata da *B. burgdorferi sensu stricto*, unica specie del complesso *burgdorferi* presente in quella zona geografica e trasmessa all' uomo da zecche della specie *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* (zecche dei cervi); in Europa la borreliosi è causata da tre specie di borrelie del complesso *B. burgdorferi sl*: *B. burgdorferi*, *B. afzelii*, *B. garinii* trasmesse da zecche della specie *I. ricinus*, (zecche delle pecore); in Asia la borreliosi è causata da due specie di borrelie del gruppo *B. burgdorferi sensu lato*: *B. afzelii* e *B. garinii* (Bendinelli et al., 2006). Le genospecie afferenti al complesso *B. burgdorferi sl*, tutte trasmesse da zecche dure del genere *Ixodes*, sono circa 18. Di queste *B. americana*, *B. andersonii*, *B. californiensis*, *B. carolinensis*, *B. japonica*, *B. tanukii*, *B. turdi*, *B. sinica*, *B. yangtze* (Rudenko et al., 2011) non sono ancora state associate a malattia nell'uomo mentre *B. bisetti*, *B. valaisiana* e *B. lusitaniae* sono patogene per l'uomo e per gli animali (Rudenko et al., 2011). Ciascuna genospecie patogena di *Borrelia* viene veicolata da un vettore preferenziale, ha una diversa distribuzione geografica e conferisce manifestazioni cliniche predominanti (Barbour e Hayes, 1986; Burgdorfer et al., 1985) (Figura 2.3).

Specie	Malattia causata	Zecca vettore principale responsabile della trasmissione	Area geografica
<i>Borrelia burgdorferi</i> complex <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i>	Malattia di Lyme Malattia di Lyme	 Zecche dure * <i>Ixodes</i> sp. <i>Ixodes scapularis (dammini)</i> <i>Ixodes pacificus</i>	USA, Europa, Asia USA costa orientale USA costa occidentale
<i>Borrelia burgdorferi sensu lato</i> <i>Borrelia afzelii</i> <i>Borrelia garinii</i>	Malattia di Lyme Malattia di Lyme Malattia di Lyme Malattia di Lyme Malattia di Lyme	<i>Ixodes</i> spp. <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes persulcatus</i>	Europa, Asia Europa Asia Europa Asia
<i>Borrelia valaisiana</i> <i>Borrelia lusitaniae</i> <i>Borrelia japonica</i> <i>Borrelia tanukii</i> <i>Borrelia turdi</i> <i>Borrelia andersonii</i> <i>Borrelia bissetti</i>	Patogenicità non accertata Non patogena Non patogena Non patogena Non patogena Non patogena Non patogena	<i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes ricinus</i> <i>Ixodes ovatus</i> <i>Ixodes tanukii</i> <i>Ixodes turdus</i> <i>Ixodes dentatus</i> <i>Ixodes spinipalpis</i> Zecche molli**	Europa orientale, Asia Europa orientale, Asia Giappone Giappone Giappone Nord America Nord America
<i>Borrelia hermsii</i> <i>Borrelia parkeri</i> <i>Borrelia turicatae</i> <i>Borrelia recurrentis</i>	Febbre ricorrente nord americana e mediterranea Febbre ricorrente nord americana e mediterranea Febbre ricorrente nord americana e mediterranea Febbre ricorrente	 <i>Ornithodoros hermsii</i> <i>Ornithodoros parkeri</i> <i>Ornithodoros turicatae</i>  Pidocchi <i>Pediculus humanus var. corporis</i>	Nord america, Europa, Asia, Africa Nord america, Europa, Asia, Africa Nord america, Europa, Asia, Africa Nord America, Europa, Asia, Africa

*parassiti di roditori selvatici, caprioli, cervi, volpi, lepri; ** parassiti di uccelli e piccioni

Figura 2.3. Rappresentazione grafica delle diverse specie di *Borrelia* con relativa patologia, vettore ed area geografica di diffusione. Modificata da Bendinelli et al., 2006.

In Europa, la borreliosi è diffusa dal Mediterraneo sino a latitudini elevate (escluso Atlantico Settentrionale). Ha carattere endemico in Germania, Austria, Svizzera, Francia, Slovenia, Spagna settentrionale, Croazia settentrionale, Svezia meridionale, Inghilterra, parte dell'Italia, e si presenta con notevole incidenza nell'est europeo: Russia, Romania, Ungheria e Cechia (Shapiro, 2008). In particolare, a livello europeo è stato riscontrato un valore di prevalenza medio di *B. burgdorferi* nelle zecche compreso tra il 5 e il 25% (Randolph et al., 2002) diffuse soprattutto nelle aree boschive del continente (Franz e Krause, 2003), ma i dati si ritengono sottostimati e non omogenei (Rizzoli et al., 2011). Una sintesi dei dati attualmente disponibili indica che mediamente in Europa i casi annualmente documentati di LB sono più di 65400 (Rizzoli et al., 2011).

In Italia, i primi casi segnalati risalgono al 1985 e 1986 in Liguria e Friuli Venezia Giulia, rispettivamente (Trevisan, 1987; Cinco et al., 1998). Le principali regioni interessate dalla borreliosi sono: Friuli Venezia Giulia, Veneto, Trentino Alto Adige, Liguria, Emilia Romagna (Ministero della Salute Italiano, 2000). Sebbene nel nostro Paese la notifica di questa malattia sia obbligatoria, i dati sull'epidemiologia sono scarsi e spesso limitati a pazienti che conducono attività a rischio (es. lavoratori forestali) (Tomao et al., 2005). Nell'area di Parma è stato condotto uno studio sui pazienti afferenti all' Azienda Ospedaliero Universitaria dal 2002 al 2008 con sospetta borreliosi: lo studio ha dimostrato come l'area sia non endemica (Calderaro et al., 2010).

Negli USA, dove la malattia è soggetta a notifica obbligatoria, il numero di casi segnalati ogni anno è circa 300 000 (www.cdc.gov).

L'organizzazione genomica atipica (un cromosoma lineare di circa 1000 kb e fino a 20 plasmidi, sia lineari che circolari generalmente presenti in singola copia o in poche copie) (Oschmann et al., 1999) conferisce al batterio uno spiccato polimorfismo antigenico grazie al quale esso riesce a eludere il sistema immunitario (Bergstrom et al., 1991). Per mantenere il complesso ciclo enzoootico *B. burgdorferi*, dovendo adattarsi ad ambienti notevolmente diversi, modifica l'espressione delle lipoproteine di membrana ritenute avere un ruolo chiave nella patogenesi della malattia: dal periodo autunnale all'inizio della primavera esprime soprattutto la proteina di superficie della membrana esterna Osp A, mentre nel periodo primavera-estate aumenta l'espressione di Osp C, una proteina necessaria per l'infezione di ospiti mammiferi (Bendinelli et al., 2006). Questo spiccato polimorfismo antigenico rende difficilmente standardizzabile la diagnosi di laboratorio.

La diagnosi di borreliosi si basa sull'osservazione delle manifestazioni cliniche, tuttavia la loro aspecificità (possono essere confuse con altre malattie causate da zecche) e la sporadicità con cui si presentano richiede l'ausilio di diverse metodiche per la diagnosi di laboratorio.

La diagnosi di laboratorio diretta di borreliosi può essere condotta mediante metodi di ricerca rappresentati dall'isolamento delle borrelie dal campione biologico e dalla ricerca del DNA delle borrelie appartenenti al complesso *B. burgdorferi sensu lato* mediante PCR (Bendinelli et al., 2006; Postic et al., 2000). Tra i metodi diretti la PCR è notevolmente specifica e altamente sensibile ma presenta degli svantaggi: è estremamente costosa, richiede personale formato, presenta rischi di contaminazione. Inoltre la PCR in uso nel nostro laboratorio non è in grado di effettuare un'identificazione di specie ma è in grado solo di rilevare il DNA del complesso *B. burgdorferi sl*.

La diagnosi di laboratorio può essere effettuata anche tramite metodi indiretti dimostrando la produzione di anticorpi specifici anti-*Borrelia* IgM e IgG nel siero e/o nel liquor.

In Italia, dove sono diffuse le specie appartenenti al complesso *B. burgdorferi sl*, come indicato dal Ministero della Salute, non esiste sufficiente standardizzazione dei saggi sierologici attualmente disponibili e la diagnosi clinica, formulata sulla base dei dati anamnestici ed epidemiologici, deve essere confermata dalla ricerca diretta del microrganismo o dei suoi componenti (DNA) (Ministero della Salute Italiano, 2000).

La febbre ricorrente da *Borrelia* è una condizione patologica che si manifesta con episodi di iperpiressia ricorrenti che generalmente compaiono entro sette giorni dal morso del vettore. Le borrelie agenti eziologici di febbre ricorrente sono trasmesse all'uomo da zecche molli o pidocchi: *B. hermsii*, *B. parkeri* e *B. turicatae*, trasmesse da zecche molli del genere *Ornithodoros*, parassiti di uccelli e piccioni, mentre *B. recurrentis*, agente eziologico della febbre ricorrente da pidocchio è trasmessa all'uomo dal pidocchio del corpo *Pediculus humanus* varietà *corporis* (Bendinelli et al., 2006; Schwan et al., 2009).

Nel caso di sospetto clinico di febbre ricorrente da *Borrelia* è possibile, in concomitanza degli attacchi febbrili, prelevare il sangue periferico in presenza di citrato come anticoagulante e allestire uno striscio di sangue colorato con Giemsa e osservare le borrelie nel sangue, oppure osservare le borrelie mobili nel sangue in preparati a fresco anche se in questo caso l'osservazione risulta più difficile. Inoltre, tra i metodi di osservazione diretta, per il sangue periferico, per il sangue midollare e per il liquido cefalo-rachidiano, è possibile utilizzare preparati colorati con arancio di acridina. I campioni di sangue periferico, midollare o di liquor possono essere coltivati in terreno BSK-II e le spirochete generalmente sono osservabili entro le 24 ore dall'inoculo in terreno di coltura quando il prelievo dal sangue è effettuato durante l'episodio febbrile. I saggi sierologici permettono di evidenziare anticorpi specifici anti-*Borrelie* dopo almeno tre settimane dall'inizio dei sintomi e pertanto non sono utili per la diagnosi rapida. Per la diagnosi sierologica devono essere analizzati due campioni di siero: il primo dovrebbe essere prelevato entro 7 giorni dall'esordio dei sintomi (campione in fase acuta) e il secondo campione dovrebbe essere raccolto nella fase di convalescenza non prima di almeno 21 giorni dall'esordio dei sintomi (campione in fase di convalescenza). La documentata siero-conversione tra il primo e il secondo campione oppure un significativo rialzo del titolo anticorpale (di almeno due volte) tra i due campioni è indicativo di infezione in atto o recente anche se la diagnosi risulta soltanto retrospettiva. I saggi sierologici non sono ancora standardizzati e non sono disponibili in numerosi laboratori, inoltre essi sono spesso invalidati da risultati falsamente positivi. La terapia antibiotica precoce può impedire lo sviluppo di una risposta anticorpale oppure ne può determinare la rapida riduzione nei mesi successivi all'esposizione interferendo quindi con la diagnostica sierologica (Bendinelli et al., 2006).

La mancata standardizzazione e gli svantaggi dei metodi attualmente disponibili per la diagnosi di laboratorio di borreliosi apre le porte alla ricerca ed all'introduzione di nuovi sistemi identificativi in grado di superare i limiti sopra descritti. Scopo di questo studio è stata la

valutazione della spettrometria di massa MALDI-TOF come valida e rapida alternativa ai sistemi identificativi convenzionali sopra citati. Per il genere *Borrelia* la banca dati commerciale dello strumento MALDI-TOF MS in uso presso il nostro laboratorio includeva solo 3 spettri di riferimento appartenenti, rispettivamente, alle specie *B. burgdorferi ss* (1), *B. spielmani* (1) e *B. garinii* (1). L'implementazione del "database" con specie diverse da quelle già presenti, permetterebbe di colmare eventuali lacune identificative dovute alla mancanza di spettri di riferimento di alcune tra le specie di *Borrelia* più diffuse in Europa (*B. afzelii*) e nel mondo (come ad esempio *B. hermsii*, specie a distribuzione cosmopolita e *B. japonica*, diffusa in Giappone). Inoltre l'implementazione con spettri derivanti da ceppi di riferimento di specie già presenti nel "database" migliorerebbe ulteriormente, come ampiamente documentato in letteratura, l'efficacia identificativa del sistema.

2.1.1.2 Materiali e Metodi

Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita

In questo studio sono stati inclusi 10 ceppi del genere *Borrelia*, di cui 4 di riferimento appartenenti alle specie *B. afzelii* (ceppo ATCC 103469), *B. hermsii* (ceppo ATCC HS1), *B. burgdorferi ss* (ceppo ATCC B31), *B. japonica* (ceppo ATCC F63B), 1 ceppo di isolamento clinico (*B. burgdorferi ss* ceppo UCSC), caratterizzato in studi precedenti mediante SDS-PAGE (Burioni et al., 1988; Dettori et al., 1995) e 5 ceppi di isolamento, *B. burgdorferi ZS7* (isolato da una zecca in Germania), *B. garinii* G1 (isolato da un campione di liquor proveniente da un paziente in Germania), *B. afzelii* FM1-D15, *B. afzelii* ACA-1 (isolati dalla cute di due pazienti della Germania e della Svezia, rispettivamente) e *B. lusitaniae* MT 0407-M8 (isolato da una zecca in Portogallo) forniti dal Prof. Kraicky (Kraiczy et al., 2008) dell'Institute of Medical Microbiology and Infection Control di Francoforte. I ceppi sono stati coltivati nel terreno di Barbour, Stoenner, Kelly modificato di tipo II (BSK-II) (Sigma Aldrich-Milano, Italia), supplementato con siero di coniglio (Sigma Aldrich) al 6% precedentemente inattivato a 56°C per 30 minuti. Le colture sono state incubate al buio alla temperatura di 30°C per 7 giorni (Barbour et al., 1984; Postic et al., 2000). Prima di procedere all'estrazione delle proteine batteriche, le colture sono state osservate al microscopio ottico per escludere la crescita di altri microrganismi e le borrelie contate. La valutazione della concentrazione batterica è stata eseguita ponendo una goccia della sospensione nella camera di Bürker e contando le spirochete presenti mediamente nei quadrati di lato maggiore (1mm). Moltiplicando per 10.000 il conteggio è stata ottenuta la concentrazione di batteri/ml. Sono state utilizzate aliquote di coltura con una concentrazione finale di circa 1×10^8 batteri/ml.

Quando è stato necessario allestire colture di borrelie partendo da ceppi congelati, è stato utilizzato il seguente protocollo di scongelamento:

- immergere le "cryovials" in un bagnetto termostato a 37° C fino al completo scongelamento;
 - allestire un vetrino a fresco con 10 µl di sospensione per verificare la presenza di borrelie;
 - trasferire il contenuto della "cryovial" in un tubo di coltura contenente 4 ml di terreno BSK-II ed incubare a 30° C;
 - dopo 3 giorni di incubazione allestire un vetrino a fresco con 10 µl di coltura per verificare la presenza di eventuali contaminazioni.
- a) In caso di contaminazione, eliminare la coltura e ripartire dallo scongelamento di una nuova cryovial;
- b) in assenza di contaminazione, ripassare 1 ml di coltura in 4 ml di terreno BSK-II per diluire il crioconservante (glicerolo);
- incubare a 30° C per 7 giorni prima dell'estrazione proteica.

Raggiunta una concentrazione di circa 10⁶ borrelie/ml un'aliquota di ciascuna coltura batterica è stata congelata, al fine di poter effettuare esperimenti futuri, mediante il seguente protocollo:

- identificare una "cryovial" sterile con i dati relativi alla coltura batterica;
- trasferire nella "cryovial" identificata 1 ml di coltura di *Borrelia*;
- aggiungere 50 µl di glicerolo sterile (Sigma Aldrich, Milano, Italia) per ogni "cryovial";
- trasferire nel minor tempo possibile la "cryovial" a -80°C o in azoto liquido.

Durante tutte le fasi del congelamento, le provette devono essere tenute in ghiaccio.

La localizzazione delle "cryovial" congelate è riportata su un registro dedicato.

Preparazione dei campioni per l'analisi mediante MALDI-TOF MS

Tre ml di ogni coltura di *Borrelia* spp., ad una concentrazione di 1x10⁸/ml, sono stati trasferiti in 2 eppendorf (1.5 ml microtube, SARSTEDT, Germania) sterili da 1,5 ml e centrifugati per 10 minuti a 15,000 x g. Rimosso il sopranatante, i sedimenti ottenuti sono stati assemblati in un unico "pellet" successivamente lavato in 1 ml di acqua bidistillata e nuovamente centrifugato a 15,000 x g per 10 minuti. Il sedimento ottenuto è stato risospeso in un rapporto v/v di H₂O ed etanolo assoluto pari a 1/3. In dettaglio, il pellet è stato risospeso in 300 µl di acqua bidistillata sterile fino ad ottenerne il completo discioglimento mediante agitazione; successivamente sono stati aggiunti 900 µl di etanolo e la soluzione ottenuta è stata sottoposta ad agitazione mediante "vortex" per 10 secondi. La sospensione ottenuta è stata nuovamente centrifugata a 15000 x g per 10 minuti, ed il

sopranatante rimosso. Il "pellet" è stato lasciato 40 minuti a temperatura ambiente (TA), per eliminare qualsiasi residuo di etanolo.

La fase di estrazione proteica è stata completata aggiungendo acido formico al 70% e acetonitrile in rapporto V/V di 1/1 (50 µl/50 µl), omogeneizzando mediante vortex ed, infine, centrifugando a 15000 x g per 2 minuti. Settanta µl del sopranatante ottenuto sono stati trasferiti in eppendorf sterile facendo attenzione a non aspirare il pellet che potrebbe causare fenomeni di "background" nell'analisi mediante MALDI-TOF MS. L'estratto proteico ottenuto è stato utilizzato immediatamente per l'analisi mediante MALDI-TOF MS e conservato a -20°C (Figura 2.4).

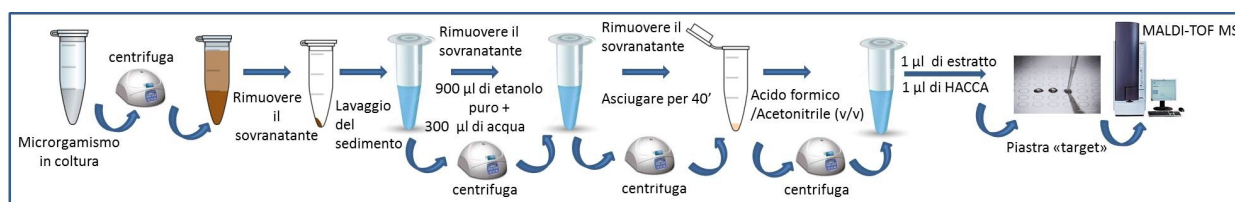


Figura 2.4. Schema delle fasi di estrazione delle proteica.

Prima di ogni seduta analitica mediante MALDI-TOF MS è necessario effettuare la pulizia della piastra dedicata (polished steel MSP-96 target plate, Bruker Daltonics) mediante il seguente protocollo:

- frizionare meccanicamente la piastra dedicata per mezzo di un apposito spazzolino sotto un getto d'acqua distillata;
- immergere la piastra dedicata in etanolo al 70% per almeno 10-15 minuti;
- risciacquare abbondantemente con acqua distillata per rimuovere completamente l'etanolo;
- asciugare la piastra dedicata tamponando con carta assorbente.

L'allestimento della piastra dedicata è stato condotto depositando su ogni pozzetto utilizzato 1 µl di estratto proteico lasciato asciugare a temperatura ambiente (TA) e successivamente ricoprendolo con 1 µl di matrice HCCA. La matrice HCCA (Bruker Daltonics, Germania) è stata liofilizzata risospesdendo il contenuto liofilo della vial (2,5 mg) in 250 µl di una soluzione organica (OS-TA30), fino ad ottenere una sospensione limpida e priva di cristalli conservata al buio, a 4°C, al fine di evitare la foto-ossidazione. L'OS-TA30 è una soluzione contenente una concentrazione v/v 30:70 di acetonitrile (Sigma Aldrich, Italia) e di acido trifluoroacetico (TFA) 0,1% (Sigma Aldrich, Italia) precedentemente preparato aggiungendo 1 µl di TFA in 10 ml di acqua bidistillata sterile.

Per garantire la riproducibilità dei risultati ottenuti, per ciascun ceppo sono stati allestiti un minimo di 20 pozzetti (20 repliche per ceppo) e ogni ceppo è stato saggiato dopo coltivazione in 2 diversi lotti di terreno.

Ogni seduta è stata validata depositando sulla piastra dedicata un controllo positivo (*Escherichia coli* ceppo ATCC 8739) ed uno negativo (matrice HCCA non inoculata).

Calibrazione dello strumento MALDI-TOF MS

Prima di effettuare l'analisi degli estratti proteici mediante MALDI-TOF MS, è stata effettuata la calibrazione dello strumento nell'intervallo di PM 2-20 kDa utilizzando l'apposito calibratore "Bruker Bacterial Test Standard (BTS)" (Bruker Daltonics), seguendo le indicazioni fornite dall'azienda produttrice.

La liofilizzazione del BTS è stata ottenuta aggiungendo alla provetta contenente il reagente liofilo 50 µl di OS-TA30 e risospesando accuratamente con il puntale in modo da rendere la sospensione omogenea facendo attenzione a non formare bolle. La soluzione ottenuta è stata lasciata a temperatura ambiente per 5 minuti prima di essere utilizzata.

Un µl di BTS è stato depositato su un pozzetto della piastra dedicata, lasciato asciugare a TA e successivamente ricoperto da 1 µl di matrice HCCA. La calibrazione è stata effettuata mediante lettura automatica attraverso la funzione dedicata del programma in dotazione dello strumento.

Acquisizione degli spettri mediante MALDI-TOF MS.

L'analisi degli estratti proteici è stata effettuata utilizzando lo strumento MicroFlex LT (Bruker Daltonics) presente nel settore Batteriologia dell'Unità Operativa di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma. Per l'acquisizione degli spettri sono stati utilizzati parametri preimpostati dello strumento (modalità lineare positiva con un voltaggio di 20 kV, raggio laser ad azoto con frequenza di 20 Hz, intervallo di massa compreso in un range tra 2-20 kDa, acquisizione di 240 laser shots totali in 40 "shot-steps" misurati in punti diversi del pozzetto in esame ed acquisiti mediante un programma dedicato) (FlexControl versione 3.3.108, Bruker Daltonics).

Implementazione della banca dati dello strumento e dendrogramma

Gli spettri ottenuti per ciascuno dei 4 ceppi di riferimento (20 repliche per ceppo) sono stati analizzati con il programma FlexAnalysis (Versione 3.3) al fine di normalizzare gli spettri, mediante "Smoothing" e "Baseline" e per eliminare sia gli spettri con intensità $<10^4$ (unità arbitrarie) sia quelli con un profilo completamente differente dagli altri.

Le repliche selezionate per ognuno dei 4 ceppi (minimo 12 repliche per ceppo) sono state utilizzate per creare un "Main Spectrum Profile" (MSP-Spectrum) mediante il programma

MALDI-Biotyper (Versione 3.1.66 - Bruker Daltonics) impostato con i parametri standard forniti dalla ditta produttrice. L'MSP-Spectrum ottenuto per ciascun ceppo di riferimento è stato poi implementato nella banca dati fornita dalla Bruker Daltonics (Versione 3.1.66).

Per poter verificare eventuali incongruenze negli MSP-Spectra creati, i profili proteici di riferimento sono stati visualizzati in un dendrogramma costruito utilizzando la funzione "MSP-dendrogram" del programma MALDI-Biotyper.

Il dendrogramma è una struttura schematica ad albero impiegata per rappresentare graficamente le somiglianze e le correlazioni reciproche fra i vari organismi. Esso è costruito ponendo in ordinate (Y) i gruppi di organismi e in ascisse (X) la percentuale di similarità.

In questo caso, il dendrogramma è il risultato del confronto di MSP correlati, attraverso una matrice pre-impostata che determina la distanza tra coppie di spettri; il grafico risultante normalizza questa distanza in valori numerici compresi tra 0 (perfetta corrispondenza) e 1000 (nessuna corrispondenza).

Identificazione

L'identificazione dei ceppi di riferimento e di isolamento clinico è stata condotta mediante programma MALDI-Biotyper (Versione 3.1.66).

Analisi Statistica

Gli stessi spettri precedentemente utilizzati per la creazione degli MSP-Spectra sono stati analizzati mediante programma statistico dedicato (ClinProTools, Bruker Daltonics) nell'intervallo di peso molecolare compreso tra 2-20 kDa al fine di individuare specifici picchi in grado di discriminarli. Per poter paragonare i singoli ceppi, un numero uguale di spettri per ciascun ceppo (10) è stato inserito nel programma e a sua volta ogni singolo spettro è stato automaticamente ricalibrato. La ricalibrazione è stata eseguita con uno specifico algoritmo, già incluso nel programma che ha il compito di ridurre gli spostamenti di massa ("mass shifts") avvenuti durante acquisizioni multiple ottenute in un unico o in differenti esperimenti. Il parametro più importante dell'algoritmo utilizzato, lo "Shift Maximum Peak", è stato impostato su 1000 parti per milione (ppm).

Dopo il processo di ricalibrazione, il programma crea uno spettro medio di ciascun ceppo (ottenuto dalle repliche di ogni singolo ceppo) ed uno spettro medio totale (ottenuto da tutte le repliche di tutti i ceppi analizzati); il confronto degli spettri medi mediante Analisi della Varianza (ANOVA) ha portato ad una lista di possibili picchi discriminanti ognuno dei quali correlato ad un p-value in grado di determinare la significatività del potere discriminante di ogni singolo picco. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Inoltre, è stata eseguita la Principal Component Analysis (PCA) per verificare l'omogeneità

delle repliche della stessa specie e l'eterogeneità delle specie di repliche diverse. I risultati ottenuti sono visualizzati in un grafico tridimensionale generato automaticamente dal programma analitico.

Gli stessi spettri sono stati analizzati mediante algoritmi statistici supervisionati per individuare i picchi con la più alta capacità di separazione delle diverse classi (specie, sierotipi, ecc.) tramite una visualizzazione uni/multivariata dei dati. In questo studio sono stati usati 3 algoritmi statistici inclusi nel programma: QuickClassifier (algoritmo supervisionato univariato), Supervised Neural Network e Genetic Algorithm (algoritmi supervisionati multivariati).

Questi algoritmi determinano automaticamente il numero di picchi da integrare nel modello statistico per differenziare le diverse classi sulla base del parametro Recognition Capability (RC). Inoltre gli algoritmi valutano l'affidabilità del modello statistico creato mediante il parametro Cross Validation (CV); questo parametro può essere utilizzato anche per prevedere come questo modello si comporterà in futuro.

L'algoritmo che ha fornito il valore più alto di RC e di CV, considerando anche il maggiore numero di picchi discriminanti individuati da ogni singolo algoritmo per ottenere il modello statistico, è stato scelto come riferimento per analizzare le diverse classi. La presenza/assenza di ogni picco discriminante è stata valutata confrontando lo spettro medio di ciascun ceppo con lo spettro medio generale.

2.1.1.3 Risultati

Analisi mediante MALDI-TOF

Gli spettri ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS per 3 delle 4 diverse specie di *Borrelia* analizzate (*B. afzelii*, *B. hermsii*, *B. japonica*) hanno mostrato profili proteici non assimilabili con nessuno di quelli presenti nel "database" (score <1.3). Il ceppo di riferimento *B. burgdorferi* B31 (ATCC 35210) è stato correttamente identificato (score >2.0 per ogni replica) in quanto già presente all'interno del "database" uno spettro di riferimento di *B. burgdorferi* ss. Le repliche per ciascun ceppo di riferimento (Figura 2.5) sono state selezionate mediante FlexAnalysis (20 repliche per ceppo) ed utilizzate per la creazione di uno spettro di riferimento ("MSP Spectrum") attraverso il programma MALDI-Biotyper.

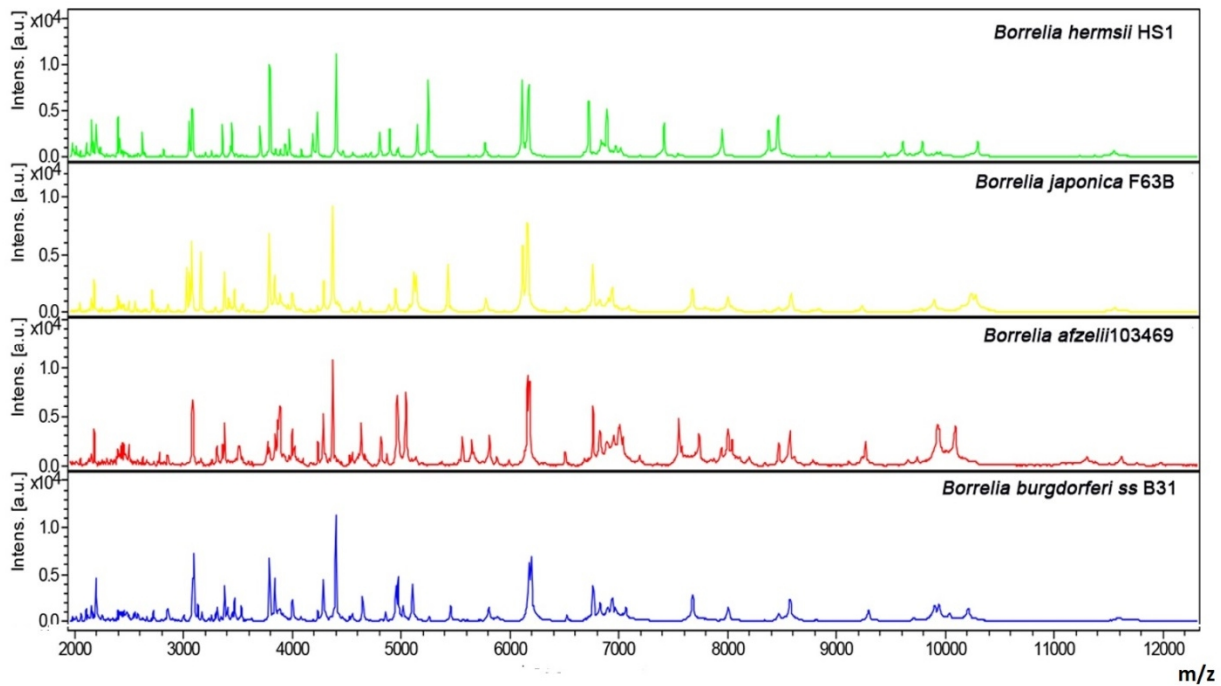


Figura 2.5. Spettri MSP ottenuti mediante analisi MALDI-TOF MS per i 4 ceppi di riferimento di *Borrelia* spp. inclusi nello studio.

Il ceppo di isolamento clinico UCSC appartenente alla specie *B. burgdorferi* ss e caratterizzato in studi precedenti mediante SDS-PAGE è stato identificato a livello di specie con un punteggio >2.0 per ogni replica saggiata. Le repliche di questo ceppo sono state utilizzate per creare lo spettro di riferimento.

Gli spettri di riferimento (MSP) ottenuti sono stati depositati nella banca dati dello strumento per poter essere successivamente utilizzati per l'identificazione di ceppi di isolamento clinico. Tutti i profili implementati sono risultati riproducibili in un secondo esperimento indipendente. Questa riproducibilità è stata convalidata mediante controlli negativi e positivi esterni che hanno confermato la validità dell'analisi.

Mediante il software MALDI Biotyper gli spettri MSP ottenuti per i 4 ceppi di riferimento e per il ceppo di isolamento clinico *B. burgdorferi* UCSC sono stati comparati tra loro e con gli "MSP spectra" delle 3 specie di *Borrelia* già presenti nella banca dati commerciale dello strumento (*B. burgdorferi* ss., *B. garinii* e *B. spielmanii*) attraverso la costruzione di un dendrogramma riportato in Figura 2.6.

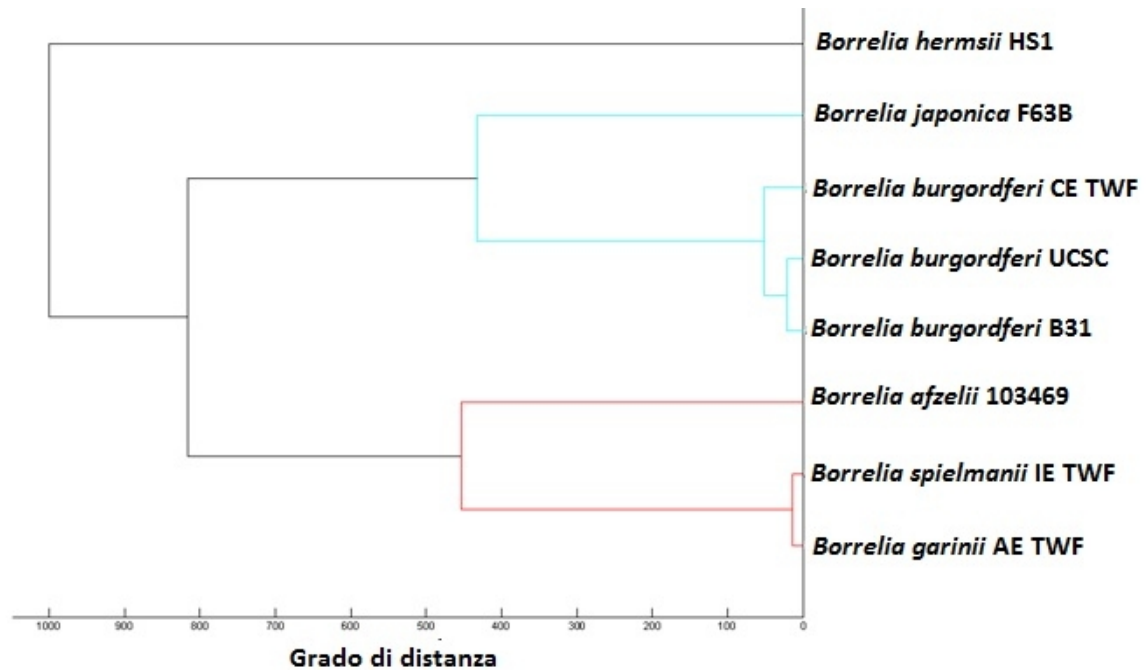


Figura 2.6. Dendrogramma relativo agli spettri MSP presenti nella nuova banca dati.

I 5 ceppi di isolamento clinico provenienti dalla Germania, i cui relativi spettri sono riportati in Figura 2.7, sono stati identificati a livello di specie con un valore identificativo >2.0 per ogni replica saggiata. Solo il ceppo MT 0407-M8 appartenente alla specie *B. lusitaniae* non è stato identificato a livello di specie, ma solo a livello di genere (lo spettro MSP di riferimento appartenente a questa specie non è presente nel "database" dello strumento), riportando un valore identificativo compreso tra 1.7 e 2.0 per ogni replica saggiata. Non è stata riscontrata nessuna cross-reaione con gli spettri delle altre specie di *Borrelia* presenti nella banca dati.

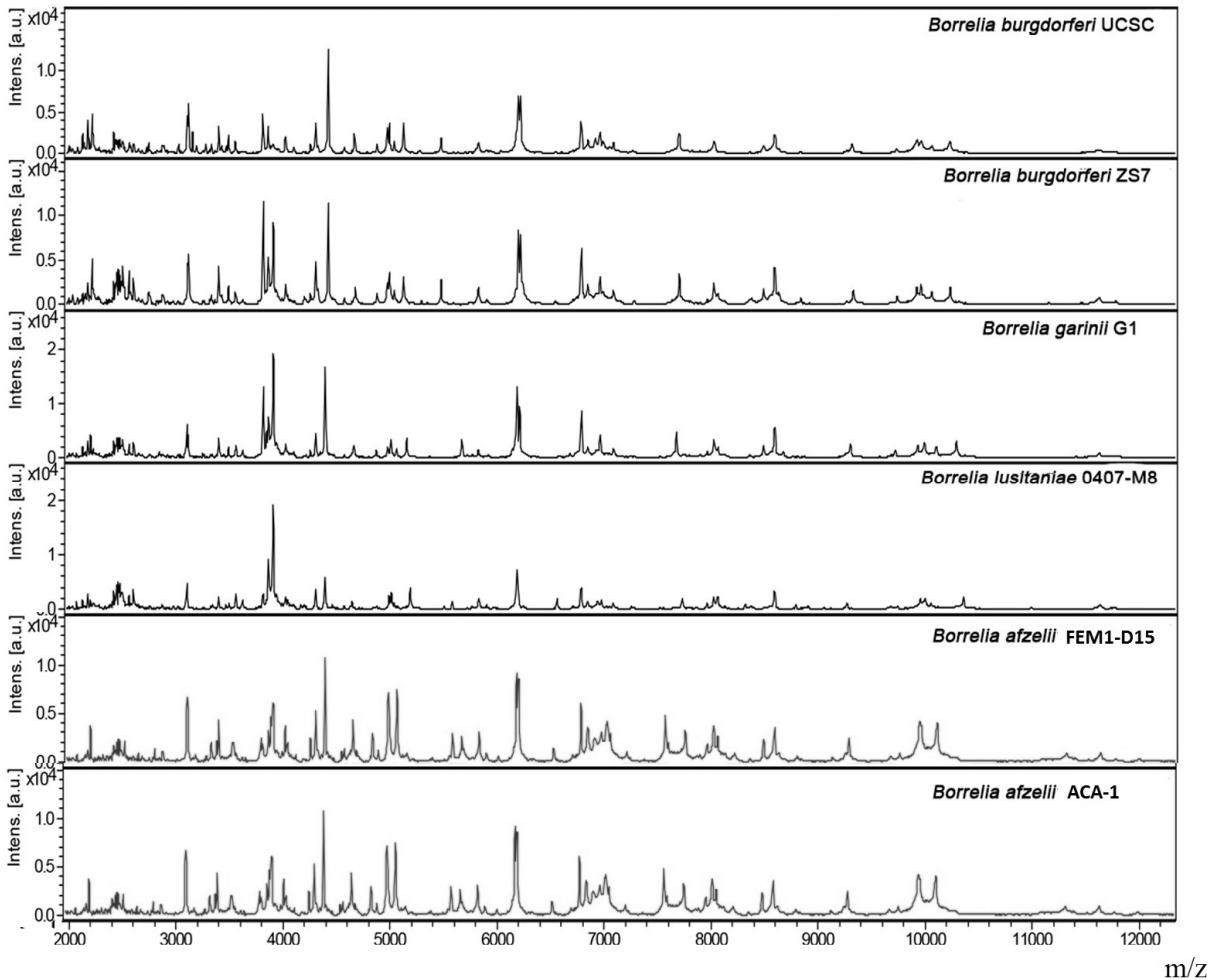


Figura 2.7. Profili proteici ottenuti mediante analisi MALDI-TOF MS per i ceppi di isolamento clinico di *Borrelia* spp. inclusi nello studio.

Analisi Statistica

Ogni singolo spettro implementato nel programma statistico è stato automaticamente ricalibrato rispetto a tutti gli altri e mostrato su un piano tridimensionale (Figura 2.8). Gli spettri implementati appartenenti a 4 differenti specie hanno mostrato profili proteici specie-specifici con picchi unici per ogni diversa specie. In Tabella 2.1 sono riportati i picchi discriminanti ottenuti dall’analisi statistica degli spettri delle diverse specie di *Borrelia*. In particolare, dei tre algoritmi utilizzati nello studio, quello che ha dato i valori più elevati di RC e CV è stato l’algoritmo SNN (RC: 100%; CV: 99,8%; 10 picchi discriminanti). La combinazione di presenza/assenza dei picchi consente di discriminare tra le 4 differenti specie.

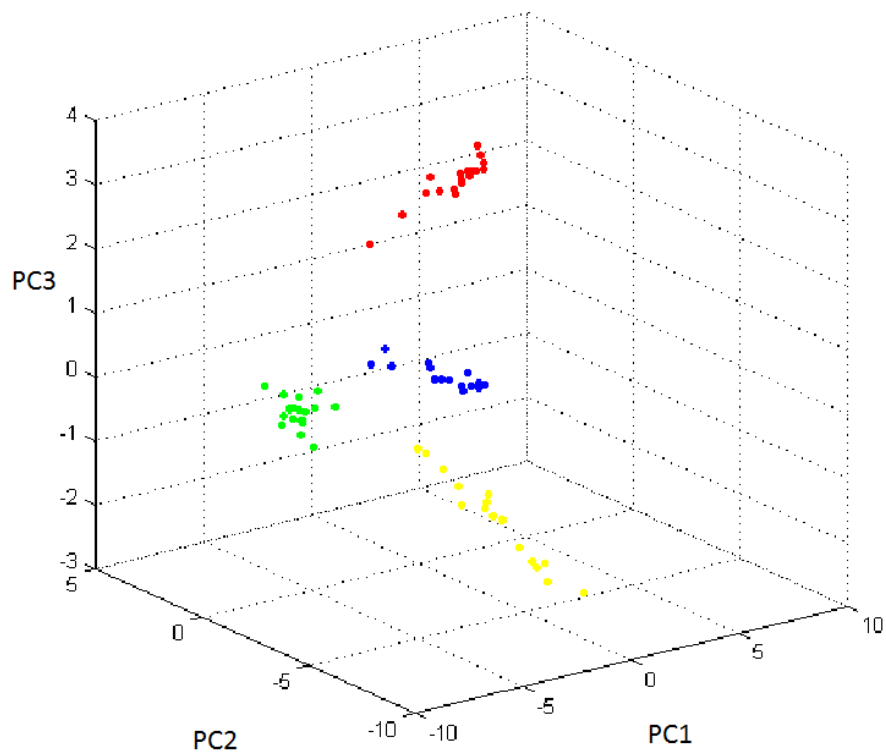


Figura 2.8. Grafico della clusterizzazione ottenuta sulla base della PCA relativo ai 4 ceppi di riferimento.

<i>Borrelia spp.</i>					
N.	Massa (Da)	<i>B. afzelii</i> 103469	<i>B. burgdorferi</i> B31	<i>B. hermsii</i> HS1	<i>B. japonica</i> F63B
1	3890,53	+	-	-	-
2	4005,69	+	+	-	+
3	4291,15	+	+	-	+
4	4376,47	+	-	-	+
5	4953,63	-	+	-	+
6	4974,68	+	+	-	-
7	6119,28	-	-	+	+
8	6181,13	+	+	-	-
9	6768,97	+	+	-	+
10	6944,05	-	+	-	+

"-": picco non rilevato; "+": picco rilevato;

Tabella 2.1. Picchi discriminanti ottenuti dall'analisi statistica dei 4 ceppi di riferimento.

2.1.2 *Leptospira* spp.

2.1.2.1 Introduzione

Il genere *Leptospira* appartiene alla famiglia delle *Leptospiraceae*, ordine *Spirochetales* (Levett, 2001). Le spirochete del genere *Leptospira* sono batteri aerobi obbligati, producono catalasi e ossidasi, hanno un metabolismo di tipo respiratorio e vivono in acque dolci. La loro lunghezza è compresa tra 6 e 20 μm , sono fortemente spiralizzate (lunghezza delle spire compresa tra 0,1 e 0,15 μm e ampiezza di 0,5 μm) e, a differenza di tutte le altre spirochete, possiedono estremità tipicamente ricurve ad uncino (Figura 2.9). Lo spostamento avviene attraverso un caratteristico duplice movimento: di rotazione e di traslazione intorno all'asse maggiore del corpo batterico ed in direzione dell'estremità non uncinata, rispettivamente. Inoltre, rispetto a tutte le altre spirochete, le leptospire hanno un diametro del corpo batterico più sottile pari a 0,1 μm , la presenza di due endoflagelli, un metabolismo di tipo aerobio, inoltre, richiedono acidi grassi come fonte di carbonio e l'incorporazione di sole basi puriniche. Sono coltivabili *in vitro* ad una temperatura ottimale compresa tra 28 e 30 °C al riparo della luce; le spirochete del genere *Leptospira*, infatti, sono in grado di crescere ad una temperatura di 37°C soltanto nell'ospite infettato. Principalmente sono coltivate in terreno liquido di Ellinghausen-McCullough modificato da Johnson e Harris (EMJH), contenente come nutrienti principali albumina, Tween 80, vitamina B2 e B12 (che rappresentano fattori di crescita fondamentali), acidi grassi a lunga catena (metabolizzati mediante beta-ossidazione ed utilizzati come unica fonte di carbonio), amminoacidi non essenziali, sali d'ammonio e siero di coniglio (Levett e Haake, 2009; Bendinelli et al., 2006).

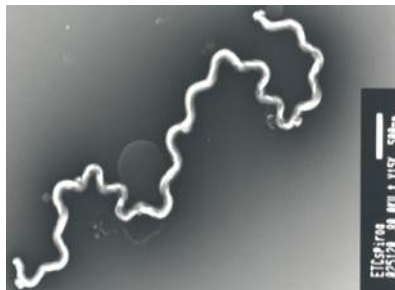


Figura 2.9. Struttura di *Leptospira interrogans* (Bendinelli et al., 2006).

Il genere *Leptospira* comprende un grande numero di specie suddivise in due diversi gruppi: *Leptospira interrogans sensu lato* comprendente 10 specie, delle quali almeno 7 sono patogene ed infettano i mammiferi, e circa 230 sierotipi patogeni riuniti in 23 sierogruppi, e *Leptospira biflexa sensu lato* comprendente specie non patogene, saprofiti delle acque dolci. (Levett e Haake, 2009). Le leptospire sono agenti eziologici di leptosirosi, antropozoonosi veicolata dall'acqua dolce, diffusa in tutto il mondo. In Italia le

aree di endemia maggiore sono le zone geografiche con maggiore concentrazione di corsi d'acqua o laghi. L'uomo contrae l'infezione in seguito al contatto diretto o indiretto con le urine o tessuti di roditori infetti. Le vie d'ingresso utilizzate da questo microrganismo sono rappresentate da tagli o abrasioni della cute e/o delle mucose rinofaringee e/o della congiuntiva. L'infezione può essere contratta anche in presenza di cute intatta, dopo immersione prolungata in acque contaminate attraverso l'inalazione di acqua o di aerosol, raramente mediante morso di animali infetti, e come dimostrato da recenti studi, in seguito all'ingestione di acqua contaminata (Barkin et al., 1974, Centers of Disease Control and Prevention, 1997).

Lo spettro delle manifestazioni cliniche della leptospirosi è estremamente ampio variando da una infezione subclinica ad un interessamento multiorgano con elevata mortalità. I batteri vengono eliminati per via urinaria per un lasso di tempo non definito, anche se un pH urinario debolmente acido ne limita la sopravvivenza. L' infezione da *Leptospira* rimane spesso asintomatica, infatti, indagini sierologiche rivelano infezioni pregresse in pazienti che non avevano manifestato sintomi. Nei casi sintomatici di leptospirosi, le manifestazioni cliniche variano da lievi a gravi fino alla possibile morte del paziente. Più del 90% dei pazienti sintomatici hanno una forma relativamente lieve e solitamente anitterica di leptospirosi, con o senza meningite. La leptospirosi grave con ittero (sindrome di Weil) si sviluppa nel 5-10% degli individui infetti (Bendinelli et al., 2006) (Figura 2.10).

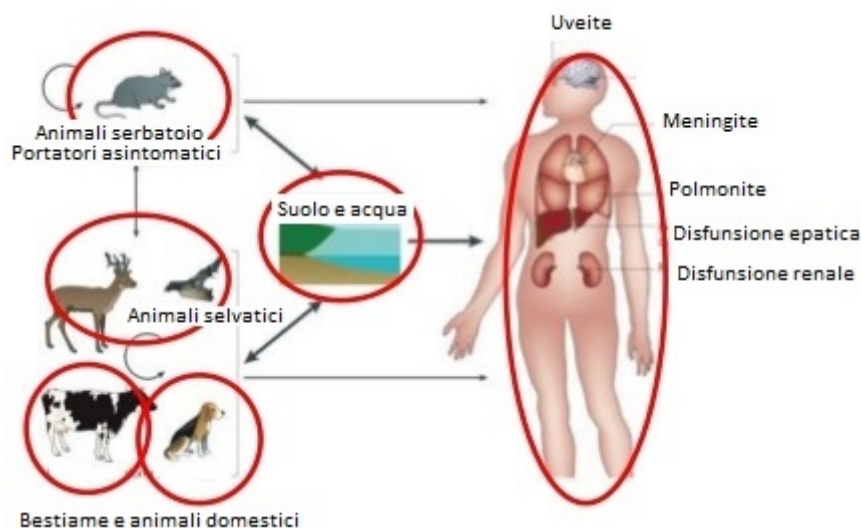


Figura 2.10. Ciclo di trasmissione delle leptospire. Modificata da www.slideshare.net/GRFDAVOS/drivers-of-leptospirosis-transmission-at-the-human-animal-interface-in-distinct-community-types.

L'accertamento eziologico in Italia è riservato ai laboratori di riferimento per la leptospirosi del Ministero della Sanità distribuiti sul territorio nazionale, in genere uno per regione.

La diagnosi di laboratorio di leptospirosi può essere condotta sia mediante metodi diretti (presenza del microrganismo o di suoi componenti), sia mediante metodi indiretti (ricerca di anticorpi di classe IgG e IgM specifici) (Vinetz, 2001).

Il metodo di riferimento per la diagnosi di laboratorio di infezione da leptospire è la ricerca diretta mediante isolamento del batterio in coltura a partire da campioni biologici (sangue, urine e liquor). Trenta giorni di incubazione a 30°C sono necessari prima di considerare l'esito dell'esame colturale negativo. Sugli stessi campioni biologici utilizzati per l'esame colturale è possibile effettuare anche la ricerca rapida del DNA delle leptospire mediante l'utilizzo di saggi molecolari basati sulla Reazione Polimerasica a Catena (PCR) aventi come bersaglio il gene 16S-rDNA di questi batteri. Tuttavia, i molti saggi molecolari attualmente disponibili, seppur più sensibili ed affidabili, non consentono l'identificazione univoca di ceppi di *Leptospira* (Bandinelli et al., 2006; Vinetz, 2001). Dal settimo giorno di malattia si può fare ricorso alla sierodiagnosi mediante il saggio di agglutinazione microscopica (MAT) che, in genere, permette di identificare il sierotipo ma è laborioso, richiede il mantenimento in coltura di ceppi di leptospire e viene eseguito solo in laboratori di riferimento quali il nostro che è il Laboratorio di Riferimento per l'Istituto Superiore della Sanità per la regione Emilia Romagna.

Per superare i limiti dei saggi attualmente disponibili per la diagnosi di laboratorio di leptospirosi, in questo studio, è stata valutata l'utilità del sistema MALDI-TOF MS per l'identificazione di ceppi di *Leptospira* di isolamento clinico, non solo a livello di specie ma anche di sierotipo, grazie alla creazione di un nuovo "database home-made" vista la completa assenza di spettri di *Leptospira* spp. all'interno della banca dati commerciale dello strumento in uso presso il nostro laboratorio.

2.1.2.2 Materiali e Metodi

Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita

In questo studio sono stati impiegati 20 ceppi di riferimento di *Leptospira* spp., appartenenti alle specie *L. interrogans*, *L. borgpetersenii*, *L. kirshneri*, *L. noguchii*, *L. fainei*, *L. biflexa* elencati in Tabella 2.2: 18 provenienti dall'Istituto Superiore di Sanità di Roma (Laboratorio di riferimento Nazionale per la Leptospirosi) e 2 gentilmente forniti dall'Istituto Pasteur di Parigi (Centro di riferimento francese per la Leptospirosi).

Tutti i ceppi utilizzati sono stati coltivati in doppio in terreno EMJH a 30°C per 7 giorni.

Per la preparazione del terreno EMJH sono stati disciolti 2,3 grammi di terreno Medium Base in polvere (Difco™, Beckton Dickinson, USA) in 900 ml di acqua bidistillata sterile miscelando accuratamente fino al completo scioglimento della polvere. La soluzione

ottenuta è stata suddivisa in aliquote da 450 ml e sterilizzata in autoclave per 15 minuti. Una volta raffreddato, al terreno sono stati aggiunti sterilmente 50 ml di Leptospira Enrichment EMJH (Difco™, Beckton Dickinson, USA) contenente 100 g di albumina bovina, 12,5 gr di polisorbato 80 e 1,6 gr di fattori di crescita per litro.

Prima di procedere all'estrazione delle proteine batteriche, le colture sono state osservate al microscopio ottico per escludere la contaminazione con altri microrganismi e le leptospire contaminate come descritto nel paragrafo 2.1.1.2.

Sierotipo	Sierogruppo	Ceppo	Genomospecie	Patogenicità
Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Bataviae	Bataviae	Pavia 1	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Bratislava	Australis	Riccio2	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Canicola	Canicola	Alarik	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Copenhageni	Icterohaemorrhagiae	Wijnberg	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Hardjo	Sejroe	Hardjoprajitno	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Hardjo	Sejroe	Farina C. 715	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis H	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Icterohaemorrhagiae	Icterohaemorrhagiae	Bianchi 1	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Lora	Australis	Riccio 37	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Pomona	Pomona	Mezzano I	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Saxkoebing	Sejroe	Mus 24	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Zanoni	Pyrogenes	Zanoni	<i>L. interrogans</i>	Patogena
Sejroe	Sejroe	Topo 1	<i>L. borgpeterseni</i>	Patogena
Mini	Mini	Sari	<i>L. borgpeterseni</i>	Patogena
Castellonis	Ballum	Castellon 3	<i>L. borgpeterseni</i>	Patogena
Grippotyphosa	Grippotyphosa	Moskva V	<i>L. kirschneri</i>	Patogena
Panama	Panama	CZ 214 K	<i>L. noguchii</i>	Patogena
Hurstbridge	Hurstbridge	BUT6	<i>L. fainei</i>	Patogenicità Intermedia
Patoc	Semarang	Patoc 1	<i>L. biflexa</i>	Saprofita

Tabella 2.2. Ceppi di riferimento di *Leptospira* spp. inclusi nello studio. Modificata da: Brenner et al., 1999 e Calderaro et., 2014b.

Lo scongelamento e il successivo ricongelamento dei ceppi di *Leptospira* spp. sono stati eseguiti come descritto nel paragrafo 2.1.1.2.

Analisi mediante MALDI-TOF MS

I protocolli previsti per la solubilizzazione della matrice, per l'estrazione proteica, per la pulizia ed allestimento della piastra "target", per la calibrazione dello strumento, per l'acquisizione degli spettri, per l'implementazione della banca dati, per l'identificazione e per la costruzione del dendrogramma sono gli stessi descritti nella sezione Materiali e Metodi, paragrafo 2.1.1.2.

L'analisi mediante MALDI-TOF MS è stata condotta a partire da 1 ml di leptospire in coltura ad una concentrazione di 1×10^6 /ml.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta mediante un programma statistico dedicato (ClinProTools, Bruker Daltonics) come descritto nella sezione Materiali e Metodi, paragrafo 2.1.1.2. In particolare in questo studio sono state eseguite due differenti analisi statistiche, una per discriminare i sierotipi appartenenti alla specie *L. interrogans* ed una per i sierotipi appartenenti alla specie *L. borgpetersenii*, entrambe effettuate all'interno dell'intervallo di PM compreso tra 3 e 12 kDa.

2.1.2.3 Risultati

Analisi mediante MALDI-TOF

Gli spettri proteici, ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS, con acquisizione automatica, ed analizzati utilizzando il programma FlexAnalysis hanno rivelato differenze tra le diverse specie di *Leptospira* analizzate (Figura 2.11).

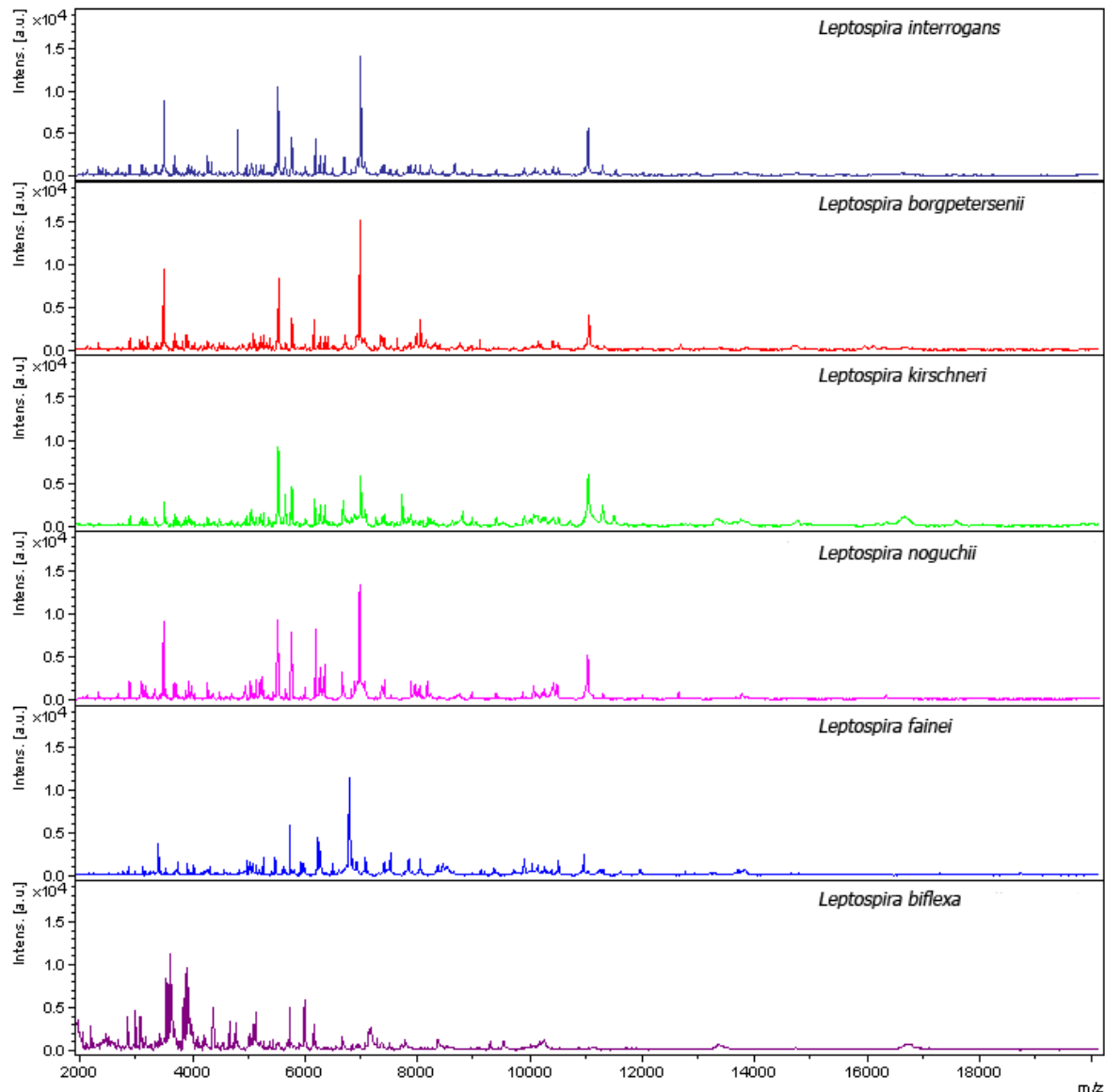


Figura 2.11. Spettri ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS riferibili alle 6 specie di *Leptospira* analizzate.

Gli spettri ottenuti dai ceppi di riferimento coltivati in differenti lotti di terreno EMJH non hanno mostrato differenze. In ogni seduta di lavoro per il controllo negativo non sono stati rilevati picchi, mentre per il controllo positivo è stato sempre identificato *E. coli*, con un valore di identificazione > 2.0.

Quando confrontati con la banca dati commerciale fornita dalla ditta produttrice, per i profili proteici dei 20 ceppi di leptospire non è stata ottenuta alcuna identificazione (punteggio migliore < 1.3); per questa ragione gli spettri ottenuti possono essere considerati originali.

Le repliche selezionate per ciascun ceppo di riferimento, mediante l'analisi precedentemente effettuata (FlexAnalysis), sono state utilizzate per la creazione di uno

spettro di riferimento (MSP Spectrum) attraverso il programma dedicato MALDI-Biotyper. Un singolo MSP-Spectrum per ogni singolo ceppo utilizzato nello studio è stato creato e i 20 MSP-Spectra ottenuti sono stati implementati all'interno della banca dati commerciale dello strumento.

Successivamente i 20 ceppi di leptospire in un secondo esperimento indipendente sono stati correttamente identificati a livello di specie (punteggio migliore > 2.3), ma non è stata ottenuta alcuna discriminazione a livello di sierotipo.

Il dendrogramma costruito con i 20 MSP-Spectra (Figura 2.12) implementati nella banca dati è formato da due rami principali: il primo formato dalla specie non patogena *L. biflexa* e dalla specie a patogenicità intermedia *L. fainei* ed il secondo che raggruppa insieme le specie patogene *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. noguchii* e *L. borgpetersenii*. Il secondo gruppo è ulteriormente suddiviso in due rami, contenenti rispettivamente *L. borgpetersenii* in uno e *L. interrogans*, *L. kirschneri* e *L. noguchii* nell'altro. Quest'ultimo, a sua volta, è suddiviso in due rami ulteriori: il primo comprendente la sola specie *L. noguchii*, il secondo le specie *L. interrogans* e *L. kirshneri* non separabili tra loro.

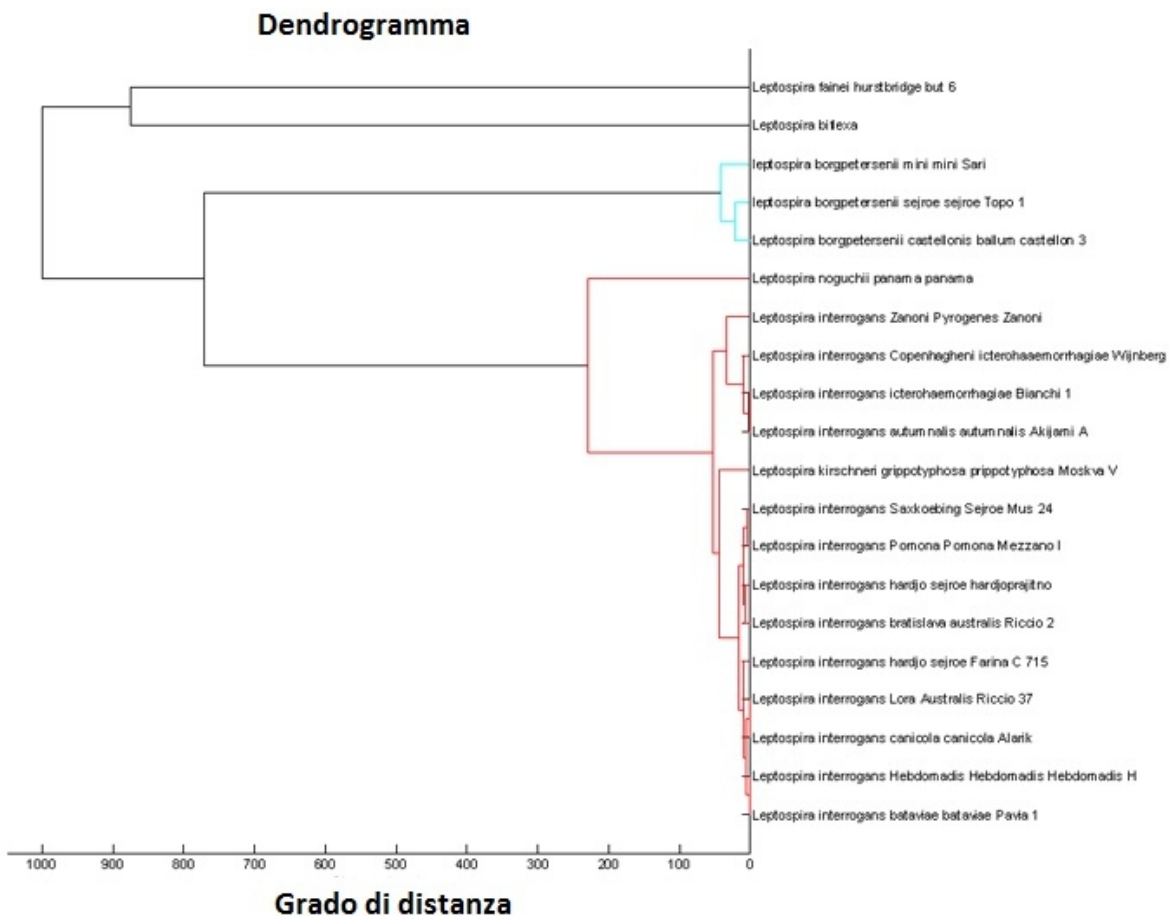


Figura 2.12. Dendrogramma basato sui "Main Spectra Profiles" (MSP) dei 20 ceppi di riferimento di *Leptospira* spp. analizzati in questo studio.

Inoltre, il dendrogramma costruito con gli MSP-Spectra dei ceppi appartenenti ai generi *Borrelia* e *Leptospira* acquisiti in questo studio, e appartenenti al genere *Brachyspira* (implementati in un lavoro precedentemente condotto) (Calderaro et al., 2013a) mostra tre gruppi principali separati tra loro, uno per ogni genere, escludendo possibili mis-identificazioni tra i 3 differenti generi di spirochete (Figura 2.13).

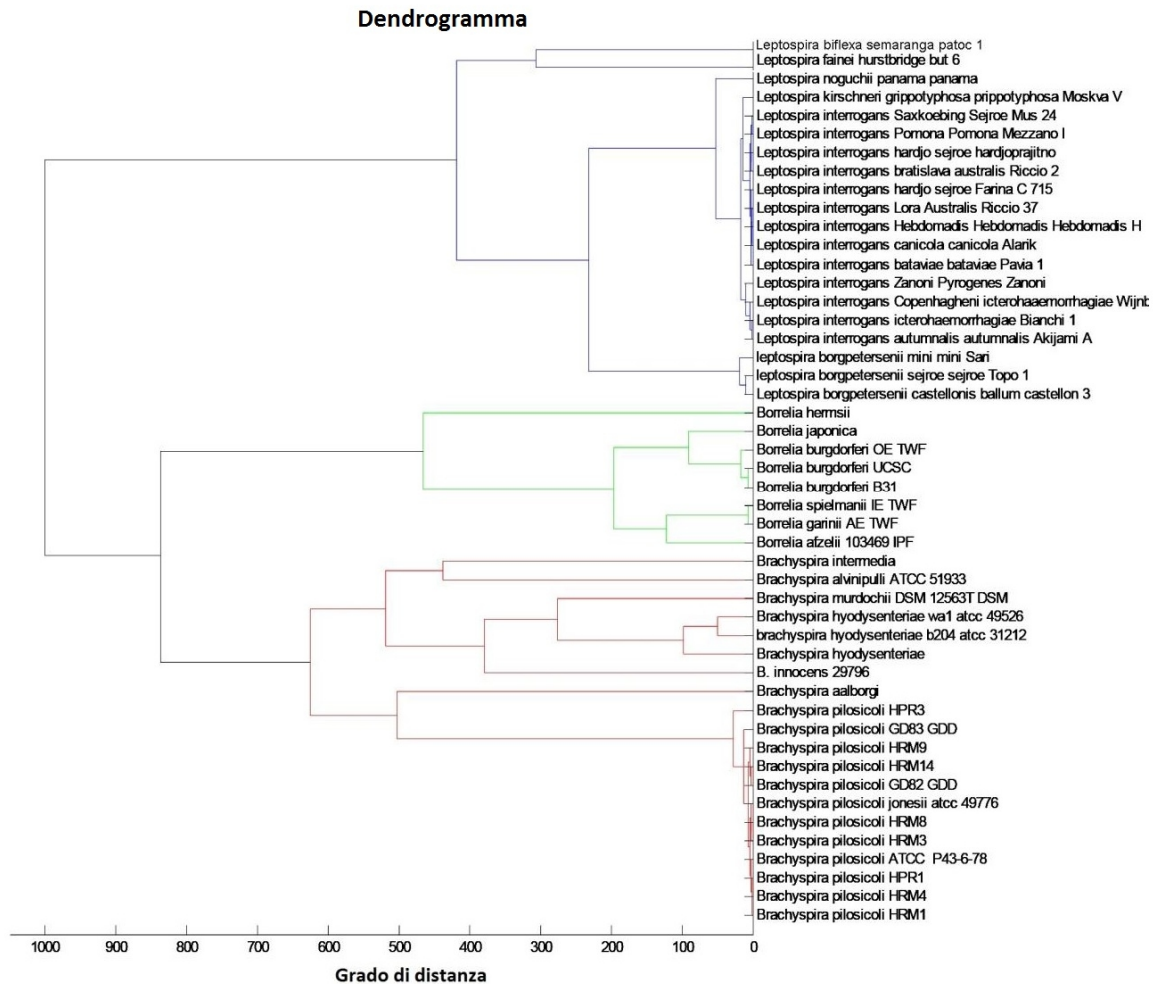


Figura 2.13. Dendrogramma creato con gli MSP-Spectra dei ceppi appartenenti ai generi *Leptospira*, *Borrelia* e *Brachyspira*.

Identificazione a livello di sierotipo mediante analisi statistica

Ogni singolo spettro importato nel programma statistico è stato automaticamente ricalibrato rispetto a tutti gli altri e mostrato su un piano bidimensionale (Figura 2.14).

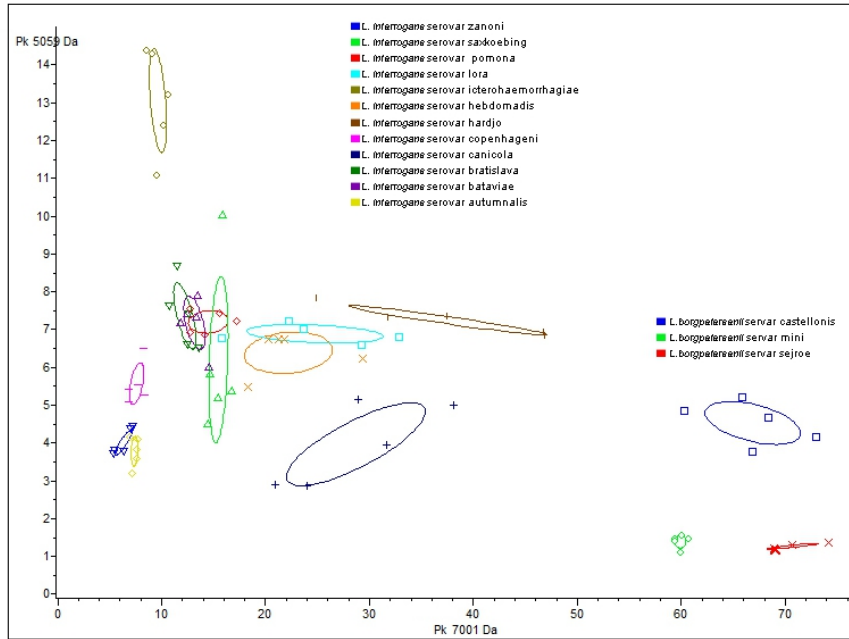


Figura 2.14. Differenze fra i sierotipi delle specie *L. interrogans*, *L. borgpetersenii* e *L. kirshneri* utilizzati in questo studio. La “Distribuzione dei picchi con visualizzazione bidimensionale” mostra la distribuzione dei 16 differenti sierotipi (nella figura sono mostrati 5 replicati per ogni sierotipo) analizzati in base ai primi due migliori picchi discriminanti tra gli spettri di tutti i sierotipi considerati. I simboli rappresentano il rapporto area/intensità relazionati ai due picchi considerati per ogni spettro; gli stessi simboli raffigurano le repliche degli stessi sierotipi e le ellissi rappresentano la deviazione standard tra gli stessi sierotipi.

Il grafico oltre alle specie *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, per le quali sono presenti più sierotipi riporta anche la specie *L. kirshneri* che, come mostrato nel dendrogramma, risulta difficilmente separabile da *L. interrogans*.

Piccole differenze tra i diversi sierotipi della stessa specie sono state rivelate.

In Tabella 2.3 è riportata la combinazione dei picchi discriminanti ottenuti dall’analisi statistica degli spettri dei diversi sierotipi della specie *L. interrogans*. In particolare, dei tre algoritmi utilizzati nello studio, quello che ha dato i valori più elevati di RC e CV è stato l’algoritmo SNN (RC: 100%; CV: 79,29%; 20 picchi discriminanti).

Sierotipi	Massa del picco (m/z) espressa in Dalton																			
	3,506	3,684	3,952	5,059	5,527	5,658	5,671	5,782	6,193	6,284	6,356	6,915	6,941	6,970	7,013	7,059	7,077	7,902	11,049	11,311
Autumnalis	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Canicola	§	-	§	-	-	§	-	§	+	§	-	+	+	+	+	+	+	§	-	§
Icterohaemorrhagiae	§	+	+	+	+	§	-	+	-	-	+	-	-	§	+	§	+	+	+	+
Hardjo	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	§	-	§
Hebdomadis	§	+	+	+	-	-	-	§	+	-	-	-	§	§	-	+	+	§	-	-
Pomona	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	§	+	+	+	+	+	-	-
Saxkoebing	-	-	§	+	-	-	-	§	-	§	§	-	§	+	+	+	+	+	+	§
Batavie	+	+	§	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	§	+	+
Bratislava	+	+	+	+	+	+	§	+	+	+	+	§	+	+	+	+	+	+	+	+
Lora	-	-	+	§	-	-	+	+	§	+	+	-	-	-	-	§	§	+	-	-
Copenhageni	-	+	+	§	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	§	§	+	-
Zanoni	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	§	+

L'identificazione di ogni sierotipo deriva dalla combinazione di 20 picchi considerati discriminanti. "+": picco con un rapporto aria/intensità dello spettro medio del sierotipo maggiore rispetto allo spettro medio totale del picco rispettivo considerato; "-": nessun picco rilevato; "§": picco con un rapporto aria/intensità dello spettro medio del sierotipo minore rispetto allo spettro medio totale del picco rispettivo considerato.

Tabella 2.3. Picchi discriminanti ottenuti dall'analisi statistica dei 12 sierotipi appartenenti alla specie *L. interrogans*.

Nello specifico, il sierotipo Autumnalis è caratterizzato dalla presenza di soli 3 picchi (3684 Da, 5527 Da e 11049 Da), il sierotipo Bratislava dalla presenza di tutti i picchi eccetto quelli di 5671 Da e 6915 Da. Allo stesso modo, per i restanti sierotipi la combinazione della presenza/assenza di picchi discriminanti mostrati in Tabella 2.3 risulta essere discriminatoria fra i vari sierotipi.

Analogamente, la combinazione dei picchi discriminanti ottenuta per i sierotipi della specie *L. borgpetersenii* è riportata in Tabella 2.4. In questa seconda analisi l'algoritmo GA ha mostrato i valori più alti dei parametri presi in considerazione (RC: 100%; CV: 96%; 5 picchi discriminanti). In particolare, la presenza del picco di 3024 Da è caratteristico del sierotipo Mini e l'assenza del picco di 8068 Da è caratteristico del sierotipo Sejroe.

Sierotipi	Massa del picco (m/z) espressa in Dalton				
	3,024	3,499	6,728	7,357	8,068
Castellonis	-	+	§	+	+
Mini	+	§	+	-	+
Sejroe	-	+	+	+	-

L'identificazione di ogni sierotipo deriva dalla combinazione di 20 picchi considerati discriminanti. "+": picco con un rapporto aria/intensità dello spettro medio del sierotipo maggiore rispetto allo spettro medio totale del picco rispettivo considerato; "-": nessun picco rilevato; "§": picco con un rapporto aria/intensità dello spettro medio del sierotipo minore rispetto allo spettro medio totale del picco rispettivo considerato.

Tabella 2.4. Picchi discriminanti ottenuti dall'analisi statistica dei 3 sierotipi appartenenti alla specie *L. borgpetersenii*.

2.2 Micologia

2.2.1 Dermatofiti

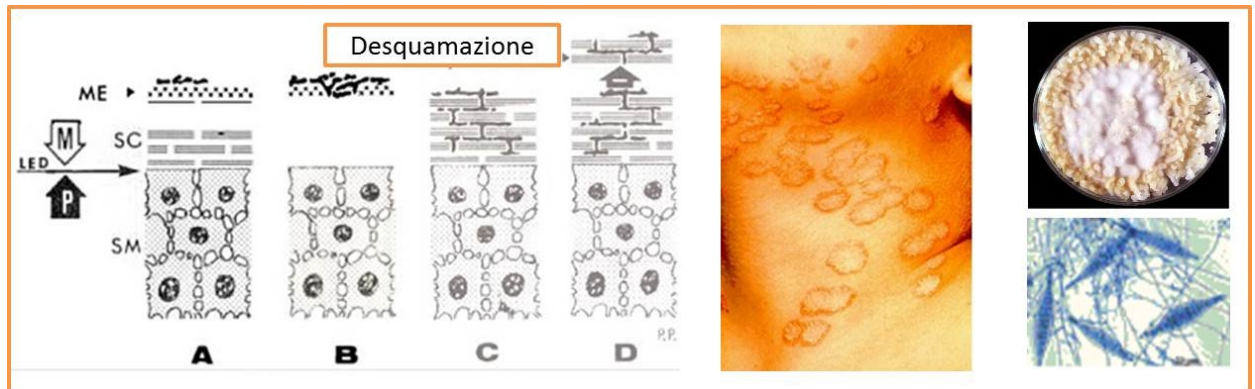
2.2.1.1 Introduzione

Le infezioni micotiche della cute costituiscono un gruppo di affezioni molto frequenti ed includono una grande varietà di malattie a differente eziologia, nelle quali il tegumento ed i suoi annessi, quali peli ed unghie, sono variamente interessati (Havlickova et al., 2008).

La maggior parte delle micosi della cute e degli annessi è riconducibile ad un gruppo omogeneo di miceti noti come dermatofiti e, per estensione, le manifestazioni cliniche corrispondenti vengono denominate dermatofitosi o dermatofizie (Nenoff et al., 2013).

I dermatofiti sono funghi filamentosi con micelio settato che hanno in comune una precisa caratterizzazione morfologica ed una specifica attività biologica che si esprime essenzialmente nella spiccata capacità di demolire attivamente, *in vivo* ed *in vitro*, la cheratina (Weitzman e Summerbell, 1995). Il processo di colonizzazione ed invasione dello strato corneo si realizza mediante l'aderenza degli artroconidi ai corneociti. All'aderenza

segue la germinazione degli artroconidi, la successiva penetrazione dei tubi germinativi nello strato corneo ed infine la formazione di ife con rapida diffusione centrifuga in ogni direzione (Pinetti, 1977) (Figura 2.15). L'infezione sostenuta dai dermatofiti è solitamente limitata allo strato corneo dell'epidermide, alle unghie, ai peli ed ai capelli. Indipendentemente dal sito anatomico coinvolto, il dermatofita determina nell'ospite una reazione di tipo eczematoso, seguita da manifestazioni infiammatorie ed allergiche (Weitzman and Summerbell, 1995) (Figura 2.15).



A: fase di insediamento; **B:** fase di colonizzazione; **C:** fase di parassitismo; **D:** fase di stabilizzazione dinamica. **ME:** mantello epicutaneo; **SC:** strato corneo; **SM:** strato malpighiano **M:** penetrazione invasiva miceliale; **P:** proliferazione e desquamazione epidermica; **LED:** linea di equilibrio dinamico bilanciato.

Figura 2.15. Rappresentazione grafica delle fasi del parassitismo dermatofitico dell'epidermide (Pinetti, 1977) e un esempio di *tinea corporis* causata da *Microsporum canis* con relativa coltura su chicchi di riso ed immagine della micromorfologia (www.mycology.adelaide.edu.au).

I dermatofiti appartengono a tre generi tassonomicamente correlati: *Microsporum* e *Trichophyton* di cui si riconoscono numerose specie, ed *Epidermophyton* con la sola specie patogena *E. floccosum*. L'infezione può realizzarsi per contagio eterologo diretto o indiretto (uomo/uomo; animali/uomo; ambiente/uomo) oppure per autocontagio conseguente al trasferimento di materiale patologico infettante da un punto all'altro della superficie corporea.

In relazione alle probabili fonti di isolamento questi miceti possono essere epidemiologicamente distinti in tre grandi categorie: antropofili, zoofili, geofili (Tabella 2.5) (de Hoog et al., 2000).

Specie Antropofile	Specie Zoofile	Specie Geofile
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. cookei</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>M. ferrugineum</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. gourvilli</i>	<i>T. mentagrophytes var. erinacei</i>	<i>M. persicolor</i>
<i>T. megninii</i>	<i>T. mentagrophytes var. mentagrophytes</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. mentagrophytes var. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes var. quinckeanum</i>	
<i>T. rubrum</i>	<i>T. simii</i>	
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. verrucosum</i>	
<i>T. soudanense</i>		
<i>T. tonsurans</i>		
<i>T. violaceum</i>		
<i>T. yaundeii</i>		

Tabella 2.5. Distribuzione dei miceti dermatofiti nelle categorie Antropofili, Zoofili, Geofili.

Le diverse specie di dermatofiti patogene per l'uomo presentano una differente distribuzione e frequenza di isolamento. Tale irregolarità dipende spesso da fattori geografici, economici e sociali (Macura, 1993).

Nell'area di Parma i miceti più frequentemente isolati sono *Microsporium canis*, il più frequente agente di *tinea capitis* e *tinea corporis* in età pediatrica, e *Trichophyton rubrum*, maggior agente di *tinea corporis*, *tinea cruris* e *tinea unguium* nella popolazione adulta, seguito da *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale*. Tuttavia in anni recenti è stata osservata un'aumentata frequenza di miceti rari nel nostro territorio, quali *T. violaceum*, *T. soudanense* e *M. audouinii* probabilmente imputabile all'aumentato flusso migratorio da regioni nordafricane nelle quali queste muffe sono endemiche.

La diagnosi di laboratorio delle dermatofitosi si avvale dell'esame micologico diretto e dell'esame micologico colturale oltre che di alcuni altri approcci diagnostici supplementari.

La diagnosi di laboratorio delle dermatofitosi si basa essenzialmente sull'isolamento del micete nei campioni biologici e sull'identificazione dell'agente eziologico mediante un esame macro-micromorfologico delle colonie (Weitzam and Kane, 1991). L'esame macroscopico prevede che vengano annotati il tempo di crescita della colonia, la sua morfologia (cotonosa, lanuginosa, vellutata, farinosa, granulosa, gessosa, rugosa, mammellonata, crateriforme, cerebriforme), il colore del verso e del retro e la produzione di pigmento che viene verificata osservando il fondo della piastra). L'esame micromorfologico può essere effettuato prelevando un frammento di colonia, con la tecnica dello scotch o mediante coltura su vetrino secondo il metodo Riddel, che consente di preservare e valutare le strutture fungine deputate alla conidiogenesi. L'identificazione di una specie dermatofitica si realizza, infatti, mediante l'osservazione microscopica degli organi di riproduzione (macroconidi e microconidi), della presenza/assenza di clamidospore, ossia formazioni con parete molto spessa, derivanti dal micelio, che consentono la

sopravvivenza del micete in condizioni sfavorevoli, e di organi ornamentali (de Hoog et al., 2000). Per quanto riguarda il complesso *T. mentagrophytes*, l'identificazione risulta particolarmente complessa a causa delle strette correlazioni inter-specie non completamente note presenti all'interno di questo gruppo (Pacceu et al., 2013).

Le metodiche sopra descritte oltre a richiedere personale altamente specializzato comportano lunghi tempi di refertazione. Negli ultimi decenni sono state approntate tecniche molecolari che consentono di identificare specie di dermatofiti sia dalla coltura che direttamente dal materiale clinico (Graser et al., 2012). Tuttavia, i metodi molecolari che si basano principalmente sull'amplificazione di alcuni frammenti del DNA (Internally Spaces Region, ITS; Beta Tubulin, BT; Actin, Act) pur essendo molto sensibili e rapidi sono costosi e difficilmente applicabili nella pratica diagnostica (Larone et al., 2002; Pacceu et al., 2013).

Come riportato in letteratura, seppure con delle limitazioni, l'introduzione della tecnologia MALDI-TOF potrebbe rappresentare un'utile alternativa ai metodi convenzionali e molecolari anche per l'identificazione dei dermatofiti (Theel et al., 2011; Pacceu et al., 2013). Tuttavia, la sua applicazione all'identificazione dei funghi filamentosi ed, in particolare, ai dermatofiti resta per ora limitata.

Ad oggi, le banche dati commerciali sviluppate contengono solo alcune tra le specie più diffuse di dermatofiti; inoltre antecedentemente a questo studio è stata rilevata, nel nostro laboratorio, una mis-identificazione di ceppi appartenenti al complesso *T. mentagrophytes* con la specie *T. tonsurans*. Questo studio si propone l'ampliamento della banca dati dello spettrometro di massa MALDI-TOF per cercare di superare i problemi precedentemente riscontrati ed ottenere una corretta identificazione di specie di dermatofiti rare nel nostro territorio, la cui frequenza negli ultimi anni è aumentata probabilmente a causa dei flussi migratori da regioni endemiche, e non presenti come specie di riferimento all'interno del "database" commerciale.

2.2.1.2 Materiali e Metodi

Ceppi e campioni utilizzati nello studio e condizioni di crescita

In questo studio sono stati inclusi 24 ceppi di riferimento (Tabella 2.6) di cui 13 ceppi derivanti da controlli esterni di qualità "UK NEQAS" (The United Kingdom National External Quality Assessment Service for Microbiology), quali *Epidermophyton floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. persicolor*, *T. rubrum* (2), *T. interdigitale* (3), *T. erinacei*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes* e 11 ceppi di isolamento clinico (2 *M. canis*, 1 *T. rubrum*, 1 *T. tonsurans*, 1 *T. violaceum*, 1 *T. soudanense*, 1 *M. audouinii*, 2 *T. mentagrophytes* e 2 *T. interdigitale*) identificati mediante coltura su vetrino (metodo di Riddel), utilizzando agar

potato e seguendo i criteri identificativi di riferimento (De Hoogh et al., 2000). Questi ceppi isolati da campioni clinici sono stati inoltre caratterizzati mediante sequenziamento genico, previa amplificazione con primers in grado di riconoscere la regione 5.8S/ITS2 del DNA ribosomale (Borazjani et al., 1998), ed implementati nel “database” commerciale dello strumento MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics).

Specie	Identificativo	Specie	Identificativo
<i>Epidermophyton floccosum</i>	NEQAS 1207	<i>M. canis</i>	PR#1
<i>Microsporum canis</i>	NEQAS 0164	<i>M. canis</i>	PR#2
<i>M. gypseum</i>	NEQAS 7177	<i>T. rubrum</i>	PR#1
<i>M. fulvum</i>	NEQAS 9834	<i>T. tonsurans</i>	PR#1
<i>M. persicolor</i>	NEQAS 0165	<i>T. violaceum</i>	PR#1
<i>Trichophyton rubrum</i>	NEQAS 0544	<i>T. soudanense</i>	PR#1
<i>T. rubrum</i>	NEQAS 1515	<i>M. audouinii</i>	PR#1
<i>T. interdigitale</i>	NEQAS 0389	<i>T. mentagrophytes</i>	PR#1
<i>T. interdigitale</i>	NEQAS 1681	<i>T. mentagrophytes</i>	PR#2
<i>T. interdigitale</i>	NEQAS 1208	<i>T. interdigitale</i>	PR#1
<i>T. erinacei</i>	NEQAS 0388	<i>T. interdigitale</i>	PR#2
<i>T. tonsurans</i>	NEQAS 0865		
<i>T. mentagrophytes</i>	NEQAS 0866		

Tabella 2.6 Ceppi di riferimento inclusi nello studio.

Per verificare l'affidabilità nell'identificazione dei dermatofiti mediante il “nuovo” “database” creato sono stati analizzati 64 ceppi di isolamento clinico pervenuti a scopo diagnostico presso l'Unità Operativa di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (3 *E. floccosum*, 7 *M. canis*, 1 *M. audouinii*, 2 *T. violaceum*, 3 *T. tonsurans*, 23 *T. rubrum*, 19 *T. mentagrophytes*, 2 *T. interdigitale*, 2 *T. soudanense*, 1 *M. gypseum* e 1 *M. persicolor*).

Tutti i ceppi fungini analizzati in questo studio, sia i 13 ceppi di riferimento UK-NEQAS sia i 75 ceppi isolati da campioni clinici (capelli, squame, unghie) provenienti da altrettanti pazienti con sospetta *Tinea*, sono cresciuti su piastre di agar Sabouraud destrosio addizionato di cloramfenicolo (Kima, Padova, Italia) dopo incubazione a 30°C per un periodo variabile da 10 a 20 giorni.

Analisi mediante MALDI-TOF MS

I protocolli previsti per la pulizia ed allestimento della piastra “target”, per la calibrazione dello strumento, per l'acquisizione degli spettri, per l'implementazione della banca dati e per la costruzione del dendrogramma sono gli stessi descritti nella sezione Materiali e Metodi, paragrafo 2.1.1.2. Per i dermatofiti a causa dello spessore della loro parete chitinosa il protocollo di estrazione delle proteine ribosomiali ha richiesto poche ma

fondamentali modifiche rispetto al protocollo precedentemente utilizzato che riguardano il materiale di partenza e il tempo di contatto delle strutture fungine con l'acido formico. In breve: il micelio aereo della colonia fungina è stato prelevato con un tampone inumidito con H₂O (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia) e stemperato in 1,5 ml di H₂O sterile fino ad ottenere una soluzione torbida costituita da conidi e frammenti di micelio. Tale sospensione è stata centrifugata per 10 minuti a 10,000 x g. Dopo aver eliminato il sopranatante il sedimento è stato risospeso in 300 µl di H₂O ed addizionato di 900 µl di etanolo assoluto. La sospensione ottenuta è stata quindi ricentrifugata per 5 minuti a 10,000 x g ed il sedimento è stato esposto all'aria fino a completa evaporazione dell'etanolo. L'incubazione con acido formico al 70% (30 µl) è stata aumentata fino a 45 minuti al fine di migliorare la denaturazione della parete fungina stessa, al termine del periodo di incubazione è stato addizionato acetonitrile lasciato a contatto con il campione per ulteriori 15 minuti. Dopo aver centrifugato la miscela per 2 minuti a 14,000 x g il sovranatante è stato depositato sulla piastra dedicata all'analisi MALDI-TOF MS.

L'acquisizione degli spettri dei 64 ceppi di isolamento clinico è stata ottenuta in automatico mediante il programma FlexControl (Bruker Daltonics). Gli spettri ottenuti sono stati identificati utilizzando gli stessi criteri descritti nel paragrafo 2.1.1.2.

Biologia molecolare: estrazione, amplificazione e sequenziamento dell'acido nucleico

Cinquecento µl di sospensione colturale di 5 dei 13 ceppi di riferimento (1 *T. rubrum*, 2 *T. interdigitale*, 1 *T. mentagrophytes*, 1 *M. canis*) e dei 11 ceppi di isolamento clinico utilizzati per implementare il "database" sono stati sottoposti ad estrazione e purificazione del DNA mediante il sistema commerciale pronto all'uso "High Pure PCR Template Preparation Kit" (Roche Diagnostic, Germany) basato sull'utilizzo di filtri di silice previo trattamento con liticasi. Questo saggio, basato sul metodo di estrazione degli acidi nucleici descritto da Boom e collaboratori (Boom et al., 1990), è stato utilizzato poiché ampiamente valutato nel nostro laboratorio. Inoltre, questo saggio consente di ottenere DNA purificato e privo di inibitori dell'enzima "Taq polimerasi" utilizzato nelle reazioni di PCR.

Il DNA estratto dai 16 ceppi è stato sottoposto ad amplificazione mediante un saggio di PCR convenzionale avente come bersaglio la regione del DNA ribosomiale 5.8S/ITS2 utilizzando una coppia di primers fungini universali (ITS3 e ITS4) (Borazjani et al., 1998; neville., 2013b). I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel di agarosio e rilevati mediante visualizzazione tramite i raggi UV dopo colorazione con Etidio Bromuro.

Inoltre, gli stessi ampliconi sono stati sottoposti a sequenziamento presso Roche diagnostics (TIB Molbiol S.r.l., Genova, Italia). Le sequenze ottenute sono state allineate mediante il programma Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versione 6.06 (Koichiro et al., 2013) e ciascuna di loro è stata successivamente confrontata con le corrispettive sequenze geniche 5.8S/ITS2 di dermatofiti depositati in GenBank.

Analisi statica

Per differenziare la specie *T. tonsurans* dalle specie appartenenti al complesso *T. mentagrophytes* per le quali l'identificazione risulta particolarmente complessa a causa delle strette correlazioni inter-specie non completamente note presenti all'interno di questo gruppo, è stata condotta l'analisi statistica mediante programma ClinProTools (version 2.0, Bruker Daltonics). Per poter paragonare le singole repliche è stata eseguita la PCA come descritto in dettaglio nel paragrafo 2.1.1.2.

2.1.2.3. Risultati

Analisi mediante MALDI-TOF

In questo studio il "database" dello spettrometro di massa MALDI-TOF (Bruker Daltonics) disponibile nel nostro laboratorio già comprendente un pannello di 12 ceppi di riferimento appartenenti a 7 specie di dermatofiti (1 *E. floccosum*, 1 *M. canis*, 3 *M. gypseum*, 2 *T. rubrum*, 1 *T. interdigitale*, 1 *T. mentagrophytes*, 3 *T. tonsurans*) è stato implementato con i 24 ceppi di riferimento mostrati in tabella 3.6 (13 ceppi di riferimento UK-NEQAS e 11 ceppi di isolamento clinico).

L'analisi mediante MALDI-TOF MS (Tabella 2.7) ha prodotto per 10 (1 *E. floccosum*, 3 *M. canis*, 1 *M. gypseum*, 2 *T. tonsurans* e 3 *T. rubrum*) dei 24 ceppi di riferimento analizzati profili proteici specie-specifici che quando confrontati con il "database" commerciale sono stati correttamente identificati (punteggio >2.0 per ogni replica) in quanto già presente all'interno del "database" almeno uno spettro MPS di riferimento per quella specie. I profili proteici ottenuti per le specie *M. fulvum*, *M. persicolor*, *M. audouinii*, *T. violaceum*, *T. sudanense* e *T. erinacei* quando confrontati con il "database" commerciale sono risultati essere originali (punteggio <1.3) in quanto non riconducibili a nessuno dei profili già in esso presenti. Per quanto riguarda le specie *T. mentagrophytes* (3) e *T. interdigitale* (5) gli spettri ottenuti quando confrontati con il "database" commerciale sono stati erroneamente identificati come *T. tonsurans* (punteggio >2.0) pur in presenza dei rispettivi spettri MSP all'interno della banca dati.

Ceppi	Identificazione mediante metodi convenzionali	Identificazione mediante analisi della sequenza	Identificazione mediante MALDI-TOF MS			
			Senza implementazione	Score	Dopo implementazione	Score
Ceppi di riferimento implementati						
<i>T. tonsurans</i> 0865	<i>T. tonsurans</i>		<i>T. tonsurans</i>	2.01	<i>T. tonsurans</i>	2.42
<i>T. rubrum</i> 1515	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	2	<i>T. rubrum</i>	2.35
<i>T. rubrum</i> 0544	<i>T. rubrum</i>		<i>T. rubrum</i>	2.03	<i>T. rubrum</i>	2.41
<i>T. interdigitale</i> 1681	<i>T. interdigitale</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.22	<i>T. interdigitale</i>	2.42
<i>T. interdigitale</i> 1208	<i>T. interdigitale</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.14	<i>T. interdigitale</i>	2.34
<i>T. interdigitale</i> 0389	<i>T. interdigitale</i>		<i>T. tonsurans</i>	2.05	<i>T. interdigitale</i>	2.3
<i>T. mentagrophytes</i> 0866	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.09	<i>T. mentagrophytes</i>	2.48
<i>T. erinacei</i> 0388	<i>T. erinacei</i>		NI	<1.5	<i>T. erinacei</i>	2.27
<i>M. canis</i> 0164	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2.25	<i>M. canis</i>	2.31
<i>M. persicolor</i> 0165	<i>M. persicolor</i>		NI	<1.3	<i>M. persicolor</i>	2.29
<i>M. gypseum</i> 7177	<i>M. gypseum</i>		<i>M. gypseum</i>	2.13	<i>M. gypseum</i>	2.27
<i>M. fulvum</i> 9834	<i>M. fulvum</i>		NI	<1.6	<i>M. fulvum</i>	2.18
<i>E. floccosum</i> 1207	<i>E. floccosum</i>		<i>E. floccosum</i>	2.12	<i>E. floccosum</i>	2.35
Ceppi di isolamento clinico implementati						
<i>T. tonsurans</i> PR1	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.12	<i>T. tonsurans</i>	2.34
<i>T. rubrum</i> PR1	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	2.01	<i>T. rubrum</i>	2.12
<i>T. interdigitale</i> PR1	<i>T. interdigitale</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.09	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	2.19
<i>T. interdigitale</i> PR2	<i>T. interdigitale</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.14	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	2.36
<i>T. mentagrophytes</i> PR1	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.14	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	2.19
<i>T. mentagrophytes</i> PR1	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>	2.18	<i>T.mentagrophytes/T. intedigitale</i>	2.25
<i>M. canis</i> PR1	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	1.95	<i>M. canis</i>	2.45
<i>M. canis</i> PR2	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	2.05	<i>M. canis</i>	2.34
<i>T. violaceum</i> PR1	<i>T. violaceum</i>	<i>T. violaceum</i>	NI	<1.5	<i>T. violaceum</i>	2.22
<i>T. soudanense</i> PR1	<i>T. soudanense</i>	<i>T. soudanense</i>	NI	<1.3	<i>T. soudanense</i>	2.15
<i>M. audouinii</i> PR1	<i>M. audouinii</i>	<i>M. audouinii</i>	NI	<1.6	<i>M. audouinii</i>	2.21

Tabella 2.7. Metodi per l'identificazione dei dermatofiti a confronto: ceppi di riferimento.

Gli spettri di riferimento (MSP) ottenuti per ciascuno dei 24 ceppi di riferimento sono stati depositati nella banca dati dello strumento per poter essere successivamente utilizzati nel nostro laboratorio per l'identificazione di ceppi di isolamento da materiali biologici.

Tutti i profili implementati sono risultati riproducibili in un secondo esperimento indipendente. Tale riproducibilità è stata osservata utilizzando diversi lotti di terreno ed inoltre ogni sessione è stata convalidata mediante controlli negativi e positivi esterni che hanno confermato la validità dell'analisi.

Tutte le specie implementate nel "database" hanno mostrato un profilo proteico unico con l'eccezione delle due specie *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* che hanno mostrato profili simili tra loro (Figura 2.16). Questo risultato concorda con quello ottenuto dall'analisi della sequenza della porzione di DNA ribosomiale 5.8S/ITS2 amplificata di questi ceppi: le sequenze ottenute per tutte le specie di dermatofiti fatta eccezione per le specie *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* confermano i risultati ottenuti mediante metodi convenzionali.

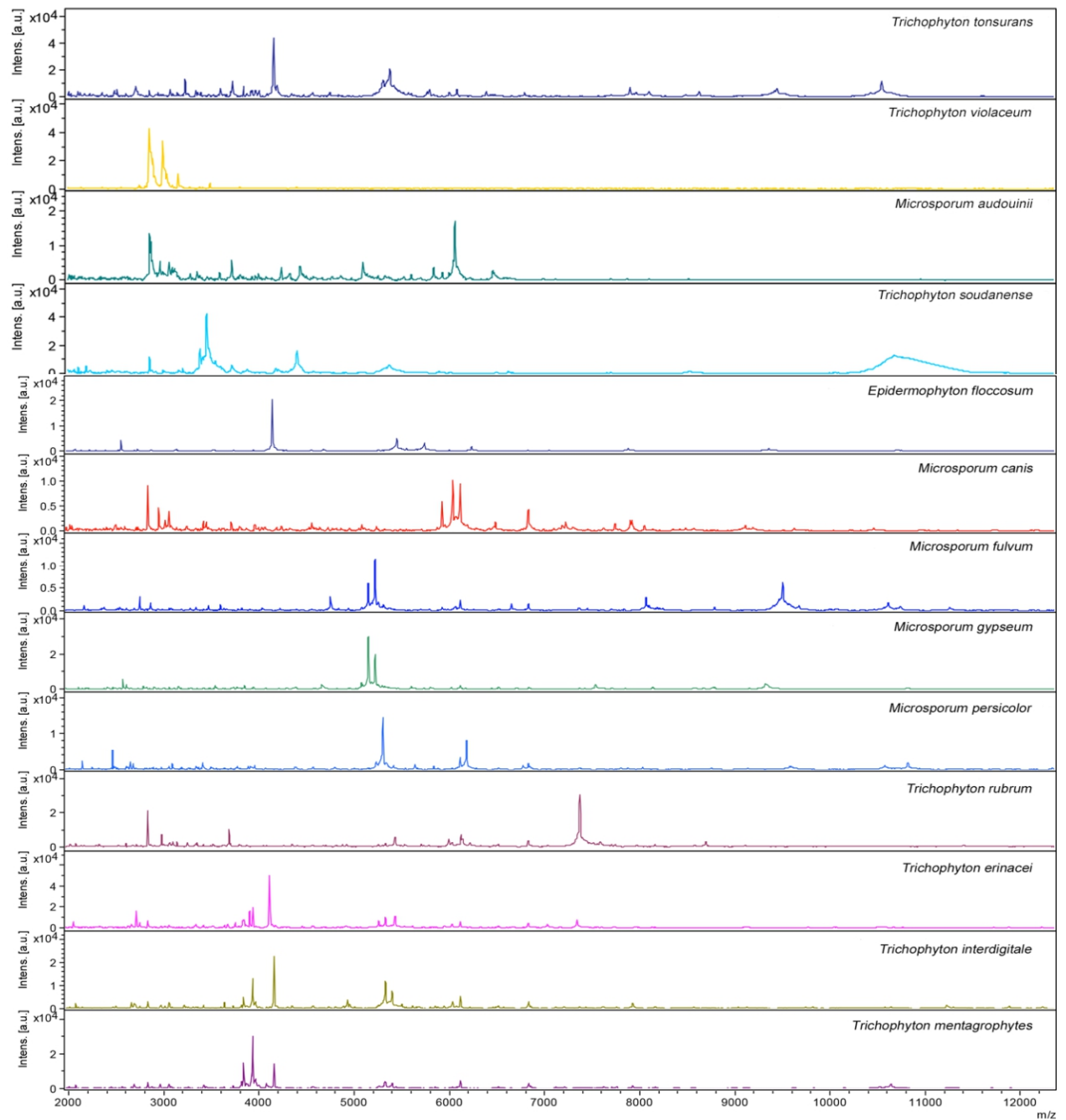


Figura 2.16. Spettri medi ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS per le specie di dermatofiti (1 spettro per specie) implementate nella banca dati dello strumento Bruker Daltonics.

Infine, gli spettri MSP implementati sono stati comparati attraverso la costruzione di un dendrogramma (Figura 2.17).

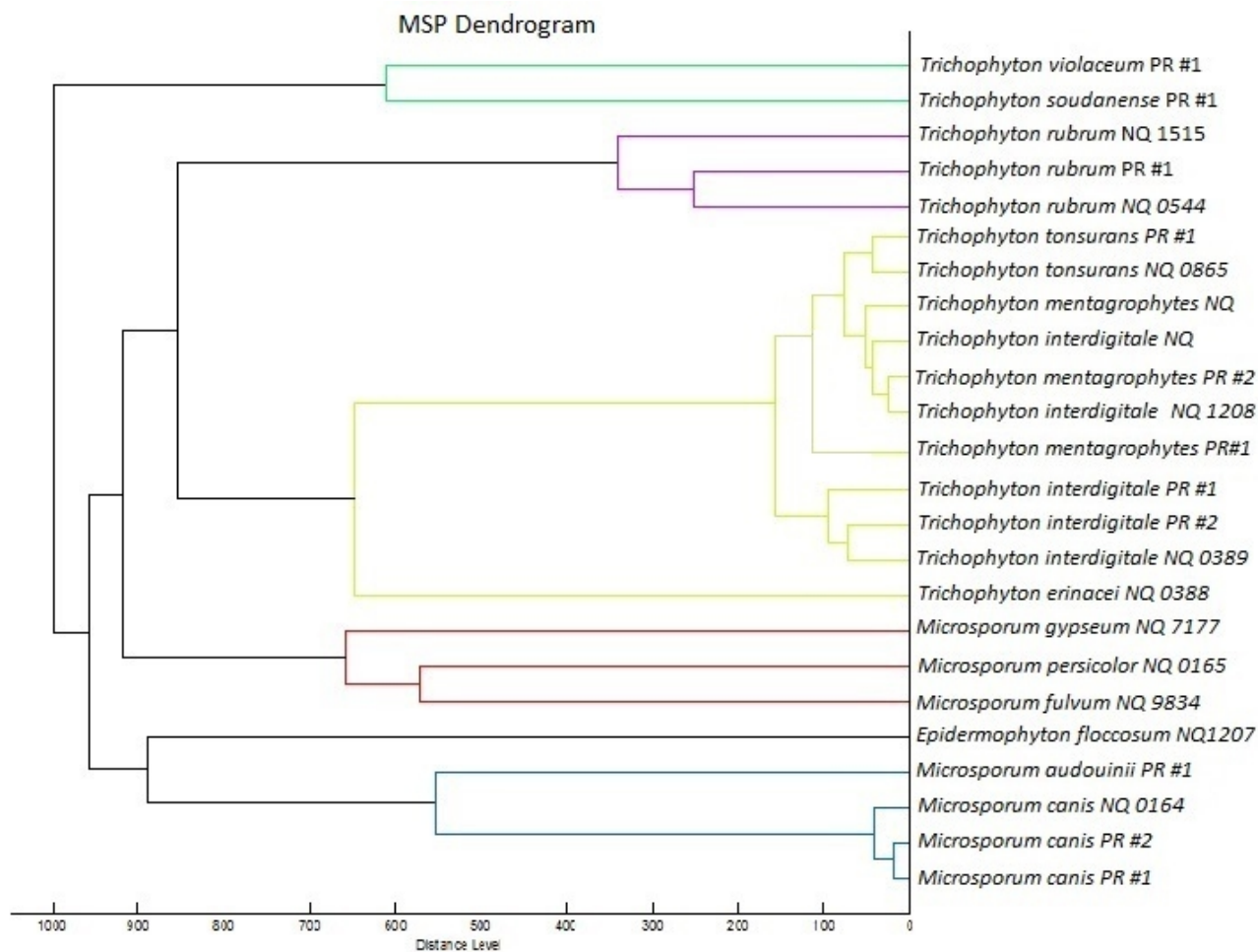


Figura 2.17. Dendrogramma relativo ai profili proteici ottenuti per i 24 ceppi di riferimento utilizzati per l’implementazione della banca dati.

Inoltre, è stato costruito un dendrogramma comprendente sia i 12 profili proteici già inclusi nel “database” commerciale sia i 24 profili proteici implementati in questo studio (Figura 2.18).

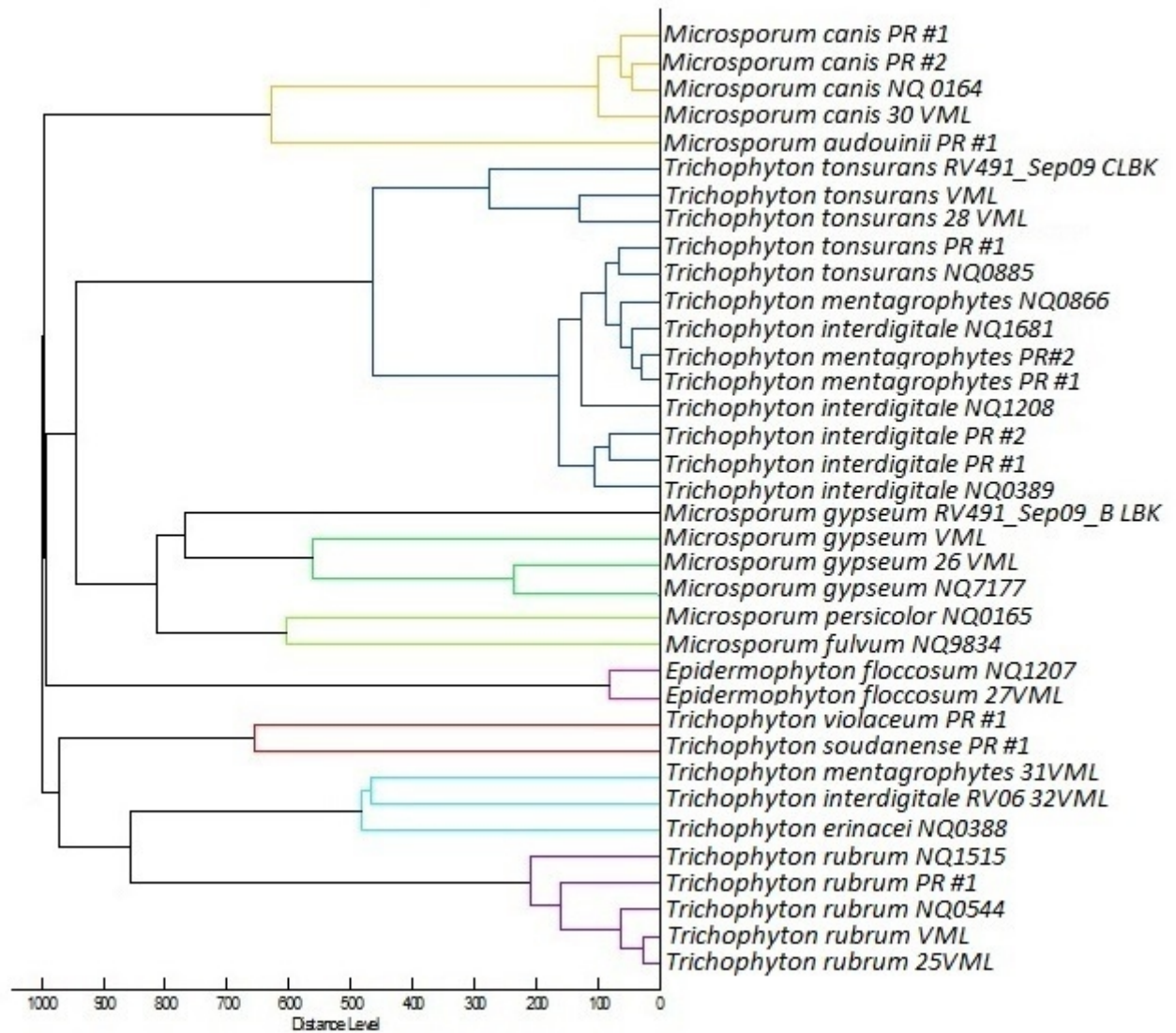


Figura 2.18. Dendrogramma relativo ai 12 profili proteici già inclusi nel “database” e ai 24 ceppi di riferimento utilizzati per la supplementazione del nuovo “database” fatto in casa.

Il dendrogramma mostra una stretta correlazione tra gli spettri MSP ottenuti per i diversi ceppi appartenenti alla stessa specie fatta eccezione per le specie del complesso *T. mentagrophytes*, per le quali i ceppi implementati raggruppano vicini tra loro e vicino alla specie *T. tonsurans* ma in ramo opposto rispetto ai ceppi già presenti per la stessa specie nel “database” commerciale dello strumento.

Il risultato dell’identificazione dei 64 ceppi di dermatofiti di isolamento clinico (3 *E. floccosum*, 7 *M. canis*, 1 *M. audouinii*, 2 *T. violaceum*, 3 *T. tonsurans*, 23 *T. rubrum*, 19 *T. mentagrophytes*, 2 *T. interdigitale*, 2 *T. soudanense*, 1 *M. gypseum* e 1 *M. persicolor*), ottenuto prima e dopo l’implementazione del “database”, è riportato in Tabella 2.8.

Ceppi	Identificazione mediante metodi convenzionali	ID Sequenza	ID MALDI-TOF MS			
			Senza implementazione	score	Dopo implementazione	Score
Ceppi di isolamento clinico identificati (64)						
EFPR 1, 2, 3	<i>E. floccosum</i>	<i>E. floccosum</i>		>2	<i>E. floccosum</i>	>2
MCPR 3, 4, 5, 9	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>		>2	<i>M. canis</i>	>2
MCPR 6, 7		<i>M. canis</i>		1.7-2	<i>M. canis</i>	>2
MCPR 8		NI		<1.7	<i>M. canis</i>	>2
MAPR 2	<i>M. audouinii</i>	<i>M. canis</i>		1.7-2	<i>M. audouinii</i>	1.7-2
TVPR 2, 3	<i>T. violaceum</i>	NI		<1.5	<i>T. violaceum</i>	1.7-2
TTPR 3	<i>T. tonsurans</i>	<i>T. tonsurans</i>		>2	<i>T. tonsurans</i>	>2
TTPR 4		<i>T. tonsurans</i>		1.7-2	<i>T. tonsurans</i>	>2
TTPR 2		<i>T. rubrum</i>		1.7-2	<i>T. tonsurans</i>	1.7-2
TRPR 9, 16, 19, 21, 22, 23	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>		>2	<i>T. rubrum</i>	>2
TRPR 2, 3, 5, 12, 14, 15, 24		<i>T. rubrum</i>		1.7-2	<i>T. rubrum</i>	1.7-2
TRPR 4, 10, 11, 17, 18, 20, 23		<i>T. rubrum</i>		1.7-2	<i>T. rubrum</i>	>2
TRPR 6, 8		<i>T. tonsurans</i>		1.7-2	<i>T. rubrum</i>	1.7-2
TRPR 7		NI		<1.7	<i>T. rubrum</i>	1.7-2
TMPR 3, 4, 5, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. tonsurans</i>		>2	<i>T.mentagrophytes/T. intedigiale</i>	>2
TMPR 6, 19		<i>T. tonsurans</i>		>2	<i>T.mentagrophytes/T. intedigiale</i>	1.7-2
TMPR 7		<i>M. gypseum</i>		2	<i>T.mentagrophytes/T. intedigiale</i>	>2
TMPR 8, 13, 20, 21		<i>T. tonsurans</i>		1.7-2	<i>T.mentagrophytes/T. intedigiale</i>	>2
TMPR 10		NI		<1.5	<i>T.mentagrophytes/T. intedigiale</i>	>2
TIPR 3, 4	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. tonsurans</i>		>2	<i>T.mentagrophytes/T. intedigiale</i>	>2
TSPR 2	<i>T. soudanense</i>	<i>T. rubrum</i>		1.7-2	<i>T. soudanense</i>	1.7-2
TSPR 3		NI		<1.5	<i>T. soudanense</i>	>2
MGPR 1	<i>M. gypseum</i>	<i>M. gypseum</i>		>2	<i>M. gypseum</i>	>2
MPPR 1	<i>M. persicolor</i>	NI		<1.6	<i>M. persicolor</i>	>2

Tabella 2.8. Metodi per l'identificazione dei dermatofiti a confronto: ceppi di isolamento clinico.

In assenza di implementazione con i ceppi di riferimento, lo spettrometro di massa MALDI-TOF è stato in grado di identificare, a confronto con il metodo convenzionale, solo 32 dei 64 ceppi analizzati pari a 50%. Di tali ceppi, sulla base delle indicazioni fornite dalla ditta produttrice il 46,9% (15/32) ha mostrato una corretta identificazione a livello di specie (punteggio >2.0) mentre il 53,1% (17/32) una identificazione solo a livello di genere con punteggio compreso tra 1,7 e 2. Infine nel restante 50% dei casi (32/64) l'analisi mediante MALDI-TOF MS ha fornito un' identificazione assente o sbagliata (Figura 2.19).

Prima dell'implementazione della banca dati

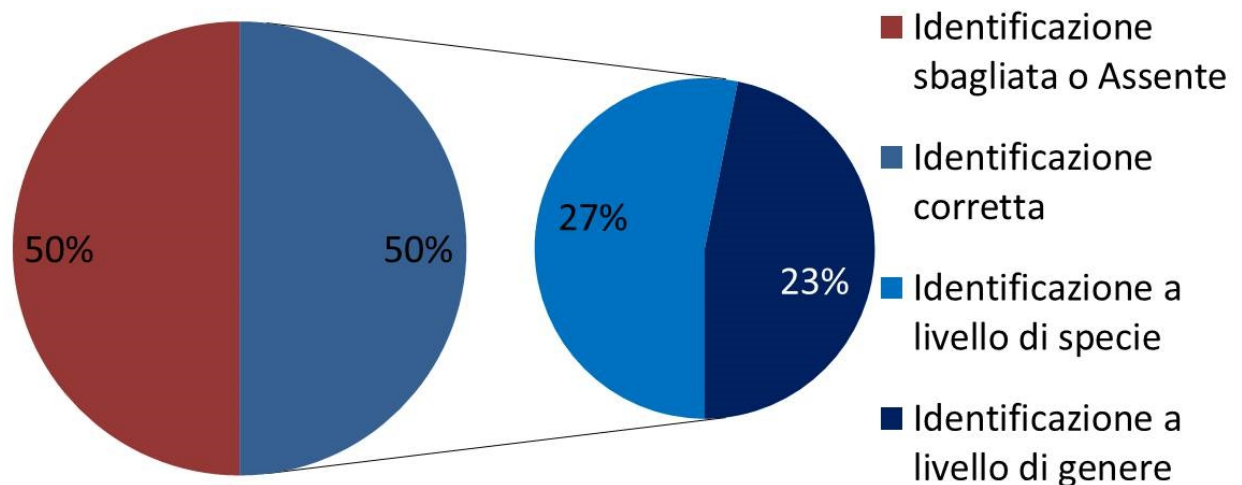


Figura 2.19. Rappresentazione grafica dei risultati relativi all'identificazione dei dermatofiti prima dell'implementazione dalla banca dati dello spettrometro di massa Bruker Daltonics.

Dopo l'implementazione della banca dati, 64/64 ceppi (100%) sono stati identificati correttamente, mostrando nel 73,4% dei casi (47/64) una identificazione a livello di specie (punteggio >2.0) e nel 26,6% dei casi (17/64) una identificazione a livello di genere (punteggio compreso tra 1.7 e 2.0) (Figura 2.20).

Dopo l'implementazione della banca dati

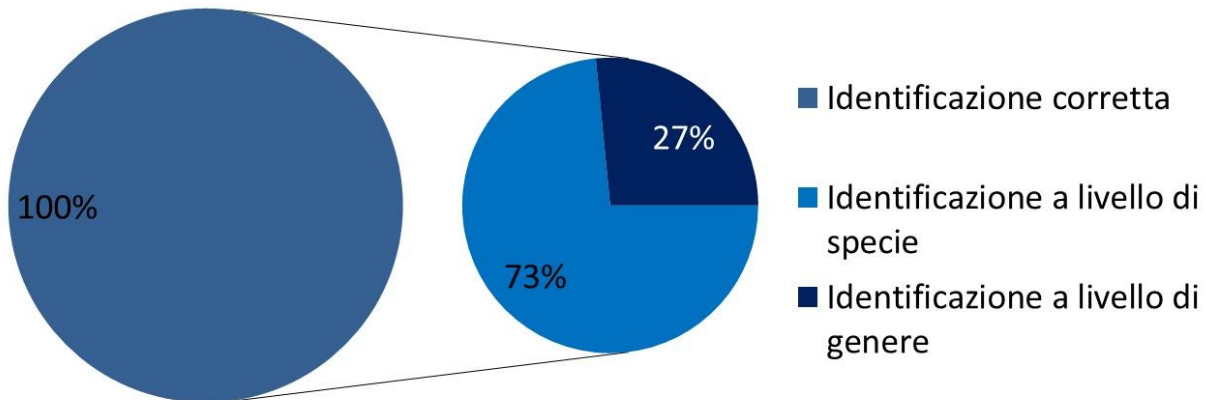


Figura 2.20. Rappresentazione grafica dei risultati relativi all'identificazione dei dermatofiti prima dopo l'implementazione dalla banca dati dello spettrometro di massa Bruker Daltonics.

Analisi statistica

Non è stato possibile discriminare le specie appartenenti al complesso *T. mentagrophytes* ovvero *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*.

Gli spettri ottenuti per le specie *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* sono quindi state analizzate mediante programma statistico dedicato.

Ogni singolo spettro importato nel programma è stato automaticamente ricalibrato rispetto a tutti gli altri e mostrato su un piano tridimensionale.

La PCA riportata (Figura 2.21) mostra come le repliche ottenute per le specie del complesso *T. mentagrophytes* raggruppano vicine tra loro, ma nettamente separate da quelle ottenute per la specie *T. tonsurans*.

I 3 algoritmi statistici applicati, infatti, non hanno riscontrato nessuna differenza statisticamente significativa tra le repliche della specie *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* (Figura 2.21).

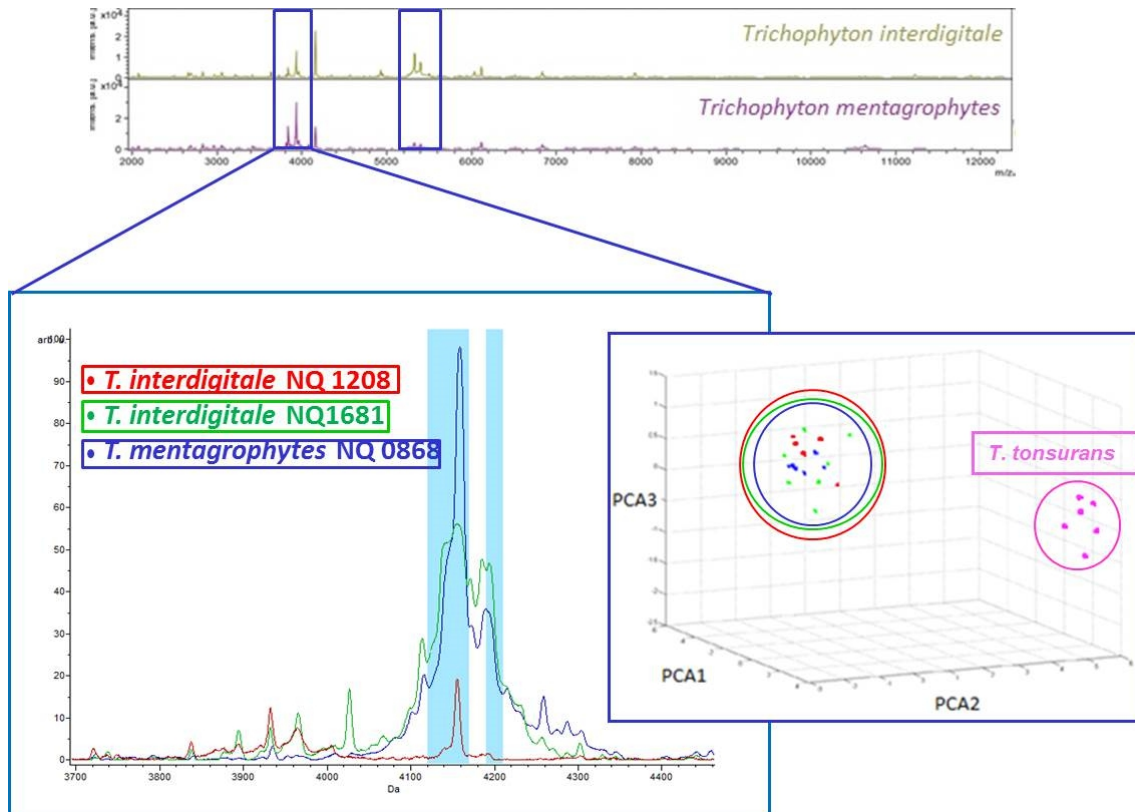


Figura 2.21. Spettri ottenuti per le specie del complesso *T. mentagrophytes* con ingrandimento di un'area di sovrapposizione dei profili. Grafico della clusterizzazione ottenuta sulla base della PCA relativo alle specie appartenenti al complesso *T. mentagrophytes* e alla specie *T. tonsurans*.

2.3 Parassitologia

2.3.1 *Trichomonas vaginalis*

2.3.1.1 Introduzione

Trichomonas vaginalis, riconosciuto causa di vaginite nel 1916 da Høne e descritto già nel 1836 nel secreto vaginale di una donna da Donnè, è un parassita obbligato della specie umana, unico ospite conosciuto. Patogeno a diffusione cosmopolita, *T. vaginalis* è un protozoo anaerobio aerotollerante, privo di mitocondri ma dotato di idrogenosomi, strutture analoghe dove vengono fermentati i carboidrati (Calderaro 2012).

Il protozoo negli individui infetti risiede, nel tratto genitale femminile sulla superficie della mucosa vaginale e, nel tratto uro-genitale maschile, sulla superficie epiteliale dell'uretra (e a volte nella prostata e nelle vescichette seminali), dove si divide per fissione binaria. Il parassita si nutre di carboidrati e amminoacidi che derivano da proteine sottratte all'ospite ed è causa di danno alle cellule della mucosa alterando l'ambiente del tessuto e scatenando una risposta infiammatoria (Calderaro, 2012; Hirt et al., 2015).

T. vaginalis non ha uno stadio cistico e non sopravvive nell'ambiente esterno, infatti è molto fragile, sopravvive solo pochi minuti a temperatura inferiore a 37°C se in ambiente

umido (Figura 2.22). Per questo la trasmissione di *T. vaginalis* è interumana ristretta, principalmente mediata da contagio sessuale, ma sono stati riportati rari casi di contagio interumano con trasmissione mediata da uso promiscuo di indumenti e biancheria contaminata o fomite (asciugamani, biancheria intima, strumenti medico-chirurgici e ostetrico-ginecologici non sterili) (Calderaro, 2012).



Figura 2.22. *Trichomonas vaginalis*. Modificata da Calderaro, 2012.

L'infezione da *T. vaginalis* è la tricomoniasi: una vaginite specifica nella donna e una uretrite (meno frequentemente prostatite) nel maschio. Il protozoo è eliminato dai soggetti infetti con le secrezioni genitali (vaginale femminile e secreto uretrale e/o prostatico maschile) e nel maschio con le urine (Calderaro, 2012, Hirt et al., 2015).

T. vaginalis è un protozoo parassita a diffusione cosmopolita. Si osserva una maggiore prevalenza tra le persone che hanno rapporti sessuali promiscui o che sono affetti da altre malattie veneree. L'infezione è estremamente rara nei soggetti in età non fertile e riportata in casi aneddotici in età pre-pubere (Calderaro, 2012). La "World Health Organization" (WHO) riporta che nel mondo il numero di nuovi casi di tricomoniasi stimato nel 2008 è stato più alto del 11.2% rispetto a quello registrato per il 2005 (276.4 milioni *versus* 248.5 milioni) (WHO, 2012).

Per la diagnosi dell'infezione da *T. vaginalis* sono necessari metodi di ricerca diretta: l'esame microscopico a fresco di secreto vaginale (nella donna) o uretrale (nel maschio) prelevati mediante tampone è il metodo più rapido, ma richiede l'osservazione entro pochi minuti dal prelievo per evitare che il parassita perda vitalità e divenga immobile e quindi

non riconoscibile all'osservazione microscopica. L'esame colturale è il metodo di scelta per la diagnosi: prevede l'inoculo del campione biologico al momento del prelievo in idoneo terreno di coltura. Il terreno di coltura è disponibile anche in commercio ed è molto ricco poiché il protozoo è metabolicamente molto esigente. L'esame colturale consente un esito in 1-3 giorni se l'incubazione è in anaerobiosi; in altre condizioni possono essere necessari fino a 7 giorni. Campioni idonei per la diagnosi sono: nella donna, il tampone vaginale e, nel maschio, il tampone uretrale e le urine, e, nel caso di infezioni croniche o ricorrenti, il secreto prostatico (Calderaro, 2012; www.cdc.gov) (Figura 2.23).

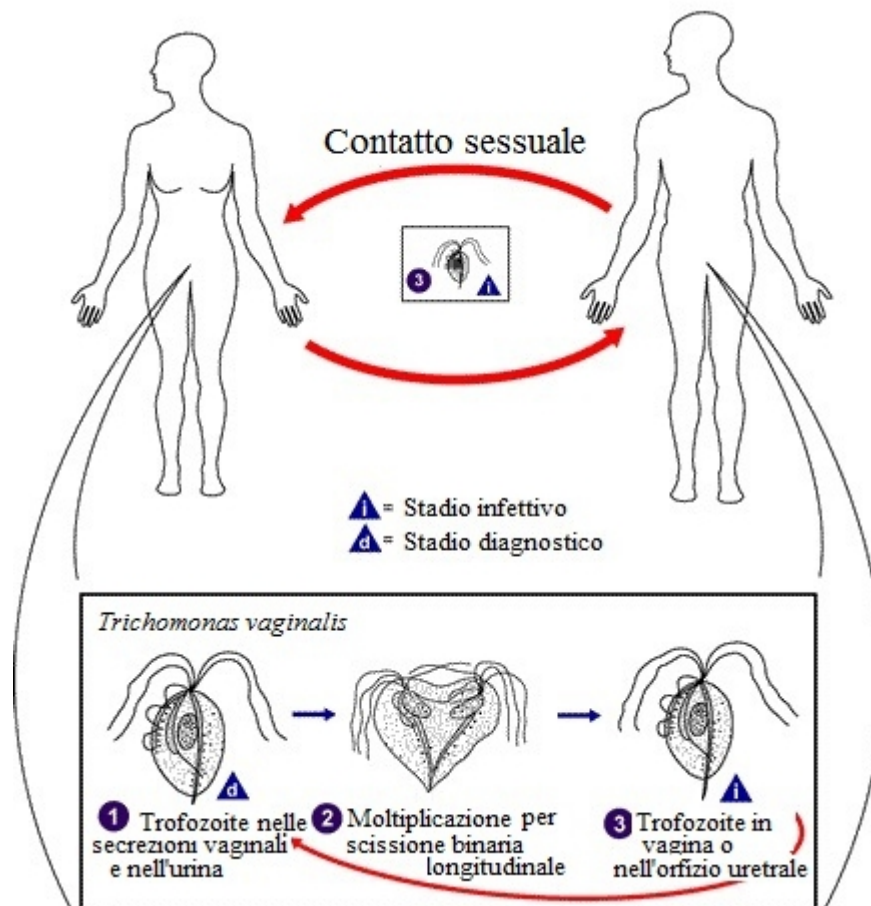


Figura 2.23. Ciclo vitale di *T. vaginalis*. Modificato da www.cdc.gov.

Attualmente sono disponibili sul mercato saggi immunocromatografici per la ricerca di *T. vaginalis* che forniscono un risultato in 15 minuti, tuttavia, la loro applicazione è limitata ai soli tamponi vaginali (Hegazy et al., 2012). Inoltre, sono disponibili saggi di amplificazione genica (Real-Time PCR) che abbinano alla ricerca del DNA di *T. vaginalis* la ricerca contemporanea di batteri e virus causa di infezioni trasmesse per contagio sessuale (Banda et al., 2013).

L'uso diagnostico della spettrometria di massa MALDI-TOF in parassitologia è, ad oggi, limitato a causa, principalmente, della mancanza di una banca dati dedicata. Studi recenti

(Martiny et al., 2013; Cassagne et al., 2014) hanno dimostrato l'efficienza identificativa di questa tecnologia applicata a protozoi isolati in coltura (*Leishmania* spp, *Blastocystis* spp.) dopo la creazione di una libreria di spettri di riferimento "home-made". Scopo di questo studio è stata la valutazione dell'utilità e dell'applicabilità del sistema identificativo MALDI-TOF per l'identificazione di *T. vaginalis* isolato da campioni clinici dopo la creazione "ex novo" di un "database" dedicato.

2.3.1.2 Materiali e Metodi

Ceppi di T. vaginalis e campioni clinici

Per l'analisi mediante MALDI-TOF MS sono stati utilizzati 21 ceppi di *T. vaginalis*: 1 ceppo di riferimento, *T. vaginalis* G3 (Hirt et al., 2007) (fornito dal Prof. Pier Luigi Fiori del Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari) e 20 ceppi di *T. vaginalis* isolati presso il nostro laboratorio da campioni clinici (18 tamponi vaginali, 1 tampone uretrale e 1 urina) mediante esame colturale dal 2005 al 2014.

Il ceppo di riferimento *T. vaginalis* G3 è stato coltivato a 37°C in terreno axenico ("Trypticase-yeast extract maltose", TYM) supplementato con il 10% di siero bovino fetale inattivato al calore a 56°C per 30 minuti (Diamond 1957). I 20 ceppi di isolamento clinico sono stati coltivati a 37°C in terreno "*Trichomonas* medium N.2" (Oxoid, Perth, UK) per un minimo di 3 giorni.

Inoltre, l'applicabilità della tecnologia MALDI-TOF MS è stata anche valutata direttamente su campioni clinici. L'analisi è stata condotta direttamente sul precipitato ottenuto centrifugando un'aliquota di 15 ml di un campione di urina (campione 20) dal quale è stato isolato 1 dei 20 ceppi di isolamento clinico (ceppo N. 20) e su 3 campioni (1 tampone vaginale, 1 tampone uretrale e 1 tampone urinario), negativi per *T. vaginalis*, sperimentalmente addizionati ciascuno con 500 µl di coltura contenete *T. vaginalis* alla concentrazione di 10⁶ trofozoiti/ml (TV15).

Le modalità di scongelamento e successivo ricongelamento dei ceppi di *T. vaginalis* inclusi nello studio sono le medesime riportate nel paragrafo 2.1.1.2. L'unica differenza riguarda la sostituzione del crioconservante (glicerolo) che per i protozoi è il Dimetilsolfossido (DMSO).

Analisi mediante MALDI-TOF MS

I protocolli previsti per la sliofilizzazione della matrice, per la pulizia ed allestimento della piastra "target", per la calibrazione dello strumento e per l'implementazione della banca dati sono gli stessi descritti nella sezione Materiali e Metodi, paragrafo 2.1.1.2.

L'estrazione proteica è stata condotta a partire da un'aliquota di 1,5 ml contenente trofozoiti da coltura del ceppo di riferimento (10^6 trofozoiti/ml), di ciascun ceppo di isolamento clinico (10^6 trofozoiti/ml), del precipitato ottenuto dal campione di urina N.20 e dei 3 campioni sperimentalmente addizionati, rispettivamente, con alcune variazioni rispetto a quanto riportato nel paragrafo 2.1.1.2. In particolare, tali variazioni riguardano i tempi e le velocità di centrifugazione nella fase di lavaggio del sedimento ($1.800 \times g$ per 20 min e $2.500 \times g$ per 5 min vs $15.000 \times g$ per 10 min). In ciascuna seduta è stato utilizzato come controllo negativo il terreno axenico TYM e/o il terreno *Trichomonas* medium N.2 sottoposti alla stessa procedura di estrazione proteica. L'analisi degli estratti proteici è stata effettuata utilizzando lo strumento MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Brema, Germania). Per l'acquisizione degli spettri è stato utilizzato il metodo MBT_Standard, descritto nel paragrafo 2.1.1.2, in modalità manuale per un'acquisizione complessiva di 400 "laser-shot" da 100 "shot" ciascuno. L'acquisizione di ogni "shot" è stata eseguita in punti diversi del pozzetto sul quale era stato depositato il campione, con intensità del laser del 40% per singolo "shot".

Le repliche degli spettri appartenenti al ceppo di riferimento, ai 20 ceppi di isolamento clinico, al campione di urina N.20 ed ai 3 campioni sperimentalmente addizionati, rispettivamente, sono state analizzate mediante FlexAnalysis. Gli spettri ottenuti per il ceppo di riferimento sono stati utilizzati per costruire MSP di riferimento mediante programma dedicato (paragrafo 2.1.1.2).

Gli spettri MSP creati sono stati successivamente implementati nella banca dati dello strumento ed utilizzati per la successiva identificazione di ceppi di isolamento clinico.

Limite di sensibilità del MALDI-TOF MS per l'identificazione di ceppi di isolamento clinico

Per un ceppo di isolamento clinico (TV15) l'analisi mediante MALDI-TOF MS è stata condotta su 6 diluizioni seriali (da 10^6 a 10 trofozoiti/ml) ottenute preparando soluzioni in "Phosphate-buffered saline (PBS)" senza Ca^{2+} e Mg^{2+} .

Un ml di ciascuna diluizione è stata sottoposta ad estrazione proteica, come sopra descritto, e successiva analisi spettrometrica.

2.3.1.3 Risultati

Le repliche degli spettri ottenuti per il ceppo di riferimento, acquisite in due esperimenti indipendenti, quando confrontate con la banca dati commerciale sono risultate originali (punteggio $<1,2$) e quindi non riconducibili a nessuno dei profili già in esso presenti. Tali spettri acquisiti mediante MALDI-TOF MS ed analizzati mediante programma FlexAnalysis

hanno mostrato nell'intervallo di peso molecolare 2-6 kDa diversi picchi che si sovrapponevano a quelli presenti negli spettri ottenuti per i terreni di coltura (TYM e *Trichomonas* medium N.2) non inoculati e sottoposti alla stessa analisi. Gli spettri ottenuti dal ceppo di riferimento non presentavano alcun picco nell'intervallo di peso molecolare compreso tra 10 e 20 kDa.

Le repliche ottenute per il ceppo di riferimento e selezionate mediante programma dedicato sono state utilizzate per la creazione di 2 spettri di riferimento in 2 intervalli di differente peso molecolare: 3-15 kDa (intervallo standard), comunemente utilizzato per l'identificazione di batteri e funghi, e 6-10 kDa, individuato in questo studio come intervallo privo di interferenze tra gli spettri ottenuti per *T. vaginalis* e per i due differenti terreni impiegati (Figura 2.24).

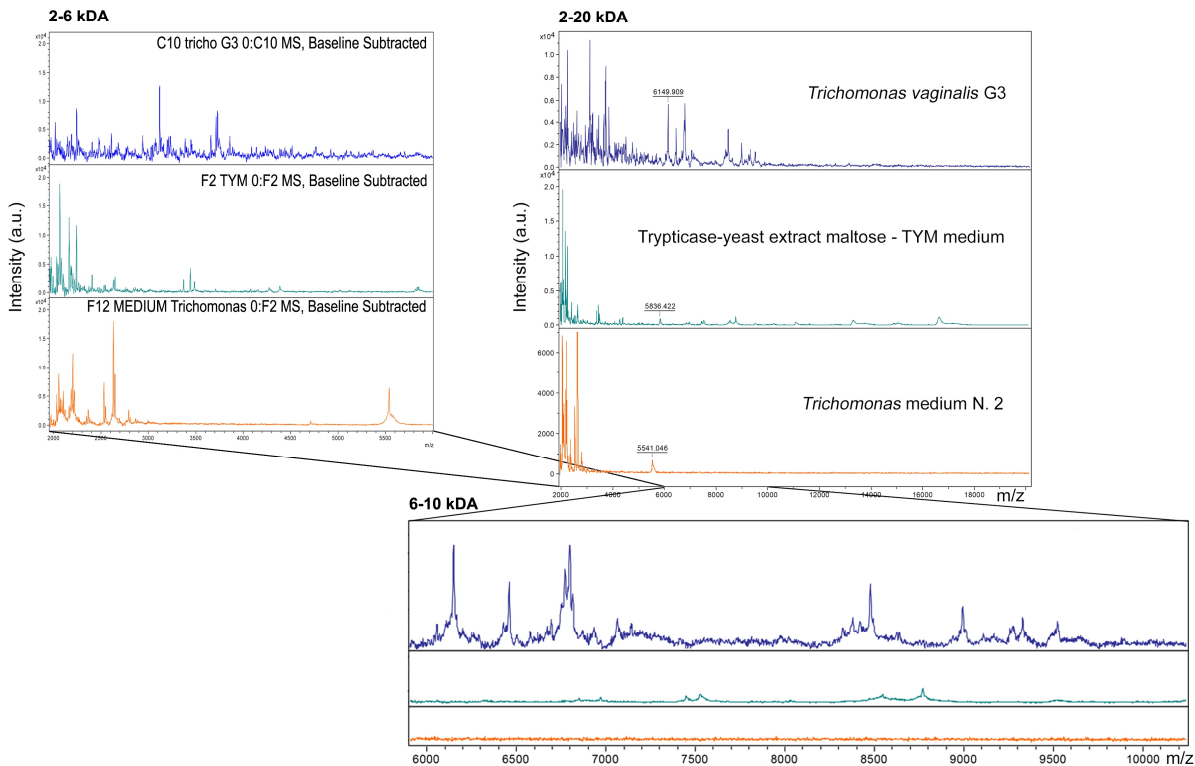


Figure 2.24. Profilo proteico relativo al ceppo di riferimento *T. vaginalis* G3 e ai 2 terreni utilizzati nello studio. Ingrandimento dei 3 spettri nell'intervallo di PM 2-6 e 6-10 kDa.

I 2 MSP di riferimento ottenuti sono stati depositati nella banca dati dello strumento. Un successivo esperimento indipendente condotto dopo l'implementazione della banca dati ha fornito una corretta identificazione di ciascuna replica del ceppo di riferimento *T. vaginalis* G3 (punteggio >2.4).

I risultati dell'analisi mediante MALDI-TOF MS dei 20 ceppi di isolamento clinico di *T. vaginalis* sono riportati in Tabella 2.9. Gli spettri ottenuti per 14 (Tv7, Tv8, Tv9, Tv10, Tv11, Tv12, Tv13, Tv14, Tv15, Tv16, Tv17, Tv18, Tv19 e Tv20) dei 20 ceppi di isolamento clinico non sono stati identificati nell'intervallo 3-15 kDa (punteggio <1.3). Questi 14 ceppi sono stati tutti correttamente identificati utilizzando l'intervallo 6-10 kDa: 5 ceppi (Tv7, Tv8, Tv15, Tv16, e Tv 20) con un punteggio ≥ 2.0 e 9 ceppi (Tv9, Tv10, Tv11, Tv12, Tv13, Tv14, Tv17, Tv18 e Tv19), con un punteggio compreso tra 1.7 e 2.0 (Tabella 2.9). Gli spettri relativi ai rimanenti 6 ceppi analizzati (Tv1, Tv2, Tv3, Tv4, Tv5 e Tv6), identificati con un punteggio compreso tra 1.7 e 2.0 nell'intervallo 3-15 kDa (intervallo 6-10 kDa), hanno migliorato il punteggio (punteggio ≥ 2.0 per ciascuna replica analizzata) quando analizzati nell'intervallo 6-10 kDa (Tabella 2.9).

No.	Materiale	Ceppo	IDENTIFICAZIONE MEDIANTE MALDI-TOF MS			
			Metodo Standard		Nuovo metodo identificativo	
			isolati clinici	Intervallo (3-15 kDa)	punteggio	Intervallo (6-10 kDa)
1	tampone vaginale	Tv1	<i>T. vaginalis</i> G3	1,9	<i>T. vaginalis</i> G3	2,0
2	tampone vaginale	Tv2	<i>T. vaginalis</i> G3	1,9	<i>T. vaginalis</i> G3	2,2
3	tampone vaginale	Tv3	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7	<i>T. vaginalis</i> G3	2,1
4	tampone vaginale	Tv4	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7	<i>T. vaginalis</i> G3	2,1
5	tampone vaginale	Tv5	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7	<i>T. vaginalis</i> G3	2,3
6	tampone vaginale	Tv6	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7	<i>T. vaginalis</i> G3	2,2
7	tampone vaginale	Tv7	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	2,2
8	tampone vaginale	Tv8	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	2,1
9	tampone vaginale	Tv9	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
10	tampone vaginale	Tv10	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
11	tampone vaginale	Tv11	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
12	tampone vaginale	Tv12	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
13	tampone vaginale	Tv13	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
14	tampone vaginale	Tv14	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
15	tampone vaginale	Tv15	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	2,0
16	tampone vaginale	Tv16	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	2,0
17	tampone vaginale	Tv17	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,7
18	tampone vaginale	Tv18	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,9
19	tampone uretrale	Tv19	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	1,8
20	Urina	Tv20	NI	/	<i>T. vaginalis</i> G3	2,0

Tabella 2.9. Analisi mediante MALDI-TOF MS dei 20 ceppi di isolamento clinico di *T. vaginalis* inseriti nello studio prima e dopo la creazione del nuovo metodo identificativo.

L'analisi mediante MALDI-TOF MS dei campioni di urina N.20 e dei 3 campioni sperimentalmente addizionati non ha permesso alcuna identificazione (punteggio <1,7).

In questo studio il limite di sensibilità del MALDI-TOF MS nell'identificazione di ceppi di isolamento clinico di *T. vaginalis* si è rilevato essere di 10^5 trofozoiti/ml.

2.4 Discussione

La spettrometria di massa mediante tecnologia MALDI-TOF, introdotta nell'ultimo decennio nei laboratori di microbiologia clinica come metodo rapido, accurato ed economico per l'identificazione di batteri e funghi, costituisce un'alternativa valida ai metodi convenzionali e di biologia molecolare risultando applicabile in differenti aree della diagnostica clinica e della ricerca (Croxatto et al., 2012). Grazie alla tecnologia MALDI-TOF MS il laboratorio di microbiologia clinica è in grado di comunicare al clinico la specie del microrganismo isolato, con un anticipo di 24 ore rispetto all'impiego dei test biochimici tradizionali (Djelouadji et al., 2012). La segnalazione tempestiva del risultato dell'indagine microbiologica può definire, soprattutto in casi clinicamente difficili, l'eziologia degli stessi e suggerire una terapia antibiotica mirata ed efficace.

Alcune carenze nelle banche dati commerciali e l'assenza di protocolli di estrazione proteica standardizzati, tuttavia, non rendono ancora sempre possibile l'applicazione di questa tecnologia. In questo studio è stata valutata e dimostrata l'utilità del MALDI-TOF MS nell'identificazione di spirochete (*Borrelia* spp., *Leptospira* spp.), miceti filamentosi (dermatofiti) e protozoi (*T. vaginalis*) dopo la messa a punto di un protocollo di estrazione proteica e la creazione di una banca dati "home-made" utilizzando pannelli costituiti da ceppi di riferimento.

I risultati ottenuti analizzando i profili proteici di ceppi di *Borrelia* spp. di isolamento clinico dopo integrazione del "database" commerciale con spettri di riferimento indicano che la tecnologia MALDI-TOF MS potrebbe essere utilizzata per una rapida, economica ed affidabile identificazione di ceppi appartenenti a questo genere. L'integrazione della banca dati, infatti, ha permesso di ottenere, per i ceppi saggiati coltivati nel terreno BSK-II, un'identificazione a livello di specie. Come atteso, il ceppo per il quale l'MSP di riferimento non è presente nel "database" (in questo caso *B. lusitaniae*) è stato identificato solo a livello di genere, corroborando, grazie all'assenza di mis-identificazione, la robustezza della "nuova" banca dati creata. Analogamente, per il genere *Leptospira* è stata ottenuta una corretta identificazione a livello di specie dei 20 ceppi di riferimento ri-analizzati in un

esperimento indipendente condotto in doppio cieco dopo la creazione *ex novo* della banca dati.

Un'analisi più approfondita dei profili proteici ottenuti dall'analisi di ceppi della stessa specie (ad esempio *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*, per ognuna delle quali è stato analizzato più di un ceppo), ha mostrato piccole differenze probabilmente dovute ai diversi pattern proteici dei distinti sierotipi, come confermato dall'analisi statistica, che ha evidenziato picchi sierotipo-specifici. È stato, infatti, possibile, mediante la creazione di un modello statistico dedicato ottenere un "pattern" di picchi discriminanti in grado di differenziare a livello di sierotipo sia i ceppi di *L. interrogans* sia i ceppi di *L. borgpetersenii* saggiati, rispettivamente. Tuttavia, non possiamo concludere che i picchi discriminanti da noi riportati siano universalmente in grado di identificare il sierotipo dei ceppi di *L. interrogans* e *L. borgpetersenii*; i picchi trovati, infatti, sono il risultato di un'analisi condotta su uno specifico pannello di sierotipi. Tenendo conto che i requisiti richiesti per ottenere una sierotipizzazione sono comunque più complessi rispetto a quelli necessari per l'identificazione routinaria dei microrganismi (il numero di picchi discriminanti è molto minore: per alcuni casi, infatti, la discriminazione si basa su un solo picco), uno dei maggiori limiti del sistema MALDI-TOF nel discriminare diversi sierotipi è rappresentato dalla necessità di disporre di un algoritmo statistico con cui analizzare i profili proteici. È stato quindi dimostrato che attuando piccoli cambiamenti nei parametri standardizzati come l'utilizzo di un modello statistico e di un programma dedicato applicato nella routine diagnostica è possibile utilizzare la spettrometria di massa MALDI-TOF per una rapida ed economica identificazione a livello di sierotipo. Questo può significativamente migliorare gli approcci correntemente utilizzati per monitorare l'insorgenza di focolai epidemici e per la sorveglianza degli agenti patogeni. Negli ultimi anni, il progresso della genetica e la disponibilità di sequenze complete di genomi di leptospire patogene ha reso possibile l'approccio di determinare i meccanismi di virulenza delle leptospire (Ko et al., 2009); la spettrometria di MALDI-TOF potrebbe in futuro provare la sua utilità nell'evidenziare l'esistenza di differenti biotipi mostranti diversi profili proteici, possibilmente relazionati ai differenti fattori di virulenza, per essere successivamente studiati da approcci più sofisticati per chiarire la biologia delle leptospire. Dal punto di vista biologico, inoltre, è stata compiuta un'interessante osservazione: il dendrogramma ottenuto sulla base dei profili proteici delle specie analizzate riflette l'albero filogenetico basato sul sequenziamento del gene 16S-rDNA, come riportato in letteratura (Rettinger et al., 2012) e mostra che le diverse specie incluse nei generi *Leptospira* e *Borrelia* ma anche nel genere *Brachyspira*

sono raggruppate secondo la loro patogenicità (ceppi patogeni e saprofiti chiaramente separati in diversi "cluster") e confermano la possibilità di confrontare i risultati ottenuti mediante spettrometria di massa con quelli ottenuti mediante metodi di tipizzazione genica.

Analogamente a quanto dimostrato per *Borrelia* e *Leptospira*, l'implementazione della banca dati dello spettrometro di massa con spettri di riferimento di miceti filamentosi (dermatofiti) si è rivelata di particolare importanza non solo per l'identificazione di tutte le specie circolanti nella nostra area ma anche per l'identificazione di specie la cui frequenza nel nostro Paese è in aumento a causa dei flussi migratori dalla zone endemiche (*M. audouinii*, *T. violaceum* e *T. sudanense*). Inoltre, l'aggiornamento del "database" ha consentito di superare la mis-identificazione dei ceppi appartenenti al complesso *T. mentagrophytes* (*T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*) con *T. tonsurans*, riscontrata prima dell'implementazione della banca dati commerciale.

Il dendrogramma ottenuto dai 24 spettri implementati appartenenti a 13 specie di dermatofiti (*E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *M. fulvum*, *M. persicolor*, *M. audouinii*, *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *T. erinacei*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum* e *T. sudanense*) ha rivelato raggruppamenti che riflettono quelli costruiti su base filogenetica (De Hoogh et al., 2000). Sulla base dei risultati ottenuti mediante sequenziamento della porzione della regione ITS del genoma fungino non è stato possibile distinguere *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes*, conseguentemente anche gli spettri di queste due specie sono correlati tra loro e non hanno dato origine a raggruppamenti separati. Da sottolineare che il dendrogramma costruito con i 12 profili proteici già inclusi nel "database" commerciale e con i 24 inseriti nel nuovo "database" non riproduce l'albero filogenetico per alcune specie del genere *Tricophyton*. Come atteso, gli spettri MSP già presenti nel "database" e quelli implementati delle specie *E. floccosum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, e *T. tonsurans* sono correlati, al contrario gli spettri MSP già presenti nel "database" e quelli aggiunti delle specie *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* raggruppano separatamente. Questo spiega le mis-identificazioni di *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* con *T. tonsurans* ottenute prima dell'implementazione del "database". Questi risultati, inoltre, non sono stati influenzati dalla tipologia di terreno (liquido o solido) su cui sono stati coltivati i ceppi poichè non sono state osservate differenze nei rispettivi spettri ottenuti. La riproducibilità osservata è dovuta soprattutto all'efficienza del protocollo di estrazione delle proteine fungine sviluppato. Tuttavia, tenendo conto che la riproducibilità degli spettri può essere influenzata dall'età e dallo stadio del micelio (Alanio et al., 2012,

Croxatto et al., 2012), la banca dati per i dermatofiti potrebbe essere in futuro completata con spettri di riferimento di differenti fenotipi evolutivi per garantire una più alta efficienza identificativa, come suggerito da numerosi Autori i quali raccomandano l'espansione del "database" dello spettrometro di massa MALDI-TOF con specie fungine di importanza clinica al fine di potenziare l'utilità di questa metodologia in microbiologia clinica (De Carolis et al., 2012; Croxatto et al., 2012).

L'efficacia del sistema identificativo MALDI-TOF è stata anche dimostrata per microrganismi diversi da batteri e funghi per i quali la metodica originale è stata sviluppata. Sebbene tale sistema identificativo sia stato applicato con successo a *Trichomonas vaginalis* è stato necessario apportare modifiche nei parametri standard previsti per l'identificazione di batteri e funghi.

Il nuovo metodo sviluppato per la creazione degli spettri di riferimento (MSP-Spectra) ha, infatti, permesso di superare le interferenze create dai picchi rilevati nei profili dei due terreni utilizzati per la coltura di questi protozoi e, di conseguenza, di identificare 20 ceppi di isolamento clinico analizzati. L'importanza dello sviluppo del nuovo metodo risiede nel fatto che è possibile identificare sulla base del profilo proteico (e non sulla base di singoli marcatori) microorganismi cresciuti su terreni complessi che potrebbero presentare picchi nell'intervallo di peso molecolare utilizzato a scopo identificativo: metaboliti, pigmenti e nutrienti presenti nel terreno possono interferire con il processo di cristallizzazione e portare ad un basso punteggio identificativo (Martiny et al., 2014). Il protocollo esecutivo comunemente utilizzato in diagnostica nell'intervallo compreso tra 3 e 15 kDa è stato sviluppato per batteri e funghi i quali generalmente richiedono terreni di crescita solidi che non creano interferenze con lo spettro dei microrganismi analizzati. *Trichomonas vaginalis*, al contrario, è coltivato in terreno liquido; questo comporta la presenza nello spettro di picchi riconducibili a molecole che compongono il terreno stesso. Questi picchi interferiscono con la corretta identificazione del protozoo. La "sottrazione" di tali picchi, ottenuta escludendo dall'identificazione l'intervallo di peso molecolare compreso tra 3-6 kDa ha permesso la corretta identificazione di ceppi di isolamento clinico sulla base del profilo proteico. Tuttavia, l'elevata concentrazione di parassita richiesta (10^5 trofozoiti/ml) per una corretta identificazione mediante MALDI-TOF MS difficilmente ottenibile *in vivo* ha impedito l'identificazione di ceppi di *T. vaginalis* direttamente in campioni clinici analizzati. L'efficacia identificativa del MALDI-TOF MS si sta attualmente espandendo dal momento che sono disponibili sia nuove banche dati commerciali sia aggiornamenti delle stesse da parte di diversi utenti (Martiny et al., 2014). La spettrometria di massa con tecnologia

MALDI-TOF si è rivelata un sistema identificativo competitivo sia rispetto ai metodi convenzionali sia rispetto a quelli molecolari per l'identificazione dei microrganismi. Comparato con i metodi identificativi convenzionali il MALDI-TOF MS conferisce in molti casi un guadagno in termini di tempo di lavoro tecnico (procedura pre-analitica per la preparazione dei campioni) e di tempo di ottenimento dei risultati (procedura analitica automatizzata). Questo risparmio di tempo si accentua quando sono analizzati in contemporanea un maggior numero di isolati (Martiny et al., 2014).

Rispetto ai metodi molecolari utilizzati per l'identificazione di specie (come la reazione polimerasica a catena di tipo "Multiplex", l'ibridazione DNA-DNA, l'analisi del polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione e l'analisi di sequenza multilocus) (Stanek et al., 2011), la spettrometria di massa MALDI-TOF MS presenta vantaggi di rapidità, di semplicità di esecuzione e di riduzione dei rischi di contaminazione, costi (costo totale stimato di 0,50 euro per ceppo analizzato) e tempi di esecuzione (un'ora e trenta minuti). Lo svantaggio principale di questa tecnologia rispetto ai metodi molecolari risiede nella necessità di avere a disposizione una buona concentrazione di microrganismo direttamente nel campione di provenienza e/o in coltura, concentrazione che varia in base al patogeno analizzato. Tuttavia, le strategie identificative basate sull'analisi del DNA soffrono di molteplici limitazioni: 1) problemi tecnici (componenti inibitorie, contaminanti, aree separate per preparazione, amplificazione e analisi del campione), 2) costi di reazione (63,50 €) e di lavoro (almeno 6 ore), 3) limitato numero di specie identificate da un singolo saggio e 4) lunghi tempi necessari per arrivare al risultato finale. In conclusione, nonostante l'alta risoluzione e sensibilità i metodi molecolari sono dispendiosi in termini di costi e di tempo e appaiono in molti casi meno convenienti rispetto al MALDI-TOF MS per l'identificazione di microrganismi nella routine di laboratorio (Croxatto et al., 2012).

La tecnologia MALDI-TOF MS potrebbe quindi essere uno strumento efficace sia per la diagnosi di laboratorio delle malattie da infezione, per le quali non esistono saggi diagnostici convenzionali applicabili capillarmente in tutti i laboratori, sia per la ricerca nel campo della biologia degli agenti eziologici responsabili di tali malattie (Calderaro et al., 2014a). Tutte queste considerazioni pongono questa metodologia in posizione centrale in ambito microbiologico (Calderaro et al., 2013a, 2014a, 2014b, 2014c).

Capitolo 3. Identificazione mediante MALDI-TOF MS attraverso la rilevazione di marcatori specifici.

La riproducibilità dello spettro ottenuto dall'analisi di microrganismi interi mediante MALDI-TOF MS può risultare in alcuni casi problematica poiché, in condizioni differenti, ampie variazioni possono essere riscontrate nell'ambito del profilo proteico ottenuto per microrganismi della stessa specie (Wang et al., 1998, Croxatto et., 2012). Numerosi parametri sperimentali infatti possono influenzare lo spettro ottenuto e rivestono un ruolo fondamentale nella riproducibilità del profilo proteico. I principali sono lo strumento, la matrice ed il tipo di cristallizzazione impiegati, l'età e la concentrazione del microrganismo, il terreno di coltura e le condizioni di crescita nelle quali esso viene mantenuto (Valentine et al., 2005, Croxatto et., 2012). Per ovviare a tale problema diversi studi hanno dimostrato che all'interno di uno spettro un pannello di picchi riferibili a microrganismi geneticamente identici sono conservati indipendentemente dalle condizioni sperimentali. Queste considerazioni suggeriscono che l'identificazione e la caratterizzazione dei microrganismi mediante MALDI-TOF MS può avvenire anche, come descritto nel Capitolo 1, utilizzando l'approccio che prevede il "Matching" di biomarcatori con banche dati proteomiche disponibili in letteratura.

Secondo scopo di questo studio è stato, pertanto, verificare e dimostrare l'efficacia della metodica MALDI-TOF MS nel differenziare sulla base di specifici marcatori parassiti intestinali di interesse medico per i quali, a causa della complessità del materiale biologico di partenza analizzato e del terreno di coltura nei quali questi protozoi sono isolati, non è disponibile una banca dati commerciale di riferimento e la sua creazione risulterebbe particolarmente difficile e complessa.

3.1 Parassitologia

3.1.1 *Entamoeba histolytica* ed *Entamoeba dispar*

3.1.1.1 *Introduzione*

Le amebe sono protozoi caratterizzati dal classico movimento "ameboide" che avviene per emissione di prolungamenti di citoplasma rivestiti da membrana cellulare, detti "pseudopodi". Quelle di interesse medico comprendono amebe a vita libera che possono accidentalmente parassitare l'uomo (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*) e amebe ospite associate parassiti dell'apparato gastroenterico. Queste ultime appartengono ai generi *Entamoeba*, *Endolimax* e *Iodamoeba*. Al genere *Entameoba* appartengono specie patogene e non patogene per l'uomo, mentre agli altri due generi appartengono solo

specie non patogene che occasionalmente possono colonizzare l'intestino umano e comportarsi da commensali nel breve periodo della colonizzazione. Il genere *Entamoeba* comprende: *E. histolytica*, patogena e agente eziologico di amebiasi intestinale (dissenteria amebica o colite amebica) ed extraintestinale (amebiasi viscerale) (Figura 3.1); *E. dispar*, morfologicamente identica a *E. histolytica*, ma non patogena; *E. moshkovskii*, le cui cisti sono morfologicamente indistinguibili da quelle di *E. histolytica* e *E. dispar*; *E. gingivalis*, che può ritrovarsi in soggetti sani nella mucosa gengivale, *E. coli*, *E. hartmanni*, *E. chattoni* ed *E. polecki*, tutte non patogene, che a volte possono colonizzare transitoriamente il colon umano (Ali et al., 2008, Calderaro 2012; Heredia et al., 2012).

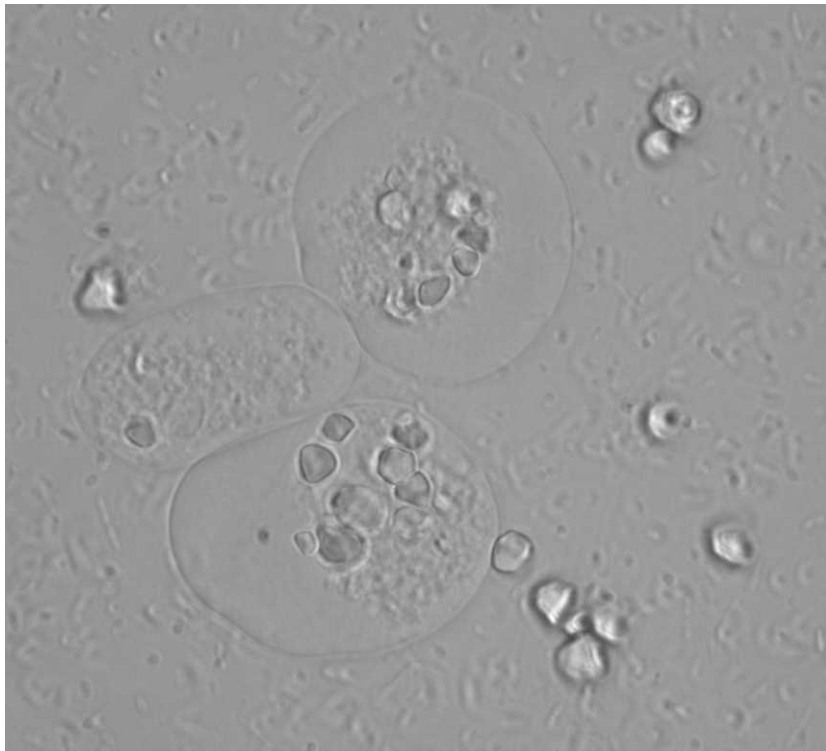


Figura 3.1. Struttura di *Entamoeba histolytica*. Fotografia: Sezione di Microbiologia, Università degli Studi di Parma.

La via di trasmissione all'uomo di queste amebe è generalmente l'ingestione delle cisti, stadio infettante e forma di resistenza di questi protozoi nell'ambiente esterno. Le cisti di *E. histolytica* vengono assunte con l'ingestione di acqua o alimenti contaminati da feci di individui infettati, oppure contaminati da terreno sede di fecalizzazione umana, oppure manipolati dalle mani contaminate da feci di individui infetti. La cisti ingerita passa indenne la barriera di acidità gastrica e raggiunge l'intestino tenue dove avviene l'excistamento e la fuoriuscita di 4 trofozoiti. Questi migrano fino a raggiungere il colon dove si riproducono per scissione binaria, acquisiscono nutrimento a spese dell'ospite ed esercitano l'azione "istolitica". L'apparato "istolitico" è composto da enzimi capaci di danneggiare la mucosa

e perfino i globuli rossi che fuoriescono dalle ulcerazioni della mucosa e sono fagocitati dalle amebe e indotti alla lisi per l'azione di peptidi, detti "amebapores", che provocano la formazione di canali ionici nella membrana eritrocitaria (Ali et al., 2008; Calderaro, 2012). Nel progredire del contenuto intestinale le amebe incontrano verso il colon discendente un ambiente progressivamente povero di acqua e questa modificazione ambientale, unitamente ad altri fattori derivanti dal microambiente mutato, è lo stimolo principale per l'incistamento e la fuoriuscita delle cisti dall'ospite con le feci (Figura 3.2). Il ciclo vitale di *E. histolytica* è identico a quello di *E. dispar* con l'importante differenza che *E. dispar* non è in grado di causare lesioni intestinali poiché non ha attività "istolitica" (Diamond e Clark, 1993, Calderaro et al., 2006, Calderaro et al., 2012).

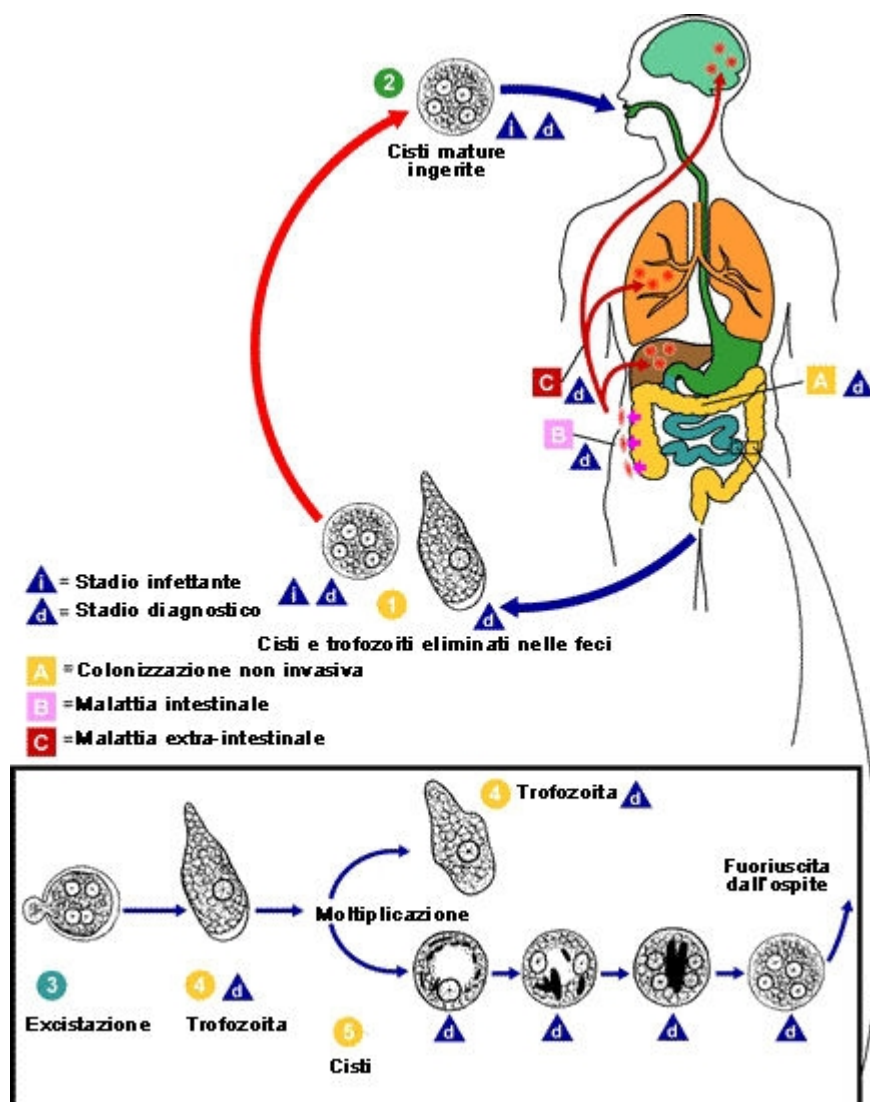


Figura 3.2. Ciclo vitale di *Entamoeba histolytica* (Calderaro, 2012).

E. histolytica ha distribuzione ubiquitaria, con maggiore prevalenza nelle zone con clima temperato e tropicale e nei Paesi in via di sviluppo, soprattutto in assenza di acqua potabile

capillarmente distribuita alle popolazioni (WHO, 1997). Nelle nazioni industrializzate, dove l'epidemiologia è limitata, tra i gruppi di persone a rischio sono da includere: viaggiatori e persone immigrate di recente (fino ad un anno dall'arrivo dal paese di origine), persone assistite in centri di accoglienza statali e privati, maschi omosessuali. In Italia, studi recenti (Calderaro 2012) hanno dimostrato una prevalenza di infezione pari all'1,6% per *E. histolytica* (in questo valore sono compresi casi di amebiasi intestinale nella metà dei casi e nell'altra metà casi di amebiasi epatica) e del 2,7% per la specie non patogena *E. dispar*: questo è di particolare interesse se si considera che il nostro Paese non è endemico per amebiasi ed è dotato di acqua potabile e rete fognaria, ma nonostante gli elevati livelli igienico-sanitari la diffusione di queste amebe a circolazione esclusivamente interumana documenta la presenza di un circuito fecale-orale.

La diagnosi di laboratorio di amebiasi si basa su metodi di ricerca diretta: esame microscopico (a fresco, previo arricchimento e dopo colorazione tricromica), esame colturale e ricerca di componenti del protozoo nel campione (antigeni e DNA specifici). E' possibile diagnosticare l'infezione (non l'amebiasi) da *E. histolytica* anche mediante metodi di ricerca indiretti che consentono la dimostrazione di anticorpi specifici nel siero, la presenza dei quali rimane anche per tutta la vita del soggetto che ha contratto l'infezione (Tanyuksel e Petri, 2003; Calderaro, 2012).

La differenziazione tra *E. histolytica* ed *E. dispar* a scopo diagnostico è fondamentale per evitare di confondere *E. histolytica*, causa di amebiasi con *E. dispar*, non patogena. L'esame microscopico è dotato di scarsa sensibilità e specificità, infatti non consente la differenziazione di cisti e trofozoiti di *E. histolytica* da quelli di *E. dispar* oppure da quelli di *E. moshkovskii*, molto simile ad *E. histolytica*, ma non patogena (Blessman et al., 2002, Calderaro 2012). Per questo motivo vengono utilizzati saggi molecolari. In particolare, nel nostro laboratorio è in uso un saggio di Real-Time PCR basato sulla chimica "Fluorescence Resonance Energy Transfer" (FRET) descritto in letteratura (Calderaro et al., 2006) per la ricerca e differenziazione contemporanea nello stesso campione di feci delle due specie di amebe, da affiancare all'esame microscopico e colturale. Tale saggio, avente come bersaglio il DNA-r18S, che codifica per l'RNA della subunità ribosomiale minore è molto sensibile (in grado di rivelare DNA da un solo trofozoita amebico) ed altamente specifico, ma molto indaginoso e costoso (Calderaro et al., 2006; Calderaro et al., 2015). Inoltre è descritto in letteratura un saggio di Real-Time PCR per l'identificazione della specie *E. moshkovskii* (Lau et al., 2013).

L'applicazione della spettrometria di massa per l'analisi di parassiti intestinali è attualmente molto limitata (Martiny et al., 2013). Uno studio condotto da Makioka e collaboratori (Makioka et al., 2007) descrive l'utilizzo della spettrometria di massa con tecnologia (Surface-enhanced laser desorption ionization-Time of Flight-SELDI-TOF MS- Protein Chip assay) per analizzare differenti isolati di *E. histolytica* ed *E. dispar*, tuttavia non mostra la capacità di distinguere le due specie sulla base di specifici marcatori.

Questo è il primo studio a valutare l'applicazione della tecnologia MALDI-TOF per la ricerca di marcatori proteici in grado di differenziare protozoi del genere *Entamoeba* (*E. histolytica* ed *E. dispar*) tenendo conto che è necessario un numero limitato di picchi (minimo 5) per ottenere una discriminazione tra specie diverse appartenenti allo stesso genere (Dieckmann et al., 2008; Croxatto et al., 2012). Tale obiettivo è stato perseguito sviluppando un sistema combinato di analisi spettrometrica e statistica al fine di ottenere un metodo potenzialmente in grado di discriminare *E. histolytica* ed *E. dispar*.

3.1.1.2. Materiali e Metodi

Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita

In questo studio sono stati utilizzati 3 ceppi di riferimento *E. histolytica* HM-1:IMSS, *E. dispar* SAW760 e *E. moshkovskii* Laredo (gentilmente forniti dal Dr. Graham Clark del "Department of Infectious and Tropical Diseases, London School of Hygiene and Tropical Medicine") al fine di trovare picchi discriminanti in grado di differenziare *E. histolytica* da *E. dispar*. Per verificare l'affidabilità di tali picchi sono stati inoltre analizzati 13 ceppi di isolamento clinico di cui 6 ceppi appartenenti alla specie *E. histolytica* (8026, 369, 373, 1238, 1656, 3291) e 7 ceppi di *E. dispar* (1557, 217, 240, 417, 368, 1110, 2550).

I ceppi di riferimento sono stati coltivati in terreno axenico LYI-S-2 a 37°C (*E. histolytica* HM-1:IMSS e *E. dispar* SAW760) e a temperatura ambiente (*E. moshkovskii* Laredo) (Clark CG e Diamond LS, 2002).

I ceppi di isolamento clinico, identificati nel nostro laboratorio mediante un saggio di Real-time PCR avente come bersaglio un frammento del gene 18S-rDNA di *E. histolytica* e *E. dispar* (Calderaro et al., 2006), sono stati isolati da campioni di feci in terreno bifasico di Robinson (Robinson, 1986).

Preparazione dei campioni ed analisi mediante MALDI-TOF MS

Un'aliquota di 10⁶/ml amebe in coltura per ciascun ceppo di riferimento e per ciascun ceppo di isolamento clinico è stata sottoposta ad estrazione proteica in etanolo/acido formico/acetone nitrile (Calderaro et al., 2015) come ampiamente descritto nel capitolo 2 paragrafo 2.1.1.2. In ciascuna seduta è stato utilizzato come controllo negativo il terreno

axenico LYI-S-2 e/o il terreno di Robinson con e senza l'aggiunta di *Escherichia coli* sottoposti alla stessa procedura di estrazione proteica.

L'analisi degli estratti proteici è stata effettuata utilizzando lo strumento MicroFlex LT (Bruker Daltonics, Brema, Germania). Per l'acquisizione degli spettri è stato utilizzato il metodo MBT_Standard (modalità lineare positiva; frequenza del laser 60 Hz; sorgente di ioni 1 tensione 20 kV; intervallo di massa da 2.000 a 20.000 Da) in modalità manuale con un'acquisizione complessiva di 520 "laser-shot" da 40 "shot" ciascuno. L'acquisizione di ogni "shot" è stata eseguita in punti diversi del pozzetto sul quale era stato depositato il campione, con intensità variabile del laser (compresa tra 30 e 50%) per singolo "shot".

Le repliche degli spettri ottenuti appartenenti a ciascuno dei 3 ceppi di riferimento e dei 13 ceppi di isolamento clinico inclusi nello studio sono state analizzate mediante software dedicato (FlexAnalysis-Versione 3.1, Bruker Daltonics) al fine di normalizzare gli spettri mediante "Smoothing" e "Baseline". Inoltre, l'analisi è stata condotta anche per eliminare spettri con un'intensità $<10^4$ unità arbitrarie e spettri con picchi altamente differenti dagli altri.

Analisi mediante programma ClinProTools

Gli spettri dei 3 ceppi di riferimento ottenuti mediante MALDI-TOF MS e selezionati mediante FlexAnalysis sono stati analizzati mediante programma statistico ClinProTools (Versione 3.2, Bruker Daltonics) al fine di determinare picchi discriminanti tra le specie *E. histolytica* e *E. dispar*. L'analisi è stata effettuata all'interno di un intervallo di peso molecolare compreso tra 4.500 e 10.000 Da, area che comprende le maggiori differenze tra i profili proteici delle tre diverse specie.

Per poter paragonare gli spettri di specie diverse, l'analisi richiede un numero uguale di repliche per ciascuna specie (in questo studio ne sono state utilizzate 20). Gli spettri ottenuti per le diverse repliche della stessa specie vengono tra loro automaticamente ricalibrati dal "software" per eliminare possibili variazioni di lettura dello strumento (errore ≤ 300 ppm) e potere quindi creare uno spettro medio, somma di tutte le repliche, di ogni singola specie. Inoltre, viene eseguita una seconda ricalibrazione (sequenziale alla prima ed automatica) tra le repliche di specie diverse per eliminare le stesse variazioni (errore ≤ 300 ppm) e potere quindi paragonare tra loro gli spettri medi appartenenti alle diverse specie.

Inoltre, è stata eseguita la PCA per verificare l'omogeneità delle repliche della stessa specie e l'eterogeneità delle specie di repliche diverse. I risultati ottenuti sono visualizzati in un grafico tridimensionale generato automaticamente dal programma analitico.

Dal confronto di ogni spettro medio ottenuto è stata valutata la presenza/assenza di picchi discriminanti per i quali è stata successivamente calcolata la curva ROC ("Receiver Operating Characteristic"). La curva ROC esprime graficamente la specificità e la sensibilità del test, e in questo caso la qualità discriminante del picco trovato, fornendo un valore di AUC ("Area Under Curve") che va da 0 a 1 (un AUC= 0 indica che il picco non è discriminante; un AUC= 1 indica che il picco è discriminante). La significatività di ciascun picco discriminante considerato è stata ulteriormente valutata mediante test statistico ANOVA (Analisi della Varianza): il valore "p" ottenuto fornisce una misura della probabilità del potere discriminante del picco. La significatività è stata ottenuta per un valore di $p < 0.05$. Successivamente anche gli spettri ottenuti per i 13 isolati clinici mediante MALDI-TOF MS sono stati importati nel programma ClinProTools per creare lo spettro medio e paragonarlo con quelli ottenuti per i ceppi di riferimento al fine di verificare la presenza/assenza dei picchi discriminanti.

SDS-PAGE ed estrazione delle proteine da gel

Il sedimento ottenuto mediante estrazione proteica in etanolo/acido formico/acetonitrile (Calderaro et al., 2015) è stato anche sottoposto a corsa elettroforetica mediante SDS-PAGE (Calderaro et al., 2014d). In breve, il pellet è stato centrifugato a $100,000 \times g$ per 1 ora a 4°C e successivamente trattato con $50 \mu\text{l}$ di tampone Laemmli (50 Mm Tris-HCl Ph 6,8; 100 mM ditiotreitolo; 25% (w/v) glicerolo; 2% SDS; 0,1% blu di bromofenolo) e denaturato a 95°C per 5 minuti. In parallelo, sono stati fatti migrare due miscele di proteine a PM noto ("Low range protein standard"- PM 6500 – 66000, Sigma-Aldrich e "Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standards" - PM 1423 – 26625, Bio-Rad, Milano, Italia).

Lo "stacking gel" (4%) e il "running" gel (20%) sono stati preparati come di seguito descritto. Per preparare lo "stacking gel", 15,12 grammi di "Tris(hydroxymethyl)ammoniumhydrate electrophoresis pure reagent" (Tris) sono stati disciolti in 140 ml di acqua deionizzata, addizionando acrilamide/N,Nbisacrilamide al 4%, ammonio persolfato allo 0,125% e TEMED allo 0,1%.

Per l'allestimento del "running gel", 45,43 grammi di Tris sono stati disciolti in 140 ml di acqua deionizzata, addizionata di SDS allo 0,4% (pH 8,8). In seguito al "running gel" è stato aggiunto acrilamide/N,Nbisacrilamide al 20%, ammonio persolfato allo 0,023% e TEMED allo 0,1%. Il tampone di migrazione era così composto: 25 Mm Tris, 192 mM glicina (pH 8,3) e SDS allo 0,1%. I parametri utilizzati per la migrazione elettroforetica sono

stati: differenza di potenziale di 50V per i primi 40 minuti e 70V fino alla fine della corsa (circa 2,5 ore).

Conclusa la corsa il gel è stato sottoposto a colorazione con blu di Coomassie (Bio-Rad) (0,5% in acido acetico, Bio-Rad) per 30 minuti e successivamente decolorato con una soluzione di metanolo e acido acetico (50% metanolo, 10% acido aceto, 40% acqua deionizzata). Quando le bande sono risultate chiaramente visibili, la soluzione di decolorante è stata rimossa ed il gel reidratato in acqua.

Per l'estrazione delle proteine dal gel, ciascuna banda è stata tagliata e posta in eppendorf da 1,5 ml. Ciascuna delle bande escisse è stata sottoposta al seguente trattamento: lavaggio in 300 µl di acqua ultrapura, acido acetico al 10% in agitazione per 10 minuti, lavaggio in 300 µl di acqua ultrapura, acetonitrile in agitazione per 20 minuti, lavaggio in 300 µl di acqua ultrapura, etanolo in agitazione per 20 minuti, lavaggio in 300 µl di acqua ultrapura, soluzione di acido formico:acqua:isopropanolo (1:3:2, v/v/v) in agitazione per 3 ore. Ciascun campione escisso dal gel è stato poi disidratato e ridotto in piccoli frammenti per essere successivamente sottoposto ad estrazione delle proteine mediante l'aggiunta di 10 µl di HCCA. Le bande del peso molecolare nell'intervallo di interesse (3,496 to 14,437 Da) sono state sottoposte al medesimo protocollo di estrazione.

3.1.1.3 Risultati

L'analisi mediante MALDI-TOF MS ha prodotto per i 3 ceppi di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS, *E. dispar* SAW760 e *E. moshkovskii* Laredo) cresciuti in terreno LYI-S-2 un profilo proteico (Figura 3.3) risultato riproducibile in 4 differenti esperimenti eseguiti in 4 giorni diversi.

In Figura 3.3 sono mostrati anche i profili ottenuti per i 3 terreni di coltura analizzati; in particolare per il terreno axenico LYI-S-2 non è stato trovato alcun picco.

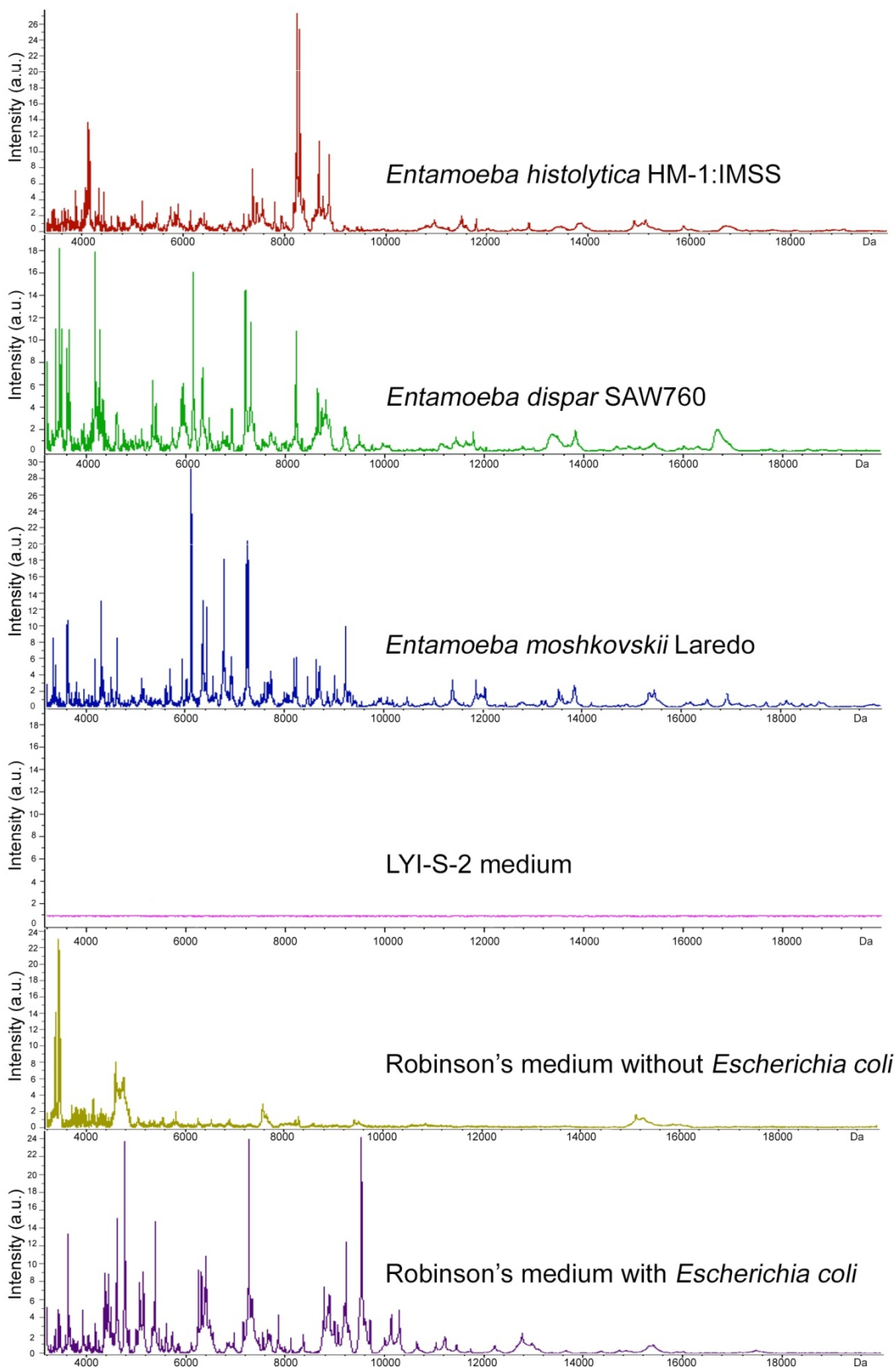


Figura 3.3. Spettri medi dei 3 ceppi riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS, *E. dispar* SAW760 ed *E. moshkovskii* Laredo) e dei 3 terreni (terreno axenico LYI-S-2 e terreno di Robinson con e senza *Escherichia coli*) utilizzati in questo studio ottenuti mediante analisi MALDI-TOF MS (Calderaro et al., 2015).

Sebbene l'analisi degli spettri ottenuti abbia mostrato la presenza di alcuni picchi sia nei 3 ceppi di riferimento sia nei 2 terreni di Robinson ed, in particolare, del terreno di Robinson supplementato con *E. coli*, la PCA (Figura 3.4) mostra la separazione delle repliche dei degli spettri ottenuti per i 3 ceppi di riferimento e per i 2 terreni in 5 differenti cluster.

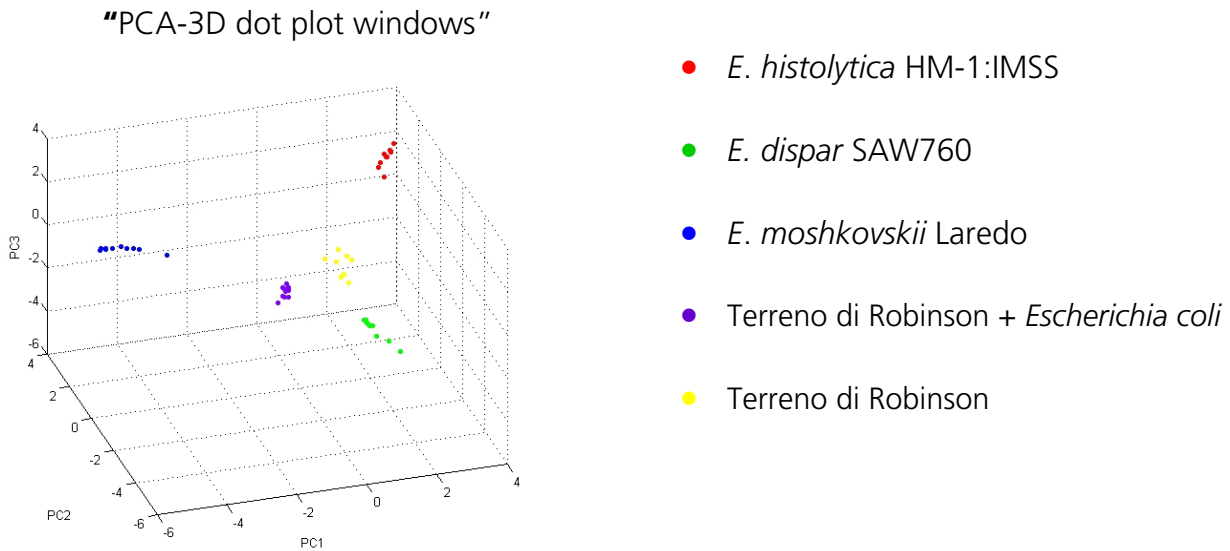


Figura 3.4. Grafico della clusterizzazione ottenuta sulla base della PCA relativo ai 3 ceppi di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS, *E. dispar* SAW760 ed *E. moshkovskii* Laredo) ed al Terreno di Robinson con e senza *E. coli*.

Le "interferenze" riscontrate con il terreno di coltura non hanno reso possibile la creazione di un MSP-spetrum specie-specifico e, pertanto, non è stato possibile identificare questi microrganismi attraverso il confronto degli spettri con una banca dati dedicata come descritto nel Capitolo 2. L'approccio identificativo utilizzato è stato quello dell'individuazione di marcatori specifici.

L'analisi mediante programma statistico dedicato ha mostrato le principali differenze tra gli spettri dei 3 ceppi di riferimento nell'intervallo di peso molecolare compreso tra 4500 e 10000 Da, intervallo nel quale è stata condotta una successiva analisi statistica. Tale analisi ha permesso di differenziare i profili proteici di *E. histolytica* HM-1:IMSS e di *E. dispar* SAW760 sulla base della presenza/assenza di 5 diversi picchi. In particolare, 2 picchi (8,246 e 8,303 Da; valore di $p < 0.00001$) sono presenti solo in *E. histolytica* e 3 picchi (4,714 valore di $p < 0.005$; 5,541 valore di $p < 0.00001$; 8,207 Da valore di $p < 0.013$) sono presenti solo in *E. dispar* (Tabella 3.1). Inoltre, sono stati trovati 3 picchi (6,118, 6,775 e 7,238 Da; valore di $p < 0.00001$) discriminanti per *E. moshkovskii* (Tabella 3.1) non presenti nelle altre due specie. L'analisi mediante "ROC curve" ha fornito per 7 degli 8 complessivi picchi discriminati (4,714, 5,541, 6,118, 6,775, 7,238, 8,246 e 8,303 Da) un valore di AUC uguale a 1, mentre per il picco a 8,207 Da un valore di AUC di 0,98.

I PM dei 2 picchi discriminanti trovati per *E. histolytica* corrispondono a quelli di due specifiche proteine le cui sequenze amminocidiche sono depositate in GenBank: "Amoebapore A" (Accession number 1OF9_A; 77 amino acids; molecular weight 8,250 Da) e "unknown putative protein of *E. histolytica* HM-1:IMSS-A" (Accession number ENY65454.1; 71 amino acids; molecular weight 8,300 Da). I PM dei picchi discriminati ottenuti per *E. dispar* e *E. moshkovskii* non hanno trovato alcuna corrispondenza con i PM di proteine depositate in GenBank per queste due specie.

L'analisi mediante SDS-PAGE dell'estratto proteico ottenuto per il ceppo di riferimento *E. histolytica* HM-1:IMSS ha mostrato un'ampia banda nella zona di PM compresa tra 6,5 e 14 kDa. La banda osservata nel gel nella zona di PM di interesse dopo colorazione con blu di Comessie è stata escissa ed analizzata mediante spettrometria di massa (Figura 3.5). Lo spettro ottenuto mostra la presenza di due picchi a 8.240 e 8.302 Da, rispettivamente, (Figura 3.5) il cui peso si sovrappone a quello dei picchi discriminanti ritrovati per *E. histolytica* (8.246 e 8.303 Da) nella prima analisi condotta mediante MALDI-TOF MS. Questo dato è corroborato dai risultati ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS delle bande dei pesi molecolari di 6.531 a 14.437 Da analizzati analogamente alla banda di interesse (Figura 3.5).

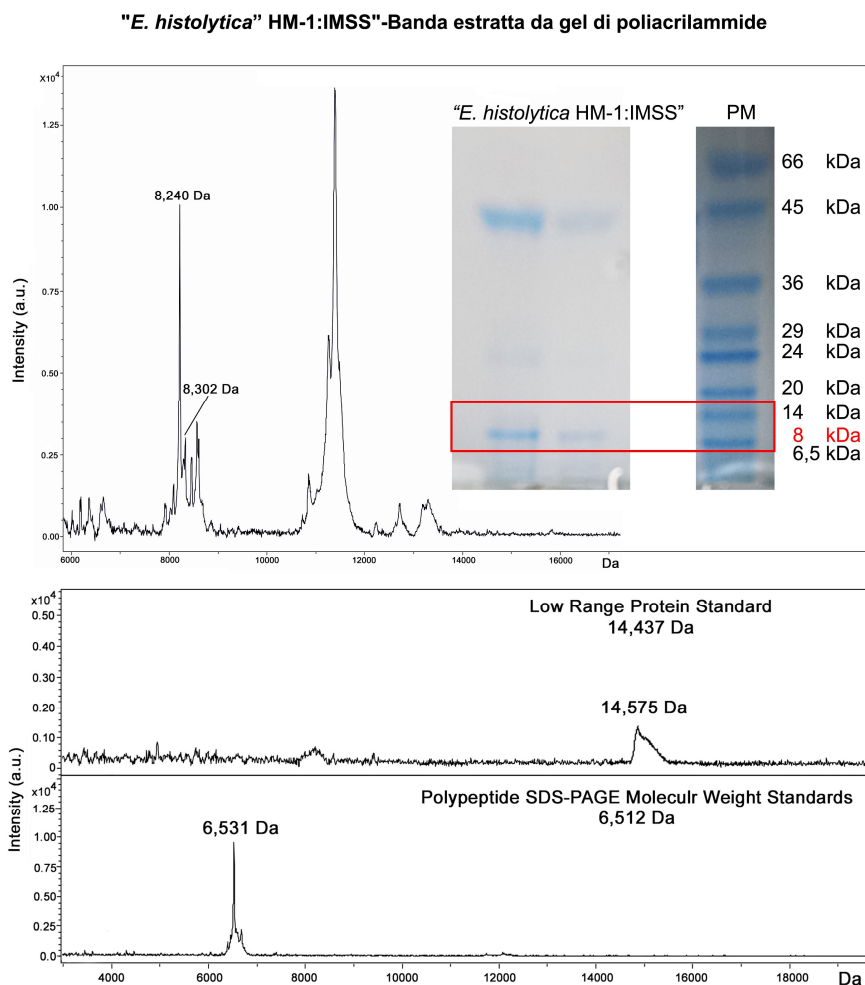


Figura 3.5. Grafico relativo agli spettri ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS delle bande estratte da gel di poliaccrilammide nell'intervallo di PM di interesse.

Per verificare l'affidabilità dei picchi discriminanti nel differenziare *E. histolytica* da *E. dispar*, sono stati analizzati 13 ceppi di isolamento clinico: 6 appartenenti alla specie *E. histolytica* (8026, 369, 373, 1238, 1656, 3291) e 7 alla specie *E. dispar* (1557, 217, 240, 417, 368, 1110, 2550) isolati nel nostro laboratorio ed identificati mediante saggio di Real-Time PCR (Tabella 3.1). Le repliche dei 13 ceppi di isolamento clinico acquisite mediante MALDI-TOF MS sono state selezionate come precedentemente descritto e importate nel programma statistico per poter verificare la loro possibile identificazione mediante picchi discriminanti. Lo spettro medio ottenuto per ciascun ceppo è stato confrontato con quello ottenuto per i ceppi di riferimento (Figura 3.7-A,B,C).

Ceppi di Riferimento	Real-Time PCR	Massa del picco (m/z) espressa in Dalton								MALDI-TOF MS
		4,714	5,541	6,118	6,775	7,238	8,207	8,246	8,303	
		P<0.0005	P<0.0000	P<0.0000	P<0.0000	P<0.0000	P<0.01	P<0.0000	P<0.0000	
<i>E. histolytica</i> HM-1:IMSS	<i>E. histolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. histolytica</i>
<i>E. dispar</i> SAW760	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
<i>E. moshkovskii</i> Laredo	negative	-	-	+	+	+	-	-	-	<i>E. moshkovskii</i>
Ceppi di isolamento clinico										
Ceppo 8026	<i>E. histolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. histolytica</i>
Ceppo 373	<i>E. histolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. histolytica</i>
Ceppo 369	<i>E. histolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. histolytica</i>
Ceppo 1238	<i>E. histolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. histolytica</i>
Ceppo 3291	<i>E. histolytica</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	<i>E. histolytica</i>
Ceppo 1656	<i>E. histolytica</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	/
Ceppo 1557	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
Ceppo 217	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
Ceppo 240	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
Ceppo 368	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
Ceppo 417	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
Ceppo 1110	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>
Ceppo 2550	<i>E. dispar</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>E. dispar</i>

"+" : presenza del picco; "-" : assenza del picco; "/" : nessun picco discriminante per *E. histolytica* e *E. dispar*; "p" : indica la significatività di ciascun picco discriminante.

Tabella 3.1. Picchi discriminanti ottenuti mediante analisi MALDI-TOF per i 3 ceppi di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS, *E. dispar* SAW760 ed *E. moshkovskii* Laredo) e per i 13 ceppi di isolamento clinico analizzati in questo studio a confronto con i risultati ottenuti mediante Real-Time PCR.

Dodici dei 13 isolati clinici sono stati correttamente identificati sulla base dei 5 picchi trovati discriminanti per le due specie (Tabella 3.1). L'identificazione mediante i 5 marcatori specifici è corroborata dal risultato della PCA (Figura 3.7-A) che mostra come le repliche ottenute per 5 dei 6 ceppi di isolamento clinico di *E. histolytica* si raggruppano vicino alle repliche ottenute per il rispettivo ceppo di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS), ma nettamente separate da quelle ottenute per *E. dispar* SAW760 e *E. moshkovskii* Laredo. Similmente, la PCA riportata in Figura 3.7-B mostra che le repliche ottenute per i 7 ceppi di isolamento clinico di *E. dispar* si raggruppano vicino al rispettivo ceppo di riferimento (*E. dispar* SAW760) in un'area separata rispetto a quelle relative ad *E. histolytica* HM-1:IMSS e *E. moshkovskii* Laredo.

Per il ceppo *E. histolytica* N.1656 non è stata ottenuta alcuna identificazione mediante MALDI-TOF MS: nessuna univoca combinazione di picchi discriminanti è stata trovata (Tabella 3.1). Interessante notare come le repliche degli spettri ottenuti per questo ceppo si raggruppano separatamente da quelle ottenute per i 3 ceppi di riferimento (Figura 3.7-C). Il ceppo N.1656 è stato identificato come *E. histolytica* mediante saggio di Real-Time PCR e la specie è stata confermata mediante sequenziamento dell'amplificato (18S-rDNA) e successivo allineamento con le sequenze pubblicate in GenBank (*E. histolytica* GenBank accession N. X56991; *E. dispar*, GenBank accession no. Z49256).

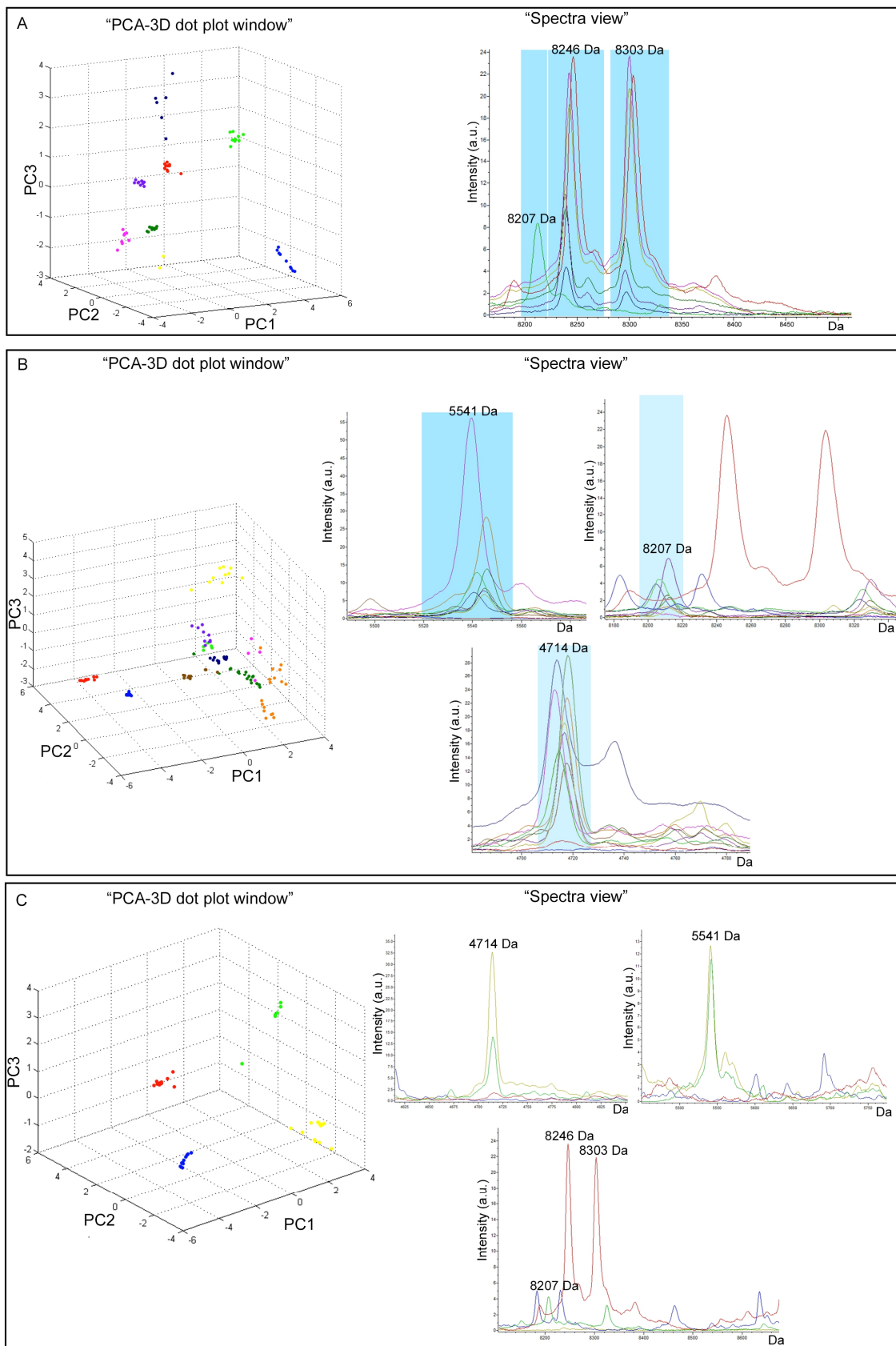


Figura 3.7. Grafici relativi alla clusterizzazione ottenuta sulla base della PCA: A) clusterizzazione e finestre di lettura delle repliche ottenute per 5 (*E. histolytica* N.369 in giallo, *E. histolytica* N.373 in verdone, *E. histolytica* N.1238 in viola, *E. histolytica* N.8026 in rosa, *E. histolytica* N.3291 in blu scuro) dei 6 ceppi di isolamento clinico di *E. histolytica* rispetto ai 3 ceppi di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS in rosso, *E.*

dispar in verdino, *E. moshkovskii* Laredo in blue); B) clusterizzazione e finestre di lettura delle repliche ottenute per i 7 ceppi di isolamento clinico di *E. dispar* (*E. dispar* N.1557 in giallo, *E. dispar* N.217 in verdone, *E. dispar* N.2550 in viola, *E. dispar* N.1110 in rosa, *E. dispar* N.240 blu scuro, *E. dispar* N.417 in marrone, *E. dispar* N.368 in arancione, *E. dispar* N.1382 in celeste) rispetto ai 3 ceppi di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS in rosso, *E. dispar* in verdino, *E. moshkovskii* Laredo in blue); C) clusterizzazione del ceppo di isolamento clinico *E. histolytica* N.1565 in giallo completamente separato rispetto ai 3 ceppi di riferimento (*E. histolytica* HM-1:IMSS in rosso, *E. dispar* in verdino, *E. moshkovskii* Laredo in blue) e relativa finestra di lettura (Calderaro et al., 2015).

Infine, per un ceppo di isolamento clinico *E. histolytica* N.373 i picchi discriminati (8,246 e 8,303 Da) sono stati identificati mediante analisi MALDI-TOF MS dopo 12h dall'inoculo del campione originale di feci in terreno iniziale di Robinson (Figura 3.8). Similmente, per un ceppo di isolamento clinico di *E. dispar* (N.1382) i picchi discriminanti sono stati osservati dopo 24h di incubazione del campione originale di feci in terreno iniziale di Robinson.

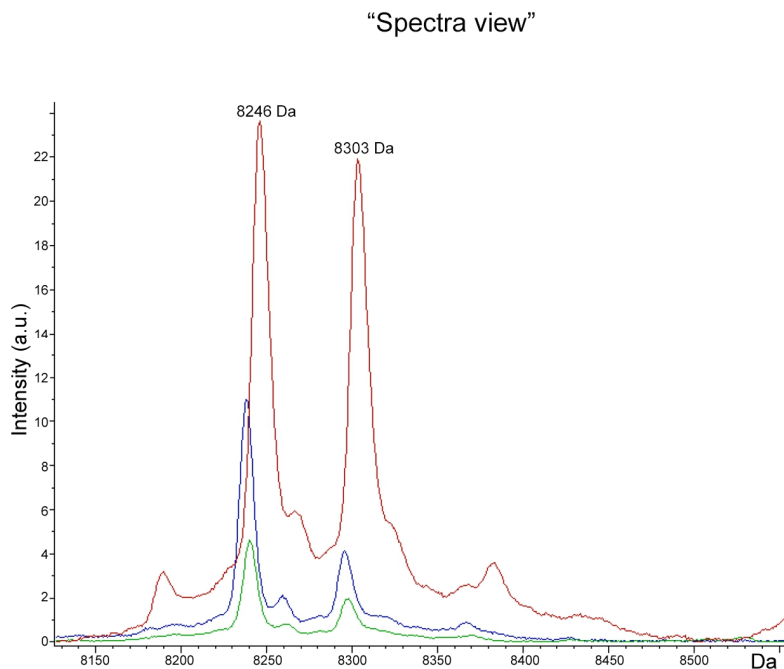


Figura 3.8. Finestra di lettura "Spectra view" dello spettro medio ottenuto per il ceppo di isolamento clinico *E. histolytica* N. 373 dopo 12 (in verde) e 24 (in blu) ore dall'inoculo del campione di feci originale nel terreno di Robinson comparato con lo spettro medio del rispettivo ceppo di riferimento *E. histolytica* HM-1:IMSS (in rosso) nell'intervallo di PM in cui sono stati trovati i picchi discriminanti.

3.1.1.4 Discussione

La spettrometria di massa mediante tecnologia MALDI-TOF può essere utilizzata per l'identificazione di microrganismi sia attraverso la costruzione di un profilo proteico specifico sia attraverso l'individuazione di specifici marcatori proteici (Croxatto et al., 2012; Calderaro et al., 2015). Quest'ultimo approccio è stato provato ed adottato in questo studio per l'identificazione e la differenziazione di ceppi di *Entamoeba histolytica* ed *Entamoeba dispar* a causa della complessità del materiale fecale di partenza e del terreno di coltura impiegato per il loro isolamento (particolare riferimento al terreno di Robinson

supplementato di *Escherichia coli*) che hanno creato interferenze con i profili proteici ottenuti per i ceppi amebici di riferimento. Lo sviluppo di tale applicazione ha consentito l'identificazione di picchi proteici in grado di differenziare ceppi di *E. histolytica* da ceppi di *E. dispar*. In particolare, l'analisi statistica ha mostrato 5 picchi discriminati con i quali differenziare tra le due specie: 2 picchi specifici per *E. histolytica* e 3 picchi specifici per *E. dispar*.

L'assenza dei 5 picchi discriminanti trovati per *E. histolytica* e *E. dispar* nei profili dei 3 differenti terreni di coltura utilizzati in questo studio (terreno axenico LYI-S-2 e terreno di Robinson con e senza *E. coli*) e in quello del ceppo di riferimento *E. moshkovskii* Laredo permettono di considerare questi picchi buoni marcatori in grado di differenziare *E. histolytica* da *E. dispar*. Analogamente sono stati trovati 3 marcatori in grado di discriminare *E. moshkovskii* da *E. histolytica* ed *E. dispar*.

La corrispondenza dei picchi a 8.246 e 8.303 Da con il PM di due specifiche proteine di *E. histolytica* depositate in letteratura (Amoebapore A e un "unknown putative protein" di *E. histolytica* ceppo di riferimento HM-1:IMSS-A) conferma la specificità dei picchi di *E. histolytica* identificati mediante analisi MALDI-TOF MS. Lo stesso riscontro non è stato possibile per i picchi di *E. dispar* e di *E. moshkovskii* in quanto nessuna proteina del PM di interesse è presente in GenBank.

I 5 marcatori hanno permesso di differenziare 12 dei 13 ceppi isolati da campioni di feci e cresciuti in terreno di Robinson (7 ceppi di *E. dispar* e 5 *E. histolytica*) confermando i risultati ottenuti mediante saggio di Real-Time PCR.

Per un solo ceppo di isolamento clinico di *E. histolytica* l'identificazione, confermata mediante sequenziamento della porzione 18S-rDNA, non è stata ottenuta mediante sistema MALDI-TOF MS in quanto non sono stati trovati né i picchi corrispondenti a *E. histolytica* né i picchi corrispondenti a *E. dispar*. Per questo ceppo, anche alla luce del risultato ottenuto della PCA in cui le repliche mostrano una "clusterizzazione" completamente separata rispetto ai 3 ceppi di riferimento, è possibile ipotizzare la presenza di mutazioni geno/fenotipiche a livello delle proteine individuate come marcatori specifici per *E. histolytica*. Per confermare questa ipotesi sarebbe necessario analizzare un numero maggiore di ceppi di isolamento clinico con analogo profilo proteico.

Il ritrovamento dei 5 picchi discriminanti solo dopo poche ore dall'inoculo del campione di feci nel terreno iniziale di Robinson suggerisce la possibile applicazione del sistema MALDI-TOF MS per identificare ceppi di isolamento clinico di *E. histolytica* ed *E. dipar* direttamente da coltura solo dopo 12 ore di incubazione e sottolinea l'affidabilità dei marcatori proteici

identificati in questo studio. I picchi discriminanti, infatti, sono stati ritrovati nonostante la presenza di materiale fecale che materialmente può disturbare e rendere difficile l'interpretazione dello spettro ottenuto mediante analisi MALDI-TOF MS. Risulta quindi molto promettente la possibilità di identificare le due specie direttamente dal campione di feci. Tuttavia, a causa della complessità del materiale da analizzare, non è atteso che tutti i picchi discriminanti vengano ritrovati per ciascuna specie in ogni seduta. La strada per compensare questa variabilità eventualmente presente in uno spettro fornito dall'analisi mediante MALDI-TOF MS è rappresentata dall'acquisizione di un numero maggiore di spettri dagli stessi campioni in diversi esperimenti indipendenti e dalla successiva analisi statistica (Moura et al., 2015).

In conclusione, in questo studio è stata dimostrata l'affidabilità dei marcatori proteici specifici per *E. histolytica* ed *E. dispar* individuati analizzando colture xeniche mediante approccio combinato di analisi proteomica e statistica con programma dedicato. Questo ha permesso di applicare tale approccio con successo a diversi isolati di *E. histolytica* ed *E. dispar*, rafforzando l'abilità del sistema identificativo MALDI-TOF MS.

Infine, la rivelazione di specifici marcatori per l'identificazione mediante MALDI-TOF MS di protozoi del genere *Entamoeba* ha mostrato diversi vantaggi rispetto ai metodi molecolari attualmente disponibili: la semplicità e la facilità richieste per la preparazione dei campioni e l'immediata acquisizione dei dati rendono questo un metodo di identificazione accurato e rapido risultando più conveniente anche dal punto di vista economico, con un costo totale di 0,50 euro (materiale consumabile) per ceppo analizzato.

Capitolo 4. Identificazione indiretta mediante MALDI-TOF MS di meccanismi di resistenza agli antibiotici.

La scoperta di composti, naturali prima e di sintesi poi, in grado di debellare malattie un tempo definite incurabili, ha rivoluzionato la medicina moderna, creando le basi, dalla seconda metà del XX secolo, per un'intensa ricerca che ha portato sul mercato svariati farmaci ad attività antimicrobica (Waksman et al., 1942). L'esordio nell'uso terapeutico della penicillina (Hemming, 1944) nel 1944 è stato subito seguito da segnalazioni sulla comparsa di resistenze batteriche (Jacoby, 2009), resistenze che hanno accompagnato poi costantemente l'introduzione di ogni nuova molecola (Buynak, 2004). L'uso massiccio di antibiotici nelle strutture sanitarie ha incrementato l'emergenza di specie resistenti, che in tale ambiente trovano le condizioni ideali per diffondersi. La comparsa di resistenze è spesso più veloce dello sviluppo di nuovi principi attivi, diventando così un vero problema per le organizzazioni sanitarie, sia per le implicazioni cliniche, quali l'aumento di mortalità, la durata delle malattie, l'insorgenza di complicanze e la possibilità di epidemie, sia per il notevole dispendio economico legato all'allungamento dei ricoveri e alla necessità di ricorrere a farmaci di ultima generazione molto più costosi, senza tralasciare il peggioramento della qualità di vita dei pazienti. La conoscenza dei meccanismi di resistenza batterica e lo sviluppo di nuovi farmaci ad attività antimicrobica sono fattori essenziali per limitare i danni e mantenere aperta una possibilità di cura (Bush, 2010).

La resistenza batterica agli antibiotici è il risultato del processo di adattamento dei microrganismi all'ambiente (Bendinelli et al., 2006). Alcune specie sono resistenti agli antibiotici per caratteristiche intrinseche quali ad esempio l'impermeabilità di membrana o la produzione di enzimi inattivanti. Tali forme di resistenza vengono indicate con il termine non insensibilità. Si parla invece di resistenza acquisita quando questa è determinata dalla comparsa di ceppi resistenti originatisi nell'ambito di una popolazione sensibile (Bendinelli et al., 2006) (Figura 4.1).

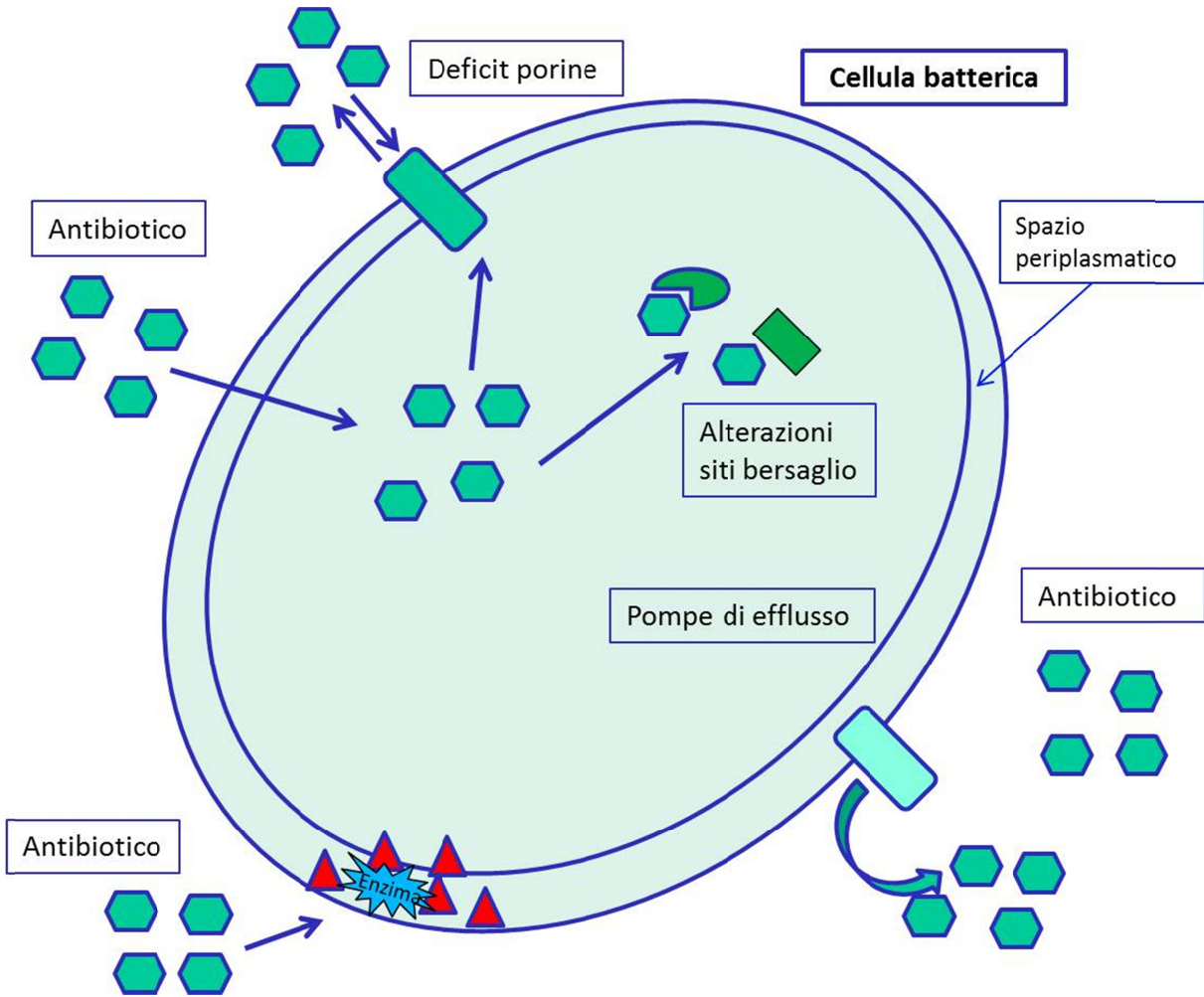


Figura 4.1. Rappresentazione grafica dei meccanismi di resistenza agli antibiotici nei batteri.

All'interno del gruppo formato dai batteri Gram-negativi sono presenti diversi meccanismi che favoriscono la comparsa di ceppi multi-resistenti. Questi meccanismi possono essere mediati a livello genetico da particolari strutture di DNA che permettono il trasferimento di geni dell'antibiotico resistenza dai cromosomi ai plasmidi (Bendinelli et al., 2006; El Salabi et al., 2013) quali gli integroni, i trasposoni, le sequenze d'inserzione, e le regioni comuni (ISCRs) che sono associate all'espressione di alcuni geni di resistenza in *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Rodriguez-Martinez et al., 2006; El Salabi et al., 2013).

Nonostante i metodi basati sulla coltura in agar siano dispendiosi, essi rappresentano ancora oggi il metodo di riferimento per il rivelamento delle resistenza agli antibiotici nei laboratori di diagnosi clinica di tutto il mondo. Un'applicazione innovativa per il rilevamento dei meccanismi di antibiotico-resistenza, peculiarità della diagnosi in microbiologia clinica, è basata sull'utilizzo della spettrometria di massa MALDI-TOF (Hrabák et al., 2013). La spettrometria di massa MALDI-TOF in microbiologia clinica, che ha

già rivoluzionato il modo di identificare i batteri e i funghi, sta attualmente compiendo i primi passi verso una rapida identificazione dei meccanismi alla base della resistenza ad antibiotici ed antimicotici (Hrabák et al., 2013). Ad oggi, il rilevamento della resistenza agli antibiotici è, infatti, una delle grandi sfide e opportunità per la spettrometria di massa MALDI-TOF MS come piattaforma da utilizzare in ambito microbiologico. La ragione di questo risiede in particolare nell'idea che il rilevamento di una resistenza possa essere significativamente accelerato e semplificato così come lo è stato per l'identificazione dei microrganismi. La possibilità più semplice di utilizzare la spettrometria di massa MALDI-TOF per il rilevamento dell'antibiotico-resistenza consiste nel trovare differenze caratteristiche tra gli spettri di ceppi suscettibili e quelli di ceppi non-sensibili di una determinata specie (Kostrzewa et al., 2013). Tuttavia, gli approcci che sono già stati proposti mediante MALDI-TOF MS si basano su quanto segue (Hrabák et al., 2013):

- 1) analisi di molecole ad attività antibiotica e dei relativi prodotti modificati dall'azione di enzimi responsabili della resistenza. Questo approccio dovrebbe essere convalidato per la diagnosi di routine utilizzando un protocollo semplice per la preparazione della sospensione batterica o degli estratti batterici. Il rilevamento delle β -lattamasi secondo questo approccio, ad esempio, è stato recentemente validato ed è ampiamente utilizzato nei laboratori di routine e di riferimento (Wang et al., 2013).
- 2) Analisi delle modificazioni dei siti bersaglio (ad esempio, metilazione del DNA ribosomiale). Per esempio, la rilevazione dell'attività metiltransferasica, responsabile della resistenza agli aminoglicosidi, cloramfenicolo, clindamicina e causata dalla metilazione del 16S rRNA, tuttavia, è ancora lungi dall'essere applicata nella diagnosi di routine.
- 3) Rivelazione di mutazioni geniche mediante "mini-sequencing" e studi di proteomica sui batteri multiresistenti che consentono la costruzione di un "database" completo di "fingerprints" proteici derivanti da isolati resistenti, al fine di poter rilevare le principali proteine responsabili delle resistenze. Questo approccio, recentemente, ha permesso di rilevare ceppi di *Enterococcus* spp. vancomicina-resistenti, convalidando un metodo che sembra essere utile nei laboratori diagnostici per il rilevamento rapido di ceppi di *Enterococcus faecium* vanB-positivi. I risultati ottenuti per gli enterococchi vancomicina-resistenti pongono le basi per il superamento di una

grande sfida per le future applicazioni della spettrometria di massa MALDI-TOF in microbiologia clinica: la discriminazione diretta tra ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) e ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibili (MSSA) (Hrabák et al., 2013).

- 4) Quantificazione degli antibiotici. Lo sviluppo di un metodo per determinare la concentrazione di antibiotico potrebbe essere di aiuto nell'analisi dei meccanismi di afflusso ed efflusso del farmaco.

4.1 Batteriologia

4.1.1 Resistenza agli antibiotici: saggio fenotipico indiretto per la ricerca di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi.

4.1.1.1 Introduzione

Nella farmaco resistenza dei Gram-negativi assume particolare importanza la produzione di enzimi in grado di lisare i carbapenemi. I carbapenemi sono composti che, a differenza delle penicilline, presentano un anello tiazolidinico nel quale lo zolfo in posizione 1 è sostituito dal carbonio (Figura 4.2) (Bendinelli et al., 2006). Questa modifica fornisce alla struttura base dei carbapenemi una maggiore resistenza all'idrolisi rispetto ai farmaci β -lattamici di precedente generazione (Rapp e Urban, 2012). I carbapenemi sono caratterizzati, infatti, da uno spettro d'azione estremamente ampio e da una migliore resistenza alle β -lattamasi (Bendinelli et al., 2006). I carbapenemi sono classificati in tre gruppi in base al loro spettro d'azione: quelli di gruppo 1 (ertapenem, panipenem) che presentano una limitata attività antibatterica verso Gram negativi non fermentanti, quelli di gruppo 2 (imipenem, meropenem, biapenem, doripenem) attivi verso batteri non fermentanti e sono raccomandati per il trattamento di infezioni nosocomiali e quelli di gruppo 3 (razupenem, tomopenem) attivi sia nei confronti di batteri Gram negativi non fermentanti che di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) (Zoppi, 2012; El Salabi et al., 2013).

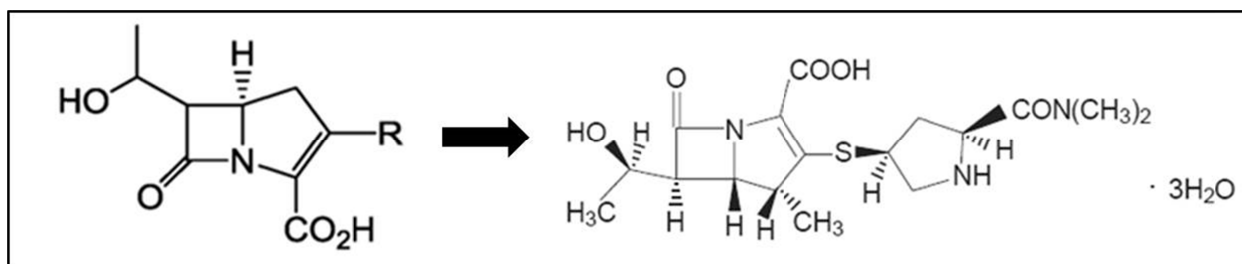


Figura 4.2. Struttura base dei carbapenemi (Konaklieva, 2014) ed esempio struttura dell'antibiotico meropenem (Zoppi, 2012).

L'insorgenza della resistenza ai carbapenemi nelle *Enterobacteriaceae* costituisce un problema clinico rilevante, dato che questa classe di antibiotici (β -lattamici) rappresenta la prima scelta per la terapia delle infezioni invasive da enterobatteri Gram-negativi multiresistenti (Nordmann e Poirel, 2013). Tale tratto di resistenza è dovuto prevalentemente all'emergere di nuovi enzimi, le carbapenemasi, che proteggono il microrganismo dall'effetto letale degli antibiotici attraverso l'idrolisi dell'anello β -lattamico del farmaco (Rapp e Urban, 2012).

La prima identificazione di enzimi in grado di idrolizzare i carbapenemi è avvenuta nel 1993 su un ceppo di *Enterobacter cloacae* di isolamento clinico, codificato dal gene cromosomico NmcA. La produzione di queste β -lattamasi in ceppi di *K. pneumoniae* è stata riportata per la prima volta nel 1999 (Yan et al., 2001). Le carbapenemasi possono essere suddivise in tre classi (A, B e D) secondo la classificazione di Ambler (Ambler, 1980). Le classi A e D utilizzano la serina per l'idrolisi dell'anello β -lattamico mentre quelli di classe B sfruttano gli ioni zinco divalenti per l'idrolisi del substrato (Tabella 4.1) (Rapp e Urban, 2012).

Tipo	Classe molecolare	Gruppi funzionali	Varianti	Specie
KPC	A	2f	KPC-2 a -13	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Roultella</i> spp.
VIM	B (B1)	3°	VIM-1, -2, -4, -5, -6 VIM- 11, -12, -13, -19, -23 VIM- 24, -25, -26, -27, -32	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Kl. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia stuartii</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
IMP	B (B1)	3°	IMP-1, -3, -4, -6, -8 IMP-11, -24, -27	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>M. morganii</i>
NDM	B (B1)	3a	NDM-1,-4,-5,-6	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>M. morganii</i> , <i>Providencia</i> spp.
OXA	D	2df	OXA-48,-163,-181	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. mirabilis</i>

Tabella 4.1. Classificazione e distribuzione delle carbapenemasi codificate da plasmidi nelle *Enterobacteriaceae* (Rapp e Urban, 2012).

La continua diffusione a livello globale della resistenza ai carbapenemi nelle *Enterobacteriaceae*, come conseguenza dell'acquisizione di geni che codificano per le carbapenemasi, ha portato, nell'ultimo decennio, a una crisi globale senza precedenti dovuta alla rapida disseminazione di batteri Gram-negativi multiresistenti (Tzouvolakis et al., 2012). Gli enterobatteri produttori di carbapenemasi, infatti, causano importanti infezioni in pazienti debilitati e immunocompromessi, soprattutto in casi di lungodegenza ospedaliera (Tzouvolakis et al., 2012). L'epidemiologia degli enterobatteri produttori di carbapenemasi (EPC) a livello mondiale appare ad oggi molto variegata con differenze significative tra Paesi: in alcuni casi si sono verificate epidemie di larga scala che hanno coinvolto numerosi ospedali di una stessa regione, in altri contesti la presenza di questi microrganismi è divenuta endemica ed in altri ancora dove il fenomeno è, tutt'ora emergente. Negli ultimi 10 anni si è assistito ad un incremento di EPC in tutto il mondo, con situazioni di diffusione di particolare entità e rilevanza in Stati Uniti d'America, Israele, Porto Rico e Colombia (soprattutto a causa di carbapenemasi di tipo KPC), Grecia (soprattutto a causa di carbapenemasi di tipo KPC e VIM), e sub-continente indiano (soprattutto soprattutto a causa di carbapenemasi di tipo NDM) (Figura 4.3) (Istituto Superiore di Sanità, 2012).

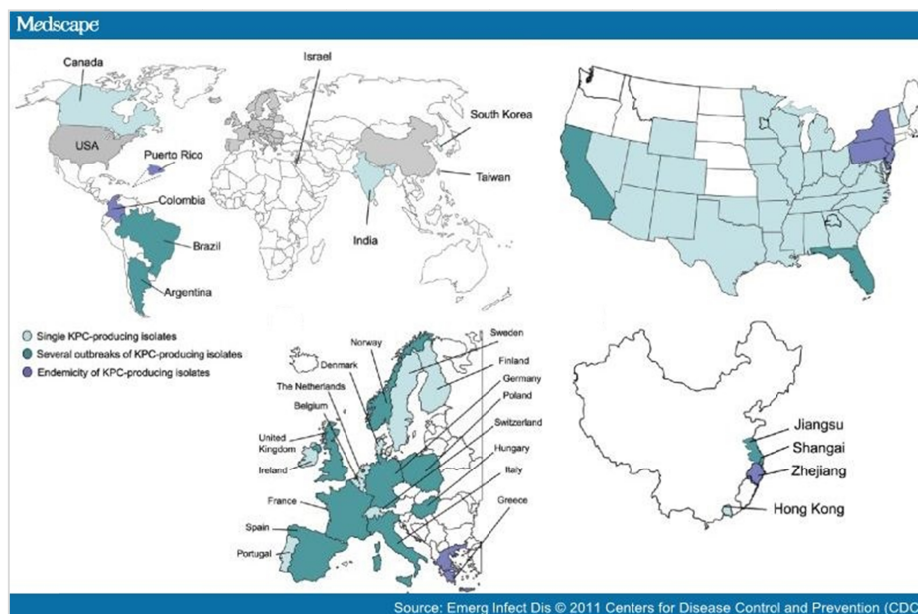


Figura 4.3. Quadro epidemiologico globale di ceppi produttori di carbapenemasi. Immagine modificata da Nordmann et al. (Nordmann et al., 2011).

In Europa, i dati sull'andamento dell'antibiotico-resistenza nei confronti dei carbapenemi da parte dei ceppi di *K. pneumoniae* sono raccolti ogni anno attraverso la rete europea EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). Nel 2009 la frequenza di ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi era al di sotto dell'1-2% nella maggior parte dei Paesi europei, mentre in Grecia e a Cipro la frequenza era elevata e pari, rispettivamente, a 43,5% e a 17% (Istituto Superiore di Sanità, 2012). In Italia, si è osservato un andamento in drammatico aumento: mentre nel 2009 solo l'1,3% dei ceppi di *K. pneumoniae* isolati da sangue era resistente ai carbapenemi, questa percentuale è salita al 16% nel 2010 e al 26,7% ceppi nel 2011 (Istituto Superiore di Sanità, 2012), fino a raggiungere il 35% nel 2013. Al fine di monitorare la frequenza e la distribuzione geografica delle infezioni invasive da EPC in Italia, è stata istituita una sorveglianza dei casi, valutata di anno in anno che prevede la segnalazione dei pazienti con infezione batterica causata da *K. pneumoniae* e *E. coli* non sensibili ai carbapenemi e/o produttori di carbapenemasi (Istituto Superiore di Sanità, 2012). La rivelazione di enterobatteri produttori di carbapenemasi nei laboratori di diagnosi si basa, innanzitutto, su saggi di sensibilità *in vitro* agli antibiotici o antibiogramma (Nordmann e Poirel, 2013). La determinazione della sensibilità può essere definita come "concentrazione minima inibente" (MIC), cioè la concentrazione minima necessaria a inibire la crescita del microrganismo in esame (Bendinelli et al., 2006). La rilevazione della resistenza ai

carbapenemi, soprattutto attraverso l'utilizzo di sistemi automatizzati, è complicata perché alcuni isolati mostrano valori elevati della MIC, ma sono sensibili ai carbapenemi (Carvalhoes et al., 2013). Ciò è dovuto al fatto che la completa resistenza ai carbapenemi necessita della presenza di un secondo meccanismo di resistenza quale può essere l'alterazione della permeabilità di membrana (Rapp e Urban, 2012). Queste osservazioni hanno condotto diverse Istituzioni ("European Committee on Antimicrobial Susceptibility", EUCAST e "Clinical and Laboratory Standard Institute", CLSI) ad abbassare i "breakpoints" delle MIC per aumentare la probabilità di rilevare *Enterobacteriaceae* spp. resistenti ai carbapenemi (Robilotti e Deresinski, 2014). I "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) degli Stati Uniti raccomandano, infatti, l'utilizzo di nuovi criteri d'interpretazione basati sui valori di "cut-off" epidemiologici ("e-coff") per lo "screening" della eventuale presenza di carbapenemasi (Tabella 4.2) (Robilotti e Deresinski, 2014).

Carbapenemi	Precedente Breakpoints (M100-S19)			Attuale Breakpoints (M100-S22)		
	Sensibile	MIC (µg / ml) Intermedio	Resistente	Sensibile	MIC (µg / ml) Intermedio	Resistente
Ertapenem	≤ 2	4	≥ 8	≤ 0,5	1	≥ 2
Imipenem	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	≤ 4	8	≥ 16	≤ 1	2	≥ 4

Tabella 4.2. Variazione dei "breakpoints di interpretazione" delle MIC previsti dal CLSI (Robilotti e Deresinski, 2014).

L'antibiotico meropenem offre il miglior compromesso nella rilevazione di batteri produttori di carbapenemasi rispetto agli altri carbapenemi in quanto l'ertapenem, per esempio, mostra una migliore sensibilità, tuttavia, soffre di una più bassa specificità, soprattutto nei confronti di specie appartenenti al genere *Enterobacter* (EUCAST, 2012). Inoltre, è consigliabile sottoporre a conferma fenotipica i ceppi di enterobatteri che abbiano una MIC ≥ 0,5 µg/ ml per meropenem (Agenzia sanitaria e sociale regionale, Regione Emilia-Romagna, 2013).

La rilevazione di batteri produttori di carbapenemasi prevede l'utilizzo di test fenotipici e test genotipici di conferma (Figura 4.4).

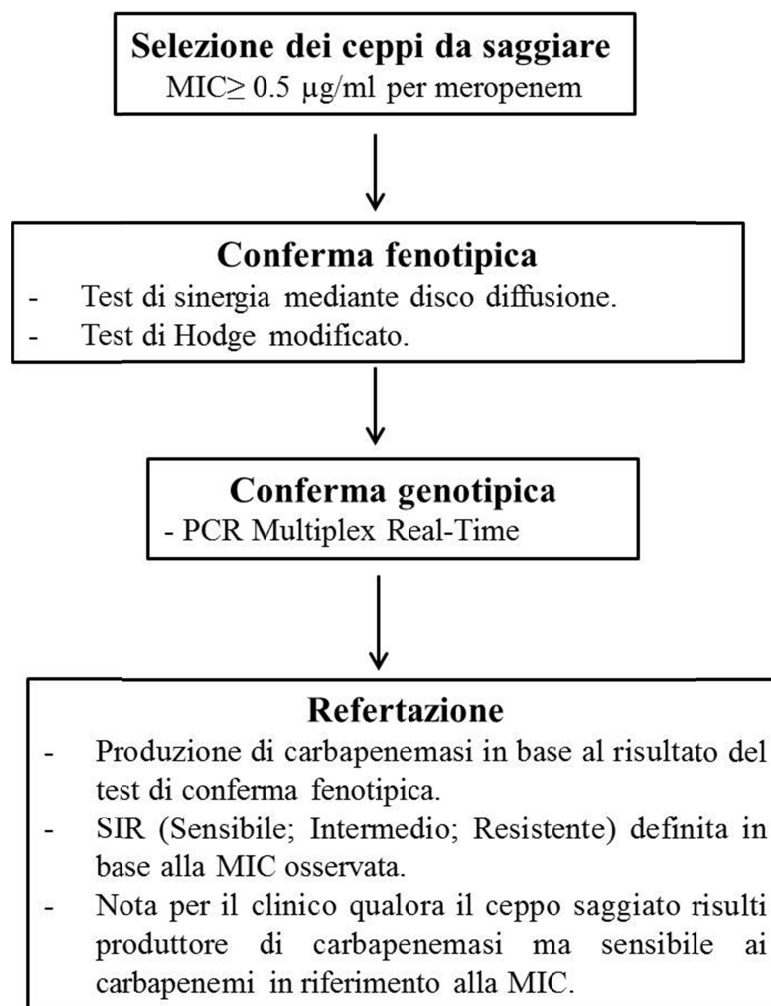


Figura 4.4. Algoritmo per l'identificazione fenotipica, genotipica e la refertazione degli enterobatteri produttori di carbapenemasi. Immagine tratta e modificata dal protocollo operativo Regione Emilia-Romagna (Agenzia sanitaria e sociale regionale, Regione Emilia-Romagna, 2013).

Gli enterobatteri resistenti ai carbapenemi e potenzialmente produttori di carbapenemasi devono essere confermati come produttori mediante saggi fenotipici (saggio di Hodge modificato e Test di Sinergia mediante disco diffusione) e genotipici (saggi di amplificazione genica).

I saggi fenotipici in grado di rilevare ceppi produttori di carbapenemasi, sono economici e relativamente facili ma richiedono la crescita del ceppo batterico (24 ore) dopo il riscontro della resistenza ai carbapenemi ed un certo grado di esperienza per l'interpretazione dei risultati.

I saggi genotipici, basati nella maggior parte dei casi su saggi di amplificazione genica, sono in grado di identificare i geni codificanti le carbapenemasi; sebbene siano altamente specifici riconoscono un numero limitato di geni ed hanno costi elevati, richiedono

personale esperto e aree dedicate. Pertanto i laboratori di microbiologia clinica necessitano di metodi più rapidi e più affidabili per confermare la produzione di carbapenemasi in grado di fornire importanti informazioni per la scelta di un'adeguata terapia e dati per gli specialisti del settore che controllano la diffusione delle infezioni in ambito sanitario e si occupano di adottare nuove misure di sorveglianza epidemiologica (Hrabák et al., 2011b, 2013).

Scopo di questo studio è stata la valutazione della spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF come saggio fenotipico rapido per la determinazione della produzione di carbapenemasi in *Enterobacteriaceae* di isolamento clinico. Tale valutazione è stata condotta verificando l'avvenuta idrolisi del meropenem (carbapeneme di riferimento utilizzato in questo studio) a contatto con i ceppi di riferimento e ceppi di isolamento clinico potenzialmente produttori di carbapenemasi dopo la messa a punto di un protocollo analitico dedicato.

4.1.1.2 Materiali e Metodi

Ceppi utilizzati nello studio e condizioni di crescita

In questo studio sono stati inclusi 3 ceppi di riferimento: *K. pneumoniae* ceppo ATCC BAA-1705 (produttore di carbapenemasi di tipo KPC), *K. pneumoniae* ceppo ATCC BAA-1706 (non produttore di carbapenemasi) e *K. pneumoniae* New Delhi ceppo ATCC BAA-2146 (produttore di carbapenemasi di tipo NDM).

Inoltre, sono stati inseriti 1219 ceppi di batteri Gram-negativi (1185 *Enterobacteriaceae* e 34 non-*Enterobacteriaceae*) isolati da altrettanti campioni clinici selezionati tra quelli pervenuti presso il settore Batteriologia dell'Unità Operativa di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma da luglio 2011 a novembre 2015 ed identificati mediante spettrometria di massa (Bruker Daltonics) (Tabella 4.3). La resistenza ai farmaci è stata saggiata mediante test di sensibilità *in vitro* ai farmaci con determinazione della concentrazione minima inibente (M.I.C.) utilizzando il sistema Pheonix (Beckton Dickinson, Italia). In caso di resistenza ai carbapenemi, la produzione di carbapenemasi è stata verificata mediante test di Hodge modificato; l'identificazione fenotipica e genetica della classe di appartenenza all'eventuale carbapenemasi prodotta, è stata valutata, rispettivamente, mediante saggio di sinergia e mediante saggio di Real Time PCR con chimica Taqman. Tutti i ceppi batterici utilizzati in questo studio sono cresciuti su piastre di Agar sangue di cavallo (Kima, Italia) incubate a 37°C per 24 ore.

Enterobacteriaceae (No. 1185)	Numero di ceppi saggiati
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	985
<i>Escherichia coli</i>	90
<i>Enterobacter cloacae</i>	36
<i>Citrobacter freundii</i>	17
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15
<i>Enterobacter aerogenes</i>	11
<i>Proteus mirabilis</i>	11
<i>Serratia marcescens</i>	8
<i>Morganella morganii</i>	6
<i>Citrobacter koseri</i>	5
<i>Providencia stuartii</i>	1
non-Enterobacteriaceae (No. 34)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
<i>Acinetobacter baumannii</i>	8
Totale	1219

Tabella 4.3. Ceppi di isolamento clinico inseriti nello studio.

*Saggio di idrolisi del meropenem (MHA) mediante MALDI-TOF MS:
messa a punto del protocollo*

Per ciascun ceppo batterico di riferimento e di isolamento clinico analizzati in questo studio sono state preparate sospensioni batteriche alla concentrazione di 4 Mc Farland (McF) in un volume di 2 ml di una soluzione di TRIS-HCl 20 mM pH 6.8.

Un'aliquota da 1 ml di ciascuna sospensione ottenuta è stata centrifugata a 14000 x g per 6 minuti ed il soprannatante è stato rimosso. Il sedimento così ottenuto è stato sottoposto al seguente trattamento:

- aggiungere 30 µl di meropenem ad una concentrazione 10 mM in TRIS-HCl 20 mM pH 6.8;
- risospendere completamente il sedimento;
- aggiungere 10 µl di NaCl 0,45 %;
- incubare la soluzione ottenuta a 37 °C per 2 o 4 ore mantenendola in costante agitazione (eppendorf termomixer confort, Germania);
- trascorse le 4 ore, centrifugare la sospensione a 14000 x g per 3 minuti;
- recuperare in un eppendorf da 1,5 ml (1,5 ml microtube, SARSTEDT, Germania) il soprannatante ottenuto.

Per verificare dopo quanto tempo il meropenem a contatto con la sospensione batterica a 37° C fosse idrolizzato per la presenza di carbapenemasi di tipo KPC, NDM e VIM, i ceppo di riferimento *K. pneumoniae* ATCC 1705 e *K. pneumoniae* ATCC 2146 (produttori di

carbapenemasi di tipo KPC e di tipo NDM, rispettivamente) e il ceppo di isolamento clinico *K. pneumoniae* N.1381 (produttore di carbapenemasi di tipo VIM) sono stati utilizzati per preparare 5 sospensioni batteriche di 4 McF in 2 ml di Tris-HCl 20 mM pH 6.8 ciascuna. Tali sospensioni batteriche hanno subito lo stesso trattamento sopra descritto. Le reazioni sono state bloccate a 5 diversi tempi di incubazione (30 minuti, 1, 2, 3 e 4 ore). Ciascuna sospensione, trascorso il rispettivo tempo di incubazione è stata centrifugata a 14000 x g per 3 minuti ed il sopranatante ottenuto è stato utilizzato per allestire la piastra dedicata all'analisi mediante MALDI-TOF MS.

La pulizia della piastra dedicata utilizzata per l'analisi mediante MALDI-TOF MS è stata condotta mediante il protocollo riportato in dettaglio nel capitolo 2 paragrafo 2.1.3.5.

Partendo dai classici depositi ampiamente descritti nel Capitolo 1, nel corso della tesi è stato ottimizzato il metodo di cristallizzazione che risulta essere simile alla goccia secca ma la cui miscelazione campione-matrice viene eseguita direttamente su ogni singolo pozzetto della piastra. In breve, il sopranatante ottenuto dal trattamento sopra descritto è stato depositato miscelandone 1 µl con 1 µl di matrice 2,5-DHB direttamente sui pozzetti della piastra dedicata all'analisi mediante MALDI-TOF MS (4 pozzetti per ciascun ceppo batterico di riferimento e di isolamento clinico). La matrice 2,5-DHB alla concentrazione di 20 mg/ml è stata preparata pesando mediante bilancia analitica 20 mg di polvere di 2,5-DHB e risospingendola in 1 ml di solvente OS-TA30.

In ogni seduta sulla piastra dedicata sono stati anche depositati l'antibiotico meropenem non a contatto con sospensione batterica (1 µl per pozzetto) utilizzando la matrice 2.5-DHB (1 µl per pozzetto) ed i due calibratori "Peptide Calibration Standard II" (PCS II) e BTS (1 µl per pozzetto) utilizzando come matrice l'HCCA (1 µl per pozzetto).

Calibrazione dello strumento MALDI-TOF MS per gli intervalli di peso molecolare di 100-1200 Da e di 2000-20000 Da

Per calibrare lo strumento MALDI-TOF MS nell'intervallo di PM compreso tra 100 e 1200 Da è stato utilizzato l'apposito calibratore PCS II, mediante lettura in modalità manuale. Tale calibratore liofilo è stato ricostituito aggiungendo 125 µl di OS-TA30 alla provetta originale risospendendo accuratamente con il puntale e mediante "vortex" in modo da rendere la sospensione omogenea.

Per riportare lo strumento MALDI-TOF MS nelle impostazioni utilizzate normalmente nel nostro laboratorio per l'identificazione di batteri e funghi, è stato necessario effettuare la

calibrazione dello strumento nel "range" di PM compreso tra 2000 e 20000 Da utilizzando l'apposito calibratore BTS, seguendo le indicazioni fornite dall'azienda produttrice. La calibrazione è stata effettuata mediante lettura automatica di questo pozzetto attraverso la funzione dedicata del programma in dotazione dello strumento. La siofilizzazione del BTS e della matrice è stata ottenuta come descritto nel capitolo 2 paragrafo 2.1.1.2.

Acquisizione degli spettri mediante MALDI-TOF MS.

Il saggio di idrolisi del meropenem è stato condotto utilizzando lo spettrometro di massa MicroFlex LT (Bruker Daltonics). Sono stati utilizzati i seguenti parametri dello strumento: modalità lineare positiva; frequenza del laser 64 Hz; sorgente di ioni 1, 20 kV; sorgente di ioni 2, 16,7 kV; tensione all'obiettivo, 7,0 kV; intervallo di massa, da 100 a 1200 Da, 250 "laser-shot" da 50 "shot" per ciascuno "step" in diversi punti del pozzetto sul quale era stato depositato ciascun campione, "detector gain" 6,6 e "resolution" 1,0.

Criteri di interpretazione dei risultati ottenuti dal saggio di idrolisi del meropenem (MHA) mediante MALDI-TOF MS

I ceppi saggiati mediante MHA sono stati classificati come non produttori di carbapenemasi quando all'interno dello spettro analizzato sono stati rilevati solo i picchi del meropenem nella sua forma intatta (384 ± 1 Da) e dei relativi sali sodici (406 ± 1 Da e 428 ± 1 Da). I ceppi sono stati classificati come produttori di carbapenemasi quando nello spettro comparivano i picchi del meropenem idrolizzato e dei relativi sali sodici (358 ± 1 Da, prodotto decarbossilato, 380 ± 1 Da, 402 ± 1 Da, e 424 ± 1 Da, sali sodici del prodotto decarbossilato). Quando gli spettri dei ceppi analizzati mostravano la presenza contemporanea dei picchi relativi al meropenem nella sua forma intatta e in quella idrolizzata è stato calcolato il valore del livello di attività carbapenemasi del ceppo mediante la seguente formula:

$$\log_{10} \frac{\sum \text{intensità picchi idrolizzati } A}{\sum \text{intensità picchi non idrolizzati } A} - \log_{10} \frac{\sum \text{intensità picchi idrolizzati } F}{\sum \text{intensità picchi non idrolizzati } F}$$

dove,

A: Ceppo in esame

F: Farmaco (meropenem)

I ceppi che presentavano un valore del livello di attività carbapenemasi $>0,3$ sono stati classificati come ceppi produttori di carbapenemasi, mentre quelli con valore $\leq 0,3$ sono stati classificati come ceppi non produttori di carbapenemasi.

*Estrazione dell'acido nucleico (DNA) e saggio di amplificazione
mediante reazione polimerasica a catena (PCR)*

Il ceppo di isolamento clinico *K. pneumoniae* N.1135 analizzato in questo studio risultato resistente ai carbapenemi ma non produttore di carbapenemasi ai test fenotipici, è stato sottoposto ad estrazione dell'acido nucleico mediante sistema automatizzato MAGNA Pure LC (Roche diagnostics, Italia), utilizzando il kit "MAGNA Pure LC DNA Isolation Kit III", previa preparazione di sospensioni batteriche a concentrazione di 5 McF in 3 ml di soluzione fisiologica (NaCl 0,85% Medium, bioMérieux) per l'analisi genotipica. A 100 μ l di tale sospensione sono stati aggiunti 130 μ l di Lysis/Binding Buffer allo scopo di rompere le cellule e provocare il rilascio degli acidi nucleici e 20 μ l di Proteinasi K allo scopo di digerire le proteine. La sospensione così ottenuta è stata incubata per 15 minuti a TA, poi per 10 minuti a 65°C ed, infine, per 10 minuti a 95°C. Trascorsa l'ultima incubazione i campioni pre-trattati sono stati centrifugati a 500 x g per 30 secondi e caricati nei pozzetti della apposita cartuccia inserita poi nello strumento. Qui il legame del DNA alla superficie delle particelle magnetiche di silice (MGP) viene favorito dalle condizioni ottenute grazie alla presenza dei sali caotropici, dall'isopropanolo e dalla elevata forza ionica del Lysis/Binding Buffer.

Successivamente le MGP con il DNA legato sono separate mediante un magnete dal resto del campione lisato e sottoposte a 3 lavaggi con 3 diversi Wash Buffer per eliminare definitivamente i residui batterici e gli inibitori della DNA polimerasi e per ridurre la concentrazione dei sali caotropici. Infine, il DNA purificato viene eluito dalle MGP e raccolto in una apposita cartuccia recuperabile dallo strumento. In ogni seduta è stato inserito un controllo negativo di estrazione utilizzando come bianco acqua bidistillata.

Il DNA estratto è stato sottoposto al saggio Real Time-PCR mediante chimica TaqMan in uso presso il nostro laboratorio (Centers for Disease Control and Prevention, 2011) utilizzando i primers KPCf, KPCr e 16S rRNA F e 16S rRNA R e le sonde specifiche "KPC probe" e "16S rRNA" probe riportati in Tabella 4.4.

Gene	Sonde e "Primers"	Sequenze
KPC	KPC-Probe (FAM)	5' FAM-TGATAACGCCGCCGCCAATTTGT-BHQ 3'
	KPC-F	5' GGCCGCCGTGCAATAC 3'
	KPC-R	5' GCCGCCCAACTCCTTCA 3'
16S rRNA	16S rRNA-Probe (cy5)	5' CY5-CACGAGCTGACGACAGCCATGCA-BHQ 3'
	16S rRNA F	5' TGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA 3'
	16S rRNA R	5' TGCGGGACTTAACCCAACA 5'

Tabella 4.4. Sequenze delle sonde e dei primer utilizzati nel saggio Real-Time PCR.

In particolare 2 µl di DNA sono stati aggiunti ad una miscela di 20 µl contenente i seguenti reagenti:

- 1) KPC mix: 0.5 µM primers KPC F e KPC R, 0.25 µM sonda KPC, 10 µl Master-Mix (TaqMan Universal Master Mix, Applied Biosystems, USA), portare a volume con H₂O;
- 2) 16S rRNA mix: 0.5 µM primers 16S rRNA F e 16S rRNA R, 0.25 µM sonda 16S rRNA, 10 µl Master-Mix (TaqMan Universal Master Mix, Applied Biosystems, USA), portare a volume con H₂O.

In ogni esperimento di Real-Time PCR sono stati inseriti i seguenti controlli: un controllo negativo di estrazione contenente solo acqua, un controllo negativo di Real-time PCR costituito dalla miscela di amplificazione priva di DNA, un controllo positivo per *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 1705) per l'amplificazione dei geni *bla_{KPC}* e 16S rDNA.

L'amplificazione, eseguita nello strumento Applied Biosystems 7000 analytic PCR system (SDS version 1.7) (Applied Biosystems) consisteva di uno step a 95°C per 3 minuti seguito da 40 cicli di 3 secondi a 95°C e 30 secondi a 60°C.

4.1.1.3 Risultati

Saggio di idrolisi del meropenem mediante MALDI-TOF MS: messa a punto del protocollo

Il primo passo è stato valutare il protocollo operativo fornito dalla ditta produttrice dello spettrometro di massa per il rilevamento di ceppi produttori di carbapenemasi attraverso la visualizzazione di picchi relativi alla molecola di antibiotico (meropenem) intatto o idrolizzato dalla presenza di tali enzimi all'interno dello spettro ottenuto.

L'analisi mediante MALDI-TOF MS della molecola di meropenem ha mostrato l'assenza sia dei picchi relativi all'antibiotico intatto (384 ± 1 Da) sia ai suoi sali sodici (406, 428 ± 1 Da) quando è stato utilizzato il protocollo suggerito dalla ditta produttrice. L'assenza di tali

picchi è stata anche riscontrata nonostante l'aumentato della concentrazione di meropenem (2,3, 5, 10, 23 mM).

La sostituzione dell'ammonio citrato con TRIS-HCl 20 mM pH 6.8 come tampone per risospendere l'antibiotico ha mostrato la presenza del picco relativo al meropenem (384 ± 1 Da) solo a concentrazione di 23 mM. Non sono stati rilevati i picchi relativi ai sali sodici dell'antibiotico ($406, 428 \pm 1$ Da). Nella stessa analisi sono stati riscontrati due picchi particolari: uno di peso molecolare pari a 379 ± 1 Da, riconducibile alla matrice HCCA e uno a 573 ± 1 Da di intensità direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antibiotico (Figura 4.5).

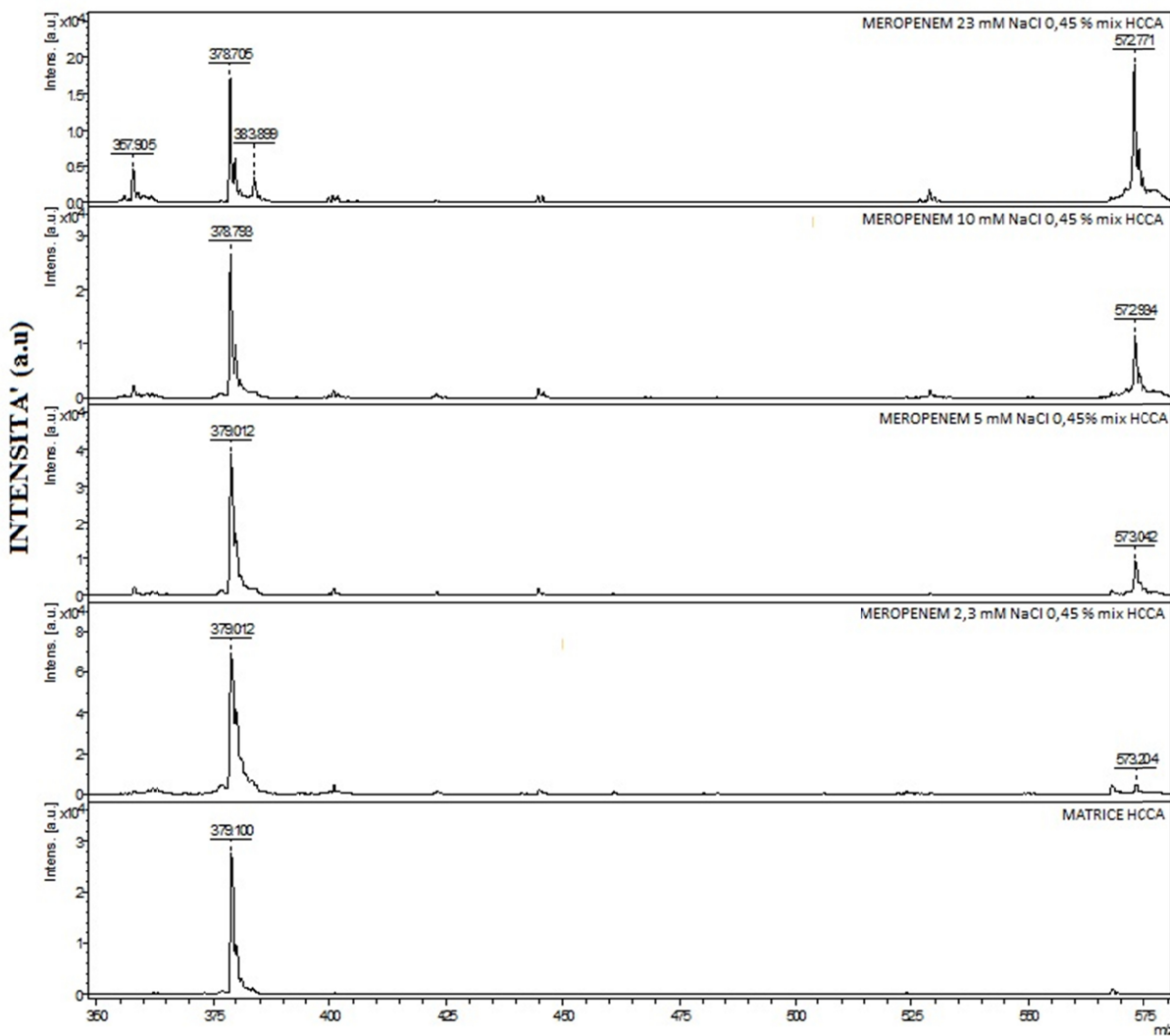


Figura 4.5. Risultati ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS del meropenem utilizzando il protocollo fornito dalla ditta produttrice dello spettrometro di massa.

La matrice HCCA è stata quindi sostituita con la matrice 2,5-DHB risospesa in OS-TA30. L'analisi degli spettri ottenuti analizzando diverse concentrazioni di meropenem (23, 10, 5,

2,3 mM) ha mostrato la presenza dei picchi relativi all'antibiotico intatto e dei suoi sali sodici ($384, 406, 428 \pm 1$ Da) solo a concentrazione pari a 23 mM e 10 mM (Figura 4.6).

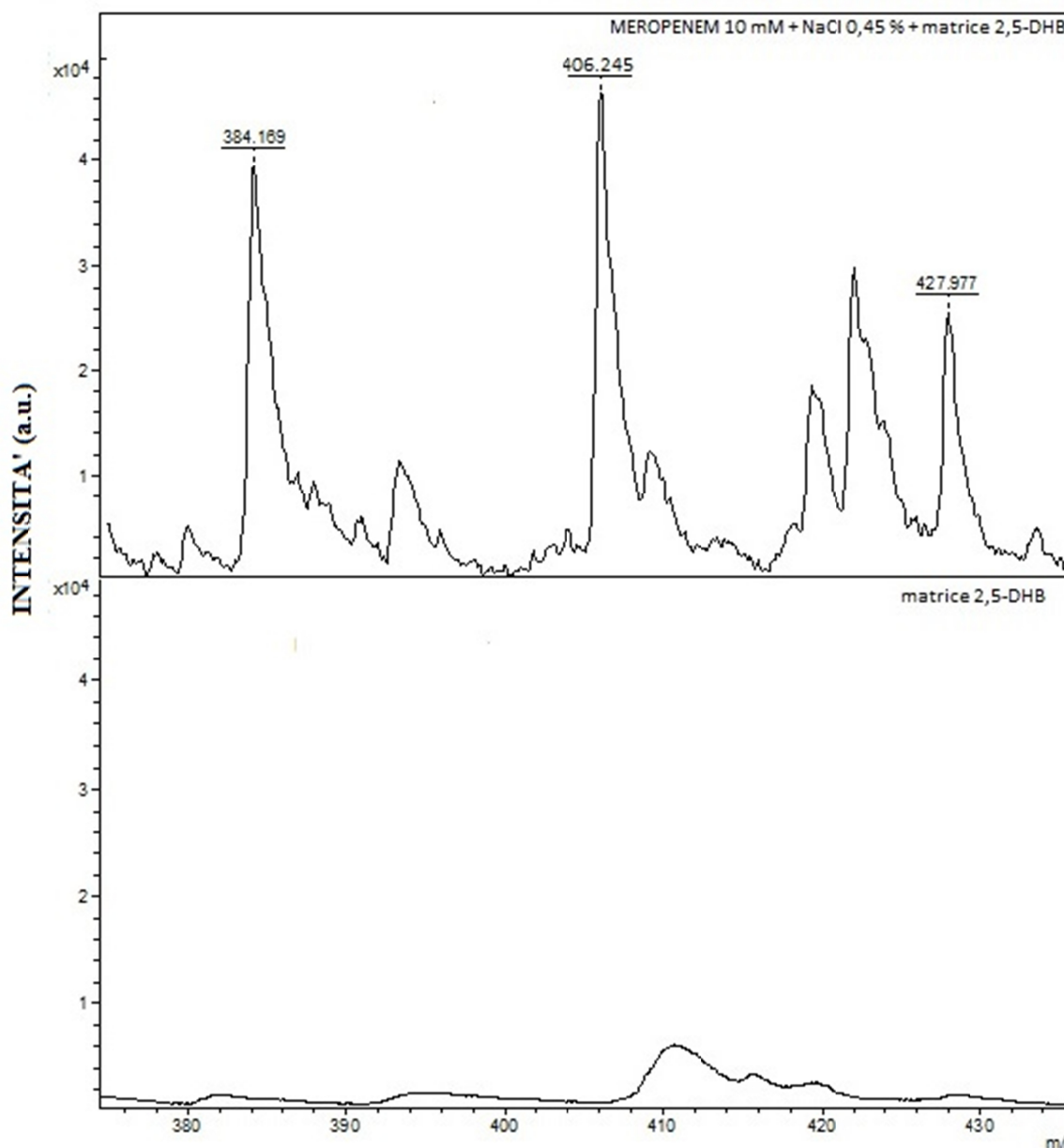


Figura 4.6. Risultati ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS del meropenem utilizzando il protocollo messo appunto in questo studio.

Analisi dei ceppi di riferimento mediante saggio di idrolisi del meropenem

Utilizzando il protocollo diagnostico messo a punto come sopra descritto che ha previsto la sostituzione del tampone di risospensione dell'antibiotico, l'aumento della concentrazione di meropenem a 10 mM e la sostituzione della matrice, l'analisi mediante MALDI-TOF MS del meropenem ha prodotto uno spettro in cui sono stati rilevati i picchi corrispondenti al

peso molecolare dell'antibiotico (384 ± 1 Da) e dei suoi sali sodici (406 ± 1 e 428 ± 1 Da) (Tabella 4.5, Figura 4.6). L'analisi degli spettri ottenuti dai ceppi di riferimento utilizzati in questo studio (Figura 4.7) ha mostrato la presenza dei picchi relativi all'antibiotico non idrolizzato o relativi alla sua idrolisi secondo il risultato atteso (Tabella 4.5). La deviazione standard (± 1 Da) della lettura dello spettrometro di massa riscontrata nelle misure multiple rientra nell'errore previsto dal potere risolutivo dello strumento (300 parti per milione).

Antibiotico	Identificazione Fenotipica							
	Test di Hodge modificato	Saggio di sinergia	Analisi mediante MALDI-TOF MS*					
			380	384	402	406	424	428
Meropenem	/	/	-	+	-	+	-	+
Ceppi di riferimento								
<i>K. Pneumoniae</i> ATCC 1705	Produttore	Classe A	+	-	+	-	+	-
<i>K. Pneumoniae</i> ATCC 1706	Non Produttore	Negativo	-	+	-	+	-	+
<i>K. Pneumoniae</i> ATCC 2416	Produttore	Classe B	+	-	+	-	+	-

*: La massa dei picchi (m/z) rilevati mediante analisi MALDI-TOF MS sono espressi in Dalton con deviazione standard di ± 1 Da.

/: non applicabile;

+ : presenza del picco;

- : assenza del picco.

Tabella 4.5. Analisi mediante saggi fenotipici e genotipici dei ceppi di riferimento e dell'antibiotico meropenem.

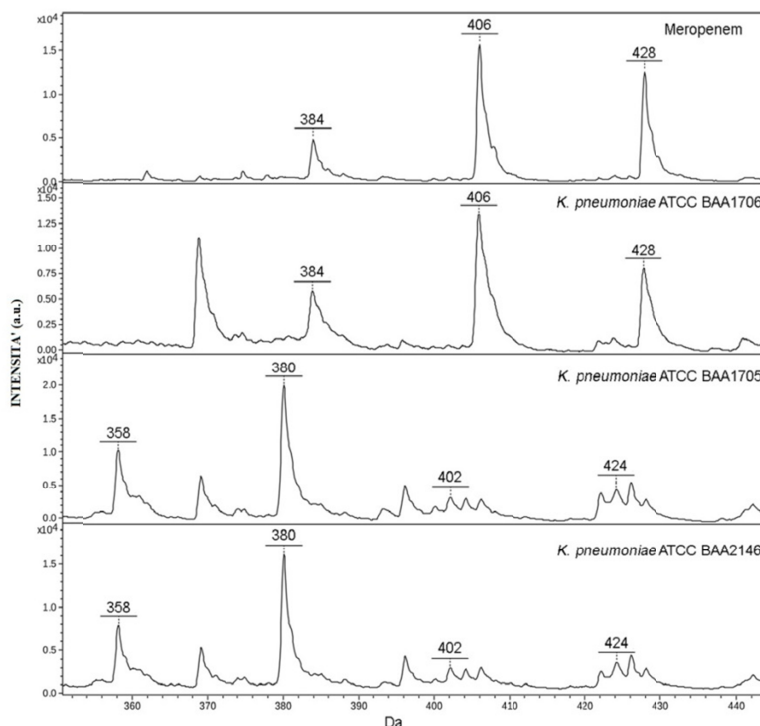


Figura 4.7. Spettri dei ceppi di riferimento ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS.

Analisi dei ceppi di isolamento clinico mediante saggio di idrolisi del meropenem

Per 989 dei 1185 ceppi di *Enterobacteriaceae* di isolamento clinico inclusi in questo studio, l'analisi mediante MALDI-TOF MS ha mostrato la presenza dei picchi relativi all'idrolisi dell'antibiotico: 358, 380, 402 e 424 ± 1 Da. Per 988 di questi 989 ceppi è stata riscontrata concordanza con i saggi fenotipici (Saggio di Hodge modificato) (Tabella 4.6.) e con i saggi genotipici (dati non mostrati) previsti dall'algoritmo diagnostico in uso presso il nostro laboratorio. Per il restante ceppo di isolamento clinico (*Klebsiella pneumoniae* N.1135) l'analisi mediante MALDI-TOF MS ha mostrato la presenza dei picchi relativi sia all'antibiotico non idrolizzato che quelli relativi all'antibiotico idrolizzato (Figura 4.8 A). Per questo ceppo risultato resistente ai tre carbapenemi (Meropenem, Imipenem, Ertapenem) mediante saggio di sensibilità *in vitro* ai farmaci ma non produttore di carbapenemasi mediante saggio di Hodge modificato, l'analisi genotipica ha mostrato la presenza del gene KPC (Figura 4.8 B). Inoltre, per questo ceppo il valore del livello di attività carbapenemasi è risultato >0.3 (ceppo produttori di carbapenemasi)

Per 13 dei 1185 ceppi di *Enterobacteriaceae* di isolamento clinico, risultati resistenti ai tre carbapenemi (Meropenem, Imipenem, Ertapenem) mediante saggio di sensibilità *in vitro* ai farmaci ma non produttori di carbapenemasi mediante saggio di Hodge modificato l'analisi mediante MALDI-TOF MS ha mostrato la presenza dei picchi relativi al meropenem intatto: 384, 406 e 428 ± 1 Da (Tabella 4.6).

Per 183 dei 1185 ceppi di *Enterobacteriaceae* di isolamento clinico, l'analisi mediante MALDI-TOF MS ha mostrato la presenza nello stesso spettro sia dei picchi del farmaco intatto e quelli del farmaco idrolizzato. Per questi ceppi il valore del livello di attività carbapenemasi è risultato < 0.3 (ceppi non produttori di carbapenemasi).

Per 9 dei 34 ceppi di non-*Enterobacteriaceae* gli spettri ottenuti dall'analisi mediante MALDI-TOF MS mostravano la presenza dei picchi riferibili all'antibiotico intatto, mentre per i restanti 25 (analizzati in presenza di meropenem degradato) gli spettri mostravano la co-esistenza dei picchi del farmaco intatto e quelli del farmaco idrolizzato. Per questi ceppi il valore del livello di attività carbapenemasi è risultato < 0.3 (ceppi non produttori di carbapenemasi).

Microorganismi (No.)	No.	SAGGI FENOTIPICI		
		Test di Hodge modificato	MALDI-TOF MS	Test di Sinergia
<i>Enterobacteriaceae</i> (1185)				
<i>C. freundii</i> (17)	12	CP	CP	Classe B
	5	N.E.	NON-CP	N.E.
	6	CP	CP	Classe A
<i>E. aerogenes</i> (11)	2	CP	CP	Classe B
	1	NON-CP	NON-CP	Negativo
	2	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>E. cloacae</i> (36)	17	CP	CP	Classe B
	14	N.E.	NON-CP	N.E.
	7	CP	CP	Classe A
<i>E. coli</i> (90)	6	CP	CP	Classe B
	3	NON-CP	NON-CP	Negativo
	74	N.E.	NON-CP	N.E.
	1	CP	CP	Classe B
<i>K. oxytoca</i> (16)	1	NON-CP	NON-CP	N.E.
	14	N.E.	NON-CP	N.E.
	602	CP	CP	Classe A
<i>K. pneumoniae</i> (985)	332	CP	CP	Classe B
	1	CP	CP	Negativo
	1	NON-CP	CP	Negativo
	4	NON-CP	NON-CP	Negativo
	45	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>M. morgani</i> (6)	1	CP	CP	Classe A
	5	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>S. marcescens</i> (8)	1	CP	CP	Classe B
	7	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>C. koseri</i> (5)	5	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>P. mirabilis</i> (11)	11	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>P. stuartii</i> (1)	1	N.E.	NON-CP	N.E.
non- <i>Enterobacteriaceae</i> (34)				
<i>P. aeruginosa</i> (26)	4	CP	CP	N.E.
	4	NON-CP	NON-CP	N.E.
	18	N.E.	NON-CP	N.E.
<i>A. baumannii</i> (8)	5	CP	CP	N.E.
	3	N.E.	NON-CP	N.E.
Totale	1219			

CP: Produttore di Carbapenemasi; NON-CP: non produttore di carbapenemasi.

Tabella 4.6. Risultati ottenuti mediante saggi fenotipici.

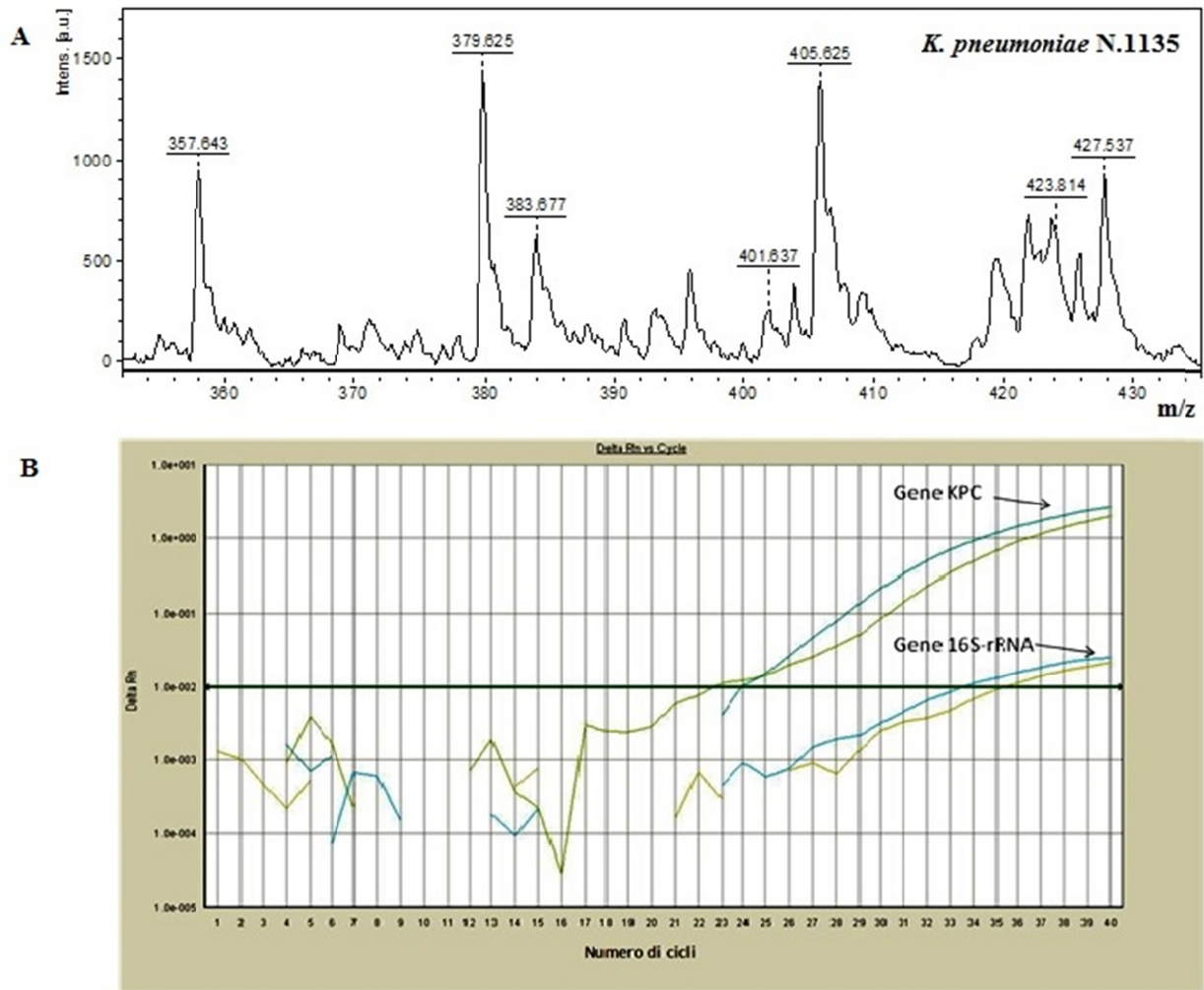


Figura 4.8. A) Spettro ottenuto dall'analisi del ceppo di isolamento clinico *K. pneumoniae* N° 1135. **B)** Curva di amplificazione del gene KPC e del gene 16S-rRNA ottenuta per il ceppo di isolamento clinico N°1135.

Saggio di idrolisi del meropenem a diversi tempi di incubazione

L'analisi a diversi tempi d'incubazione (30 minuti, 1, 2, 3 e 4 ore) dei ceppi di riferimento *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 e *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 (produttori di carbapenemasi di tipo KPC e di tipo NDM, rispettivamente) e del ceppo di isolamento clinico *K. pneumoniae* N.1381 (produttore di carbapenemasi di tipo VIM) ha mostrato idrolisi dell'antibiotico dopo 30 minuti di incubazione per il ceppo *K. pneumoniae* produttore di carbapenemasi di tipo KPC e dopo 1 ora per i ceppi *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi di tipo NDM e VIM (Figura 4.9 A,B,C).

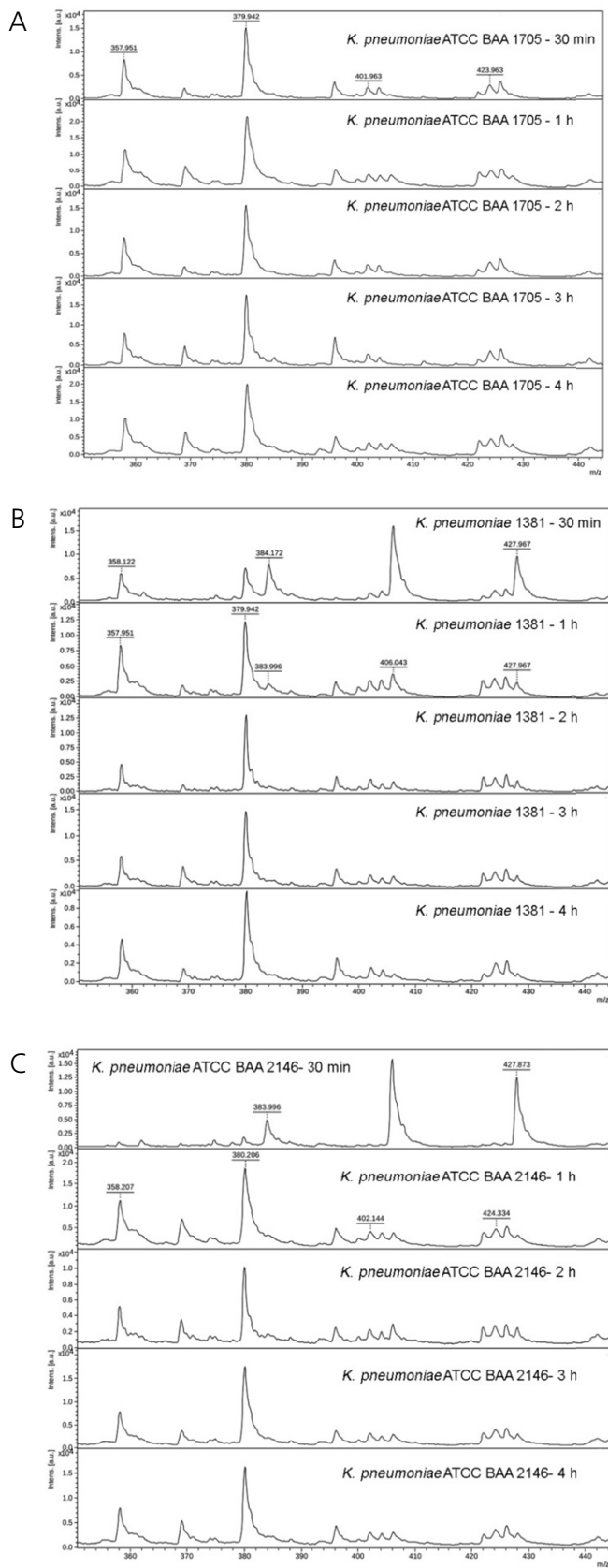


Figura 4.9. Analisi dei ceppi di riferimento a diversi tempi d'incubazione. **A)** Ceppo di riferimento *K. pneumoniae* ATCC ceppo BAA-1705 Classe A (KPC). **B)** Ceppo di isolamento clinico *K. pneumoniae* N.1381 Classe B (VIM). **C)** Ceppo di riferimento *K. pneumoniae* ATCC ceppo BAA-2146 Classe B (NDM).

4.1.4 Discussione

La versatilità e l'ampio spettro delle possibili applicazioni nella diagnosi microbiologica della tecnologia MALDI-TOF MS hanno permesso negli ultimi anni di aprire la strada verso lo studio dei meccanismi di resistenza agli antibiotici in diverse classi di microrganismi (Hrabák et al., 2013; Kostrzewa et al., 2013).

Questo capitolo è focalizzato sullo studio delle resistenze in batteri Gram-negativi dovute all'azione di carbapenemasi. In particolare, è stata valutata l'applicazione della tecnologia MALDI-TOF MS come saggio fenotipico rapido per la determinazione di ceppi produttori di carbapenemasi. Questo scopo è stato raggiunto grazie alla messa a punto di un protocollo operativo apportando modifiche a quello fornito dalla ditta produttrice dello spettrometro di massa.

Con l'utilizzo di tale protocollo, che prevedeva l'ammonio citrato come soluzione di risospensione del meropenem, l'HCCA come matrice e una concentrazione dell'antibiotico pari a 1 mM, non è stato possibile riscontrare i picchi relativi al farmaco intatto ed ai suoi sali sodici. In particolare è stata rilevata la presenza di due picchi non attesi riconducibili uno alla matrice HCCA (379 ± 1 Da) ed uno alla probabile interazione matrice HCCA-farmaco (573 ± 1 Da); il picco pari a 573 ± 1 Da, infatti, potrebbe indicare un prodotto aspecifico di reazione dovuto all'interazione del farmaco con la matrice poiché l'intensità risulta direttamente proporzionale alla concentrazione del farmaco stesso. Questo dato è supportato dal fatto che gli antibiotici sono in genere molecole di piccole dimensioni il che complica la loro analisi mediante MALDI-TOF MS a causa delle interazioni con la matrice e con l'alto livello di rumore di fondo. Tali problematiche possono essere superate utilizzando diverse matrici e modificando i protocolli per la preparazione dei campioni (Hrabák et al., 2013). In questo caso, attraverso la sostituzione dell'ammonio citrato con TRIS-HCl 20mM pH 6,8 come tampone per risospendere l'antibiotico, la sostituzione della matrice HCCA con la matrice 2,5-DHB e l'aumento della concentrazione del farmaco (10 mM) unitamente all'utilizzo di un nuovo protocollo di partenza estrapolato da uno studio precedentemente pubblicato (Wang et al., 2013) e da noi modificato, l'analisi mediante MALDI-TOF MS della molecola del meropenem ha permesso di riscontrare i picchi relativi al farmaco intatto e ai relativi sali sodici.

Grazie al protocollo messo a punto in questo studio, il saggio di idrolisi del meropenem mediante MALDI-TOF MS ha dimostrato la presenza indiretta di carbapenemasi in ceppi di riferimento.

Dall'analisi estesa ai 1219 (1185 *Enterobacteriaceae* e 34 non-*Enterobacteriaceae*) ceppi di isolamento clinico selezionati tra quelli pervenuti in un periodo di 4,5 anni è emerso che 998 (81,9%) erano produttori di carbapenemasi (989 *Enterobacteriaceae* e 9 non-*Enterobacteriaceae*) e 221 (18,1%) non produttori di carbapenemasi (183 *Enterobacteriaceae* e 25 non-*Enterobacteriaceae*). Nessuna interferenza è stata riscontrata per i ceppi di *Enterobacteriaceae* variamente resistenti ai tre carbapenemi ma risultati non produttori di carbapenemasi mediante i saggi fenotipici comunemente impiegati nella diagnostica routinaria di laboratorio: nessuna idrolisi del farmaco è stata infatti osservata al saggio di idrolisi mediante MALDI-TOF MS. In un solo caso (ceppo di *K. pneumoniae* N°1135) è stato ottenuto un profilo anomalo in quanto presenti sia i picchi del farmaco intatto che quelli del farmaco idrolizzato. Per questo ceppo resistente ai tre carbapenemi saggiati, negativo ai saggi fenotipici per la presenza di carbapenemasi, è stata dimostrata la presenza del gene KPC mediante Real-Time PCR. Per questo ceppo si può ipotizzare la presenza di mutazioni a carico del gene *bla*_{KPC} che sebbene non interferiscano con il suo rilevamento mediante PCR (Real-Time PCR positiva), condizionano l'attività della proteina prodotta (Saggio di Hodge e di sinergia negativi) riducendone la funzionalità come dimostrato, mediante analisi MALDI-TOF MS, dalla presenza dei picchi relativi sia all'idrolisi del farmaco sia dei picchi relativi al farmaco intatto. Questa ipotesi dovrebbe essere confermata mediante sequenziamento del gene *bla*_{KPC} e successiva analisi strutturale della sequenza amminoacidica deducibile.

Un altro risultato interessante riguarda la possibilità di applicare il saggio di idrolisi MALDI-TOF MS già dopo solo 30 minuti di incubazione della sospensione batterica a contatto con il meropenem per i ceppi produttori di carbapenemasi di tipo KPC e dopo solo 1 ora per i ceppi produttori di carbapenemasi di tipo VIM e NDM riducendo notevolmente i tempi di esecuzione dell'indagine rispetto ai saggi convenzionali. Solo per i ceppi di *A. baumannii*, come suggerito da dati riportati in letteratura e come osservato nella nostra esperienza (Kempf et al., 2012; Lee et al., 2013) il tempo di incubazione è stato esteso a 4 ore in quanto dopo due ore di incubazione 4 degli 8 ceppi analizzati sarebbero risultati falsi-negativi al saggio di idrolisi del meropenem mediante MALDI-TOF MS (dati non mostrati).

L'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF MS per la verifica dell'avvenuta idrolisi del meropenem è risultato un saggio fenotipico indiretto in grado di distinguere, al pari del test di Hodge modificato impiegato comunemente nella routine diagnostica in microbiologia, un ceppo produttore di carbapenemasi da un ceppo non produttore. Il saggio fenotipico mediante MALDI-TOF MS, inoltre, permette di ottenere un risultato indicativo della produzione delle carbapenemasi per le *Enterobacteriaceae* in tempi ridotti (entro 1 ora dall'inizio dell'indagine) rispetto al test di Hodge modificato che necessita di un tempo di analisi di 18-24 ore ed un tempo complessivo di refertazione di 48 ore.

L'applicazione della spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF si è rivelata una valida e rapida alternativa ai sistemi convenzionali per la rilevazione di ceppi produttori e non produttori di carbapenemasi sia per scopi diagnostici che per la sorveglianza epidemiologica. L'impiego del MALDI-TOF MS ha mostrato, infatti, diversi vantaggi rispetto ai metodi convenzionali impiegati nella routine diagnostica di laboratorio i quali richiedono personale esperto per l'interpretazione del risultato e lunghi tempi di esecuzione e di conseguenza di refertazione. La semplicità e la facilità richieste per la preparazione dei campioni e l'immediata acquisizione dei dati rendono questa tecnica un metodo accurato e rapido. Inoltre, il metodo risulta conveniente dal punto di vista economico, con un costo totale stimato di 2 euro per ceppo analizzato. Tutte queste considerazioni pongono questa metodologia in posizione centrale in ambito microbiologico anche nel caso del rilevamento di ceppi produttori di carbapenemasi.

Nel campo della ricerca, la resistenza agli antibiotici è focalizzata principalmente sull'individuazione di specifici geni e sul confronto degli isolati mediante tecniche di biologia molecolare (Hrabák et al., 2013). Con l'eccezione del sequenziamento dell'intero genoma, che non è ancora disponibile per l'uso routinario, tutte le tecniche di genetica molecolare sono limitate alla rilevazione di geni di resistenza noti. Tuttavia, studi di proteomica forniscono i dati relativi all'espressione genetica non focalizzandosi su un singolo gene (Hrabák et al., 2013). Come dimostrato da numerosi studi, la spettrometria di massa MALDI-TOF può rilevare enzimi responsabili della modificazioni di molecole antibiotiche, che non è possibile rilevare con le tecniche genetiche; inoltre questa tecnologia potrebbe integrare le tecniche di genetica molecolare nei laboratori di ricerca, consentendo l'analisi del comportamento dei ceppi saggiati, dell'espressione di proteine di interesse e di modificazioni post-traduzionali (Kostrzewa et al., 2013). I risultati presentati

in questo studio dimostrano che la spettrometria di massa MALDI-TOF sta diventando uno strumento importante anche per la rilevazione di antibiotico-resistenze e apre nuove strade sia nell'ambito della microbiologia clinica che sperimentale.

Bibliografia

1. Aebersold R e Goodlett D. Mass spectrometry in proteomics (2001) *Chemical Reviews* 101: 269-295.
2. Agenzia sanitaria e sociale regionale, Regione Emilia-Romagna. Indicazioni pratiche e protocolli operativi per la diagnosi, la sorveglianza e il controllo degli enterobatteri produttori di carbapenemasi nelle strutture sanitarie e socio-sanitarie (2013).
3. Aguero-Rosenfeld ME, Wang G, Schwartz I, Wormser GP. Diagnosis of Lyme Borreliosis (2005) *Clinical Microbiology Reviews* 18: 484-509.
4. Alai M, Demirev P, Fenselau C, Cotter RJ. Glutathione as matrix for plasma desorption mass spectrometry of large peptides (1986) *Analytical Chemistry* 58: 1303-1307.
5. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, Mellado E, Quesne G, Lacroix C, Amara A, Berche P, Nassif X, Bougnoux ME. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species (2010) *Clinical Microbiology and Infection* 17:750–755.
6. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecolare della cellula* (2009) Quinta Edizione. Zanichelli Editore.
7. Ali IKM, Solaymani-Mohammadi S, Akhter J, Roy S, Gorrini C, Calderaro A, Parker SK, Haque R, Petri WA Jr.2, Clark CG. Tissue Invasion by *Entamoeba histolytica*: evidence of genetic selection and/or DNA reorganization events in organ tropism (2008) *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2(4):e219.
8. Ambler RP. The structure of beta-lactamases (1980) *Philosophical transaction of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 289:321-331.
9. Anderson N. G., Anderson N. L. The human protein index project and the molecular pathology database (1982) *Medical laboratory* 11:75-94.
10. Anderson NL, Anderson NG. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words (1998) *Electrophoresis* 19(11):1853-1861.
11. Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry (1975) *Analytical Chemistry* 47:219–225.
12. Bandea CI, Joseph K, Secor EW, Jones LA, Igietseme JU, Sautter RL, Hammerschlag MR, Fajman NN, Girardet RG, Black CM. Development of PCR assays for detection of *Trichomonas vaginalis* in urine specimens (2013) *Journal of Clinical Microbiology* 51(4): 1298-300.

13. Barber M, Bordoli RS, Sedgwick RD, Tyler AN. Fast atom bombardment mass spectrometry of cobalamines (1981) *Biomedical. Mass Spectrometry* 8: 492-495.
14. Barbour A.G. (1984): Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. *Yale J. Biol. Med.*, 57:521–525.
15. Barbour AG, Hayes SF. Biology of *Borrelia* species (1986) *Microbiological Reviews* 50: 381-400.
16. Barkin RM, Guckian JC, Glosser J.W. Infection by *Leptospira ballum*: a laboratory-associated case (1974) *Southern Medical Journal* 67:155-156.
17. Beavis RC, Chaudrhary T, Chait BT. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass spectrometry (1992) *Organic Mass Spectrometry* 156-158.
18. Beckey HD. Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility (1969) *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics* 2:500-503.
19. Bendinelli M, Chezzi C, Dettori G, Manca N, Morace G, Polonelli L, Tufano MA. *Microbiologia medica- biologia, azione patogena, laboratorio* (2006) Cap. 20, vol. *Batteriologia*, Monduzzi Editore.
20. Benninghoven A, Sichter mann WK. Detection, identification and structural investigation of biologically important compounds by secondary ion mass spectrometry (1978) *Applied Physics* 50(8):1180-1184.
21. Bergstrom S, Barbour AG, Garon CF, Hindersson P, Saint Girons I, Girons I, Schwan TG. Genetics of *Borrelia burgdorferi*. (1991) *Scandinavian Journal of Infectious Disease Supplement* 77:102–107.
22. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification (2010) *Clinical Microbiology and Infection* 16:1614–1619.
23. 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 rDNA gene sequencing for identification of difficult to identify bacterial strains (2011) *Journal of Clinical Microbiology* 49(2):693-696.
24. Blessmann J, Buss H, Nu PA, Dinh BT, Ngo QT, Van AL, et al. Real-time PCR for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in fecal samples (2002) *Journal of Clinical Microbiology* 40:4413–4417.

25. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa JJ. Rapid and simple method for purification of nucleic acids (1990) *Journal of Clinical Microbiology* 28(3):495-503.
26. Borazjani RN, Timothy JL, Doland GA. Comparison of 5.8S and ITS2 rDNA RFLP patterns among isolates of *Acremonium obclavatum*, *A. kiliense*, and *A. strictum* from diverse sources (1998) *Current Microbiology* 36:70–74.
27. Brenner D, Kaufmann AF, Sulzer KR, Steigerwalt AG, Rogers FC, Weyant RS. Further determination of DNA relatedness between serogroups and serovars in the family *Leptospiraceae* with a proposal for *Leptospira alexanderi* sp. Nov. And four new *Leptospira* genomospecies (1999) *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:839-858.
28. Burckhardt I, Zimmermann S. Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours (2011) *Journal of Clinical Microbiology* 49(9):3321.
29. Burgdorfer W, Lane RS, Barbour AG, Gresbrink RA, Anderson JR. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi* (1985) *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34: 925-930.
30. Burioni R, Grillo R, Magarò M, Dettori G. Lyme disease in Italy: Isolation of *Borrelia burgdorferi* from a patient. *European Journal of Epidemiology* (1988) 4: 506-510.
31. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (2010) *Current Opinion in Microbiology* 13:558-564.
32. Buynak JD. The discovery and development of modified penicillin- and cephalosporin-derived beta-lactamase inhibitors (2004) *Current Medicinal Chemistry* 11:1951-1964.
33. Calderaro A, Gorrini C, Bommezzadri S, Piccolo G, Dettori G, Chezzi C. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: comparison of two PCR assays for diagnosis in non-endemic setting (2006) *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100: 450–457.
34. Calderaro A, Montecchini S, Gorrini C, Piccolo G, Chezzi C, Dettori G. Presence of anti-*Borrelia burgdorferi* antibodies and *Borrelia burgdorferi sensu lato* DNA in samples of subjects in an area of the Northern Italy in the period 2002–2008 (2010) *Diagnostic and Microbiology and Infectious Diseases* 70:455–460.

35. Calderaro A.– Parassitologia (2012) In: Microbiologia medica, gli agenti infettivi dell'uomo: biologia, azione patogena, laboratorio. Monduzzi Editoriale.
36. Calderaro A, Piccolo G, Montecchini S, Buttrini M, Gorrini C, Rossi S, Arcangeletti MC, De Conto F, Medici MC, Chezzi C. MALDI-TOF MS analysis of human and animal *Brachyspira* species and benefits of database extension (2013a) Journal of Proteomics 78: 273-280.
37. Calderaro A, Motta F, Larini S, Gorrini C, Martinelli M, Piscopo G, Benecchi M, Arcangeletti MC, Medici MC, De Conto F. Two rare cases of *Acremonium* acute endophthalmitis after cataract surgery in a tertiary care hospital (2013b) New Microbiologica 36: 427–431.
38. Calderaro A, Gorrini C, Piccolo G, Montecchini S, Buttrini M, Rossi S, Piergianni M, Arcangeletti MC, De Conto F, Chezzi C, Medici MC. Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database (2014a) PLoS One 9(2): e88895.
39. Calderaro A, Piccolo G, Gorrini C, Montecchini S, Buttrini M, Rossi S, Piergianni M, De Conto F, Arcangeletti MC, Chezzi C, Medici MC *Leptospira* species and serovars identified by MALDI-TOF mass spectrometry after database implementation (2014b) BMC Research Notes 7:330.
40. Calderaro A, Motta F, Montecchini S, Gorrini C, Piccolo G, Piergianni M, Buttrini M, Medici MC, Arcangeletti MC, Chezzi C, De Conto F. Identification of *Dermatophyte* Species after Implementation of the In-House MALDI-TOF MS Database (2014c) International Journal of Molecular Sciences 15:16012-16024.
41. Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F, Germini D, Medici MC, Chezzi C, De Conto F. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification (2014d) Scientific Reports 4:6803.
42. Calderaro A, Piergianni M, Buttrini M, Montecchini S, Piccolo G, Gorrini C, Rossi S, Chezzi C, Arcangeletti MC, Medici MC, De Conto F. MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* (2015) PLoS One 10(4): e0122448.
43. Carbonnelle E, Beretti JL, Cottyn S, Quesne G, Berche P, Nassif X, Ferroni A. Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (2007) Journal of Clinical Microbiology 45:2156–2161.

44. Carvalhaes CG, Cayo R, Gales AC. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *Klebsiella Pneumoniae* in the intensive care unit: a real challenge to physicians, scientific community, and society (2013) *Shock* 39(7):32-37.
45. Cassagne C, Pratlong F, Jeddi F, Benikhlef R, Aoun K, Normand AC, Faraut F, Bastien P, Piarroux R. Identification of *Leishmania* at the species level with matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (2013) *Clinical Microbiology and Infection* 20(6):551-7.
46. Centers of Disease Control and Prevention. Outbreak of Leptospirosis among White-Water Rafters, Costa Rica, 1996. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* (1997) 46(25):577-579.
47. Centers for Disease Control and Prevention. Disponibile on-line: <http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/KPC-NDM-protocol-2011.pdf>.
48. Chaurand P, Scharz S.A, Billheimer D, Xu BJ, Crecelius A, Caprioli R.M. Integrating histology and imaging mass spectrometry (2004) *Analytical Chemistry* 76:1145-1155.
49. Cinco M, Padovan D, Murgia R, Poldini L, Frusteri L, van de Pol I, Verbeek-De Kruif N, Rijpkema S, Maroli M. Rate of infection of *Ixodes ricinus* ticks with *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii* and group VS116 in an endemic focus of Lyme disease in Italy (1998) *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease* 17:90-94.
50. Clark CG e Diamond LS. Methods for cultivation of luminal parasitic protists of clinical importance (2002) *Clinical Microbiology Reviews* 15(3):329-41.
51. Crawford NM, Guo FQ. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions (2005) *Trends in Plant Science* 4:195-200.
52. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology (2012) *FEMS Microbiology Reviews* 36 :380–407.
53. De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (2012) *Clinical Microbiology and Infection* 18(5): 475-284.
54. De Hoogh GS, Guarro J, Gene J, Figueras MJ *Atlas of clinical fungi* (2000) 2nd edn. Utrecht, NL: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

55. Del Rio LA, Corpas FJ, Sandalio LM, Palma JM, Barroso JB. Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide (2003) *IUBMB Life Review* 55(2):71-81
56. Demirev PA, Ho YP, Ryzhov V, Fenselau C. Microorganism identification by mass spectrometry and protein database searches (1999) *Analytical Chemistry* 71:2732–2738.
57. Dettori G, Grillo R, Cattani P, Calderaro A, Chezzi C. Milner J, Truelove K, Sellwood R. Comparative study of the enzyme activities of *Borrelia burgdorferi* and other non-intestinal and intestinal spirochetes (1995) *Microbiology* 18:13-26.
58. Diamond LS. The establishment of various trichomonads of animals and man in axenic cultures (1957) *Journal of Parasitology* 43(4):488-490.
59. Diamond LS, Clark CG. A redescription of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903 (emended Walker, 1911), separating it from *Entamoeba dispar* Brumpt, 1925 (1993) *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40:340–344.
60. Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B. Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (2008) *Applied and Environmental Microbiology* 74:7767–7778.
61. Djelouadji Z, Roux V, Raoult D, Kodjo A, Drancourt M. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms (2012) *Veterinary Microbiology* 158:142-146.
62. El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended Spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic element responsible for antibiotics resistance in Gram-negative Bacteria (2013) *Critical Reviews in Microbiology* 39(2):113-122.
63. English RD, Warscheid B, Fenselau C, Cotter RJ. Bacillus spore identification via proteolytic peptide mapping with a miniaturized MALDI TOF mass spectrometer (2003) *Analytical Chemistry* 75(24):6886-6893.
64. EUCAST, European Committee on antimicrobial susceptibility testing. Eucast guidelines for detection of resistance mechanism and specific resistances of clinical an/or epidemiological importance (2012) *EUCAST*:4-10.
65. Franz JK, Krause A. Lyme disease (Lyme borreliosis) (2003) *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* 17:241–264.
66. Frickman H, Masanta WO, Zautner AE. Emerging rapid resistance testing methods for clinical microbiology laboratories and their potential impact on patient management (2014) *BioMed Research International* 19.

67. Gräser Y, Czaika V, Ohst T. Diagnostic PCR of dermatophytes – an overview (2012) *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 10:721-726.
68. Grossert JS. A retrospective view of mass spectrometry and natural products – sixty years of progress, with a focus contributions by R. G. Cooks (2001) *International Journal of Mass Spectrometry* 212:65-79.
69. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M Epidemiological trends in skin mycoses worldwide (2008) *Mycoses* 51(4):2–15.
70. Hegazy MM, El-Tantawy NL, Soliman MM, El-Sadeek ES, El-Nagar HS. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of *Trichomoniasis vaginalis* (2012) *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 74:49-53.
71. Heredia RD, Fonseca JA, López MC. *Entamoeba moshkovskii* perspectives of a new agent to be considered in the diagnosis of amebiasis (2012) *Acta Tropica* 123:139–145.
72. Hemming A. Penicillin (1944) *Journal of the National Medical Association* 36(2):37-42.
73. Herbert B. Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis (1999) *Electrophoresis* 20(4-5):660-663.
74. Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization (1990) *Methods in Enzymology* 193:280-295.
75. Hirt RP, Noel JC, Sicheritz-Ponten T, Tachezy J, Fiori PL. *Trichomonas vaginalis* surface proteins: a view from the genome (2007). *Trends in parasitology* 23(11):540-547.
76. Hirt RP, Sherrard J. *Trichomonas vaginalis* origins, molecular pathobiology and clinical considerations (2015) *Current Opinion in Infectious Diseases* 28:72-79.
77. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ & Lay JO Jr. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry (1996) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10:1227–1232.
78. Hrabák J, Chudáčková E, Walcová R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI) Mass Spectrometry for the detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis (2013) *Clinical Microbiology Reviews* 26(1):103-114.

79. Hrabák J, Papagiannitsis CC, Študentová V, Jakubu V, Fridrichová M, Zemlickova H. Czech Participants of European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011 (2013b) Euro Surveillance 18(45):20626.
80. Hrabák J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (2011a) Journal of Clinical Microbiology 49:3222-3227.
81. Hrabák J, Chudáčková E, Walcová R. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis (2013) Clinical Microbiology Reviews 26:103-114.
82. Istituto superiore di sanità Sorveglianza e controllo delle infezioni da batteri produttori di carbapenemasi (CPE) (2012).
83. Jacoby GA. AmpC β -Lactamases (2009) Clinical Microbiology Reviews 22(1):161-182.
84. James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G. Protein identification in DNA databases by peptide mass fingerprinting (1994) Protein Science 3(8):1347-1350.
85. Jensen GS, Ginsberg DI, Drapeau C. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator (2001) Journal of the American Nutraceutical Association 3:24-30.
86. Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry (2004) Current Opinion in Chemical Biology 8(1): 33-41.
87. Jonsson GGP, Hedin AB, Håkansson PL, Sundqvist BUR, Säve BGS, Nielsen PF, Roepstorff P, Johansson KE, Kamensky I, Lindberg SL. Plasma desorption mass spectrometry of peptides and proteins absorbed on nitrocellulose (1986) Analytical Chemistry 58:1084-1087.
88. Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Müller EC, Sokolowska-Köhler W, Grabher G, Stöffler G. Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases (1999) Electrophoresis 20(10):2100-2110.
89. Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins (1995) Science 270(5235):369-370.

90. Karas M, Bahr U, Ingendoh A, Nordhoff E. Matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry using 355 nm radiation (1990) *Analytical Chemica Acta* 241:175-185.
91. Karas M, Hillenkanp F. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight an experience (1988) *Analytical Chemistry* 60:2299-2301.
92. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, Mesli E, Touati A, Rolain JM. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31676.
93. Klose J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals (1975) *Humangenetik Journal* 26(3):231-243.
94. Ko Al, Goarant C, Picardeau M. *Leptospira*: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen (2009) *Nature Reviews Microbiology* 7:736-747.
95. Koichiro T, Glen S, Daniel P, Alan F, Sudhir K MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 (2013) *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
96. Konaklieva MI. Molecular Targets of β -Lactam-Based Antimicrobials: Beyond the Usual Suspects (2014) *Antibiotics* 3(2):128-142
97. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, Schubert S. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganism (2013) *Proteomics: Clinical Applications* 7:767-778.
98. Kraiczy P, Seling A, Brissette CA, Rossmann E, Hunfeld KP, Bykowski T, Burns LH, Troese MJ, Cooley AE, Miller JC, Brade V, Wallich R, Casjens S, Stevenson B. *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface protein 2 (CspZ) as a serological marker of human Lyme Disease (2008) *Clinical and Vaccine Immunology* 15(3): 484–491.
99. Krishnamurthy T, Rajamani U, Ross PL, Janhour R, Nair H, Eng J, Yates J, Davis MT, Stahl DC, Lee TD. Mass spectral investigations on microorganisms (2000) *Journal of Toxicology Toxin Reviews* 19(1):95-117.
100. Krishnamurthy T, Ross PL, Rajamani U. Detection of pathogenic and non-pathogenic bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (1996) *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 10(8):883-888.

101. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells (1996) *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 10:1992–1996.
102. Larone DH. *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (2002) 4th ed.; American Society for Microbiology Press: Washington, DC, USA.
103. Lau YL, Anthony C, Fakhrurrazi SA, Ibrahim J, Ithoi I, Mahmud R. Real-time PCR assay in differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* infections in Orang Asli settlements in Malaysia (2013) *Parasites & Vectors* 6:250.
104. Lee W, Chung HS, Lee Y, Yong D, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2013; 77(3):227-30.
105. Levett PN, Haake DA. *Leptospira* species (Leptospirosis) (2009) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th Edition, Elsevier, vol.2, parte 3, sez. F, cap. 240.
106. Levett PN. Leptospirosis (2001) *Clinical Microbiology Reviews* 14:296-326.
107. Lewis JK, Wei J, Siuzdak G. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis (2000) *Encyclopedia of Analytical Chemistry* R.A. Meyers (Ed.):5880–5894.
108. Lupo A, Pap-Wallace KM, Sensi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae (2013) *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 77:179-194.
109. Macura AB. Dermatophyte infection (1993) *International Journal of Dermatology* 32: 313-323.
110. Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T. Differences in protein profiles of the isolates of *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* by surface-enhanced laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS) ProteinChip assays (2007) *Parasitology Research* 102:103–110.
111. Mamyrin BA, Karateav VI, Shmikk DV, Zagulin VA. Mass resolution may also be improved by the addition of a reflecton (1973) *Soviet Physics - JEPT* 37:45.
112. Martiny D, Bart A, Vandenberg O, Verhaar N, Wentink-Bonnema E, Moens C, van Gool T. Subtype determination of *Blastocystis* isolates by matrix-assisted laser

- desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (2014) *European Journal of Clinical Microbiology and Infection Diseases* 33:529-536.
- 113.** Marvin LF, Roberts MA, Faya LB. Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry (2003) *Clinica Chimica Acta* 337(1-2):11-21.
- 114.** Ministero della Salute Italiano. Malattie trasmesse da zecche: cenni di epidemiologia - misure di prevenzione (2000) Circolare n. 10 del 13 luglio 2000,4-5.
- 115.** Moura H, Izquierdo F, Woolfitt AR, Wagner G, Pinto T, del Aguila C, Barr JR. Detection of biomarkers of pathogenic *Naegleria fowleri* through mass spectrometry and proteomics (2015) *Journal of Eukaryotic Microbiology* 62:12-20.
- 116.** Munson MSB, Field FH. Chemical ionisation mass spectrometry. I. General introduction (1996) *Journal of the American Chemical Society* 88:2621-2630.
- 117.** Neir AO. Electron impact mass spectrometry (1947) *Review of Scientific Instrument* 18:415-427.
- 118.** Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, Gräser Y. MALDI-TOF mass spectrometry – a rapid method for identification of dermatophyte species (2013) *Medical Mycology* 51:17–24.
- 119.** Neville SA, Le Cordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, van Hal SJ. Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry following Introduction for Routine Laboratory Bacterial Identification (2011) *Journal of Clinical Microbiology* 49(8):2980-2984.
- 120.** Nordmann P e Poirel L. Strategies for identification of carbapenemasi-producing Enterobacteriaceae (2013) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68:487-489.
- 121.** Nordmann P, Naas T, Laurent Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (2011) *Emerging Infectious Diseases* 10:1791-1798.
- 122.** O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins (1975) *Journal of Biological Chemistry* 250(10):4007-4021.
- 123.** Oschmann P, Kraiczy P, Halperin J, Brade V. (eds) *Lyme Borreliosis and Tick-borne Encephalitis*. Unimed, Bremen (1999) *Clinical Microbiology and Infection* 17:69–79.
- 124.** Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry (2013) *Medical Mycology* 51:580-585.
- 125.** Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes (2000) *Nature* 05(6788):837-846.

126. Pinetti. Le dermatofizie (1977) Piccin Editore.
127. Posthumus MA, Kistemaker PG, Meuzelaar HLC, Ten Noever de Brauw MC. Laser desorption-mass spectrometry of polar nonvolatile bio-organic molecules (1978) *Analytical CAem.* 50 (7):985-991.
128. Postic D, Merien F, Perolat P, Baranton G. Diagnostic biologique Leptospirose-Borreliose de Lyme (2000) France: Institut Pasteur, Paris Cedex 15.
129. Randolph SE, Green RM, Hoodless AN, Peacey MF. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus* (2002) *International Journal of Parasitology* 32:979-989.
130. Rapp RP e Urban C. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: History, Evolution, and Microbiology Concerns (2012) *Pharmacotherapy* 32(5):399-407.
131. Rappsilber J, Mann M. Is mass spectrometry ready for proteome-wide protein expression analysis? (2002) *Genome Biology* 3(8).
132. Reinders J, Lewandrowski U, Moebius J, Wagner Y, Sickmann A. «Challenges in mass spectrometry-based proteomics (2004) *Proteomics* 4:3686-3703.
133. Rettinger A, Krupka I, Grünwald K, Dyachenko V, Fingerle V, Konrad R, Rashed H, Sing A, Straubinger RK, Huber I. *Leptospira* sp. Strain identification by MALDI-TOF MS in an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). (2012) *BMC Microbiology* 12:185.
134. Rizzoli A, Hauffe HC, Carpi G, Vourc'h GI, Neteler M, Rosa R. Lyme borreliosis in Europe (2011) *Eurosurveillance* 16(27).
135. Robilotti E, Deresinski S. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (2014) *F1000 Prime Reports* 6:80.
136. Robinson GL. The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae (1968) *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 62(2):285-94.
137. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Canton R, Nordmann P. Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes (2006) *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50:2544-2546.
138. Romijn EP, Krijgsveld J, Heck AJ. Recent liquid chromatographic-(tandem) mass spectrometric applications in proteomics (2003) *Journal of Chromatography* 1000(1-2):589-608.

139. Rudenko N, Golovchenko M, Grubhoffer L, Oliver JH. Updates on *Borrelia burgdorferi sensu lato* complex with respect to public health (2011) Tick and Tick Born Diseases 2:123–128.
140. Ryzhov V, Fenselau C. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells (2001) Analytica Chemistry 73:746-750.
141. Schwan TG, Raffel SJ, Schrupf ME, Webster LS, Marques AR, Spano R, Rood M, Burns J, Hu R. Tick-borne relapsing fever and *Borrelia hermsii* Los Angeles County, California, USA (2009) Emerging Infectious Disease 15:7.
142. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, Raoult D. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrixassisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (2009) Clinical Infectious Disease 49:543–551.
143. Shapiro ED. Lyme disease (2008) Advance in Experimental Medicine and Biology 609:185-195.
144. Stanek G, Reiter M. The expanding Lyme *Borrelia* complex-clinical significance of genomic species? (2011) Clinical Microbiology and Infection 17:487–493.
145. Steere AC. Lyme disease (2001) New England Journal of Medicine 345:115–125.
146. Stephens WE. A pulsed mass spectrometer with time dispersion (1946) Reviews in Physics 69:691.
147. Strupat KK, Karas M, Hillenkamp F. 2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry (1991) International Journal of Mass Spectrometry Ion Processes 111:89-102.
148. Tanaka K, Fenn JB. Nobel Laureates in chemistry (2002). Disponibile su <http://www.nobelprize.org>.
149. Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S. Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry (1988) Rapid Communications in Mass Spectrometry 2:151-153.
150. Tanyuksel M, Petri WA Jr. Laboratory diagnosis of amoebiasis (2003) Clinical Microbiology Reviews 16:713–729.
151. Theel ES, Hall L, Mandrekar J, Wengenack NL *Dermatophyte* Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (2011) Journal of Clinical Microbiology 4067–4071.
152. Tomao P, Ciceroni L, D'Ovidio MC, De Rose M, Vonesch N, Iavicoli S, Signorini S, Ciarrocchi S, Ciufolini MG, Fiorentini C, Papaleo B. Prevalence and incidence of

- antibodies to *Borrelia burgdorferi* and to tick-borne encephalitis virus in agricultural and forestry workers from Tuscany, Italy (2005) *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 24(7):457-63.
153. Trevisan G. Lyme disease in Italy (1987) *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*. 267:459-463.
154. Tzouvolekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimension. *Clinical Microbiology Reviews* (2012) 25(4):682-707.
155. Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C, Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (2005) *Applied and Environmental Microbiology* 71:58–64.
156. Vestal ML. Methods of ion generation (2001) *Chemical Reviews* 101:361-375.
157. Vinetz JM. Leptospirosis (2001) *Current Opinion in Infectious Diseases* 14: 527-538.
158. Vorm O, Roepstorff P, Mann M. Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation (1994) *Analytical Chemistry* 66:3281-3287.
159. Waksman SA, Woodruff HB. Selective Antibiotic Action of Various Substances of Microbial Origin (1942) *Journal of Bacteriology* 44:373-384.
160. Wang L, Han C, Sui W, Wang M, Lu X. MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strain (2013) *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405:5259-5266.
161. Wang ZP, Russon L, Li L, Roser DC, Long SR. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (1998) *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 12:456–464.
162. Warscheid B, Fenselau C. A targeted proteomics approach to the rapid identification of bacterial cell mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (2004) *Proteomics* 4(10):2877-2892.

163. Weiser A, Schneider L, Jung J, Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganism and beyond (mini review) (2011) International Journal of Molecular Science 93:965-974.
164. Weitzam I, Kane J. Dermatophyte and agents of superficial mycoses (1991) In A. Balows, W. J. Hasler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, H. J. Shadomy (ed.), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington D. C.; 601-616.
165. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes (1995) Clinical Microbiology Reviews 8:240 –259.
166. WHO: World Health Organization/Pan American Health Organization. UNESCO Report of a consultation of experts on amoebiasis (1997) Weekly Epidemiological Record 72:97–99.
167. WHO. Global incidence and prevalence of selected sexually transmitted infections-2008. Geneva, Switzerland: World Health Organization (2012) 1-20.
168. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley A, Hughes G, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two dimensional electrophoresis and amino acid analysis (1996) Biotechnology (NY) 14(1):61-65.
169. www.cdc.gov.
170. www.cdc.gov/lyme/signs_symptoms/index.html.
171. www.mycology.adelaide.edu.au.
172. www.proteomics.case.edu/proteomics/westernblot.html.
173. www.slideshare.net/GRFDAVOS/drivers-of-leptospirosis-transmission-at-the-humananimal-interface-in-distinct-community-types.
174. Yamasita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme (1984) Journal of Physical Chemistry 88: 4451-4459.
175. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of a IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* (2001) Antimicrobial Agents Chemotherapy 45(8):2368-2371.
176. Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of a IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* (2001) Antimicrobial Agents Chemotherapy 45(8):2368-2371.

177. Zhang X, Scalf M, Berggren TW, Westphall MS, Smith LM. Identification of mammalian cell lines using MALDI-TOF and LC-ESI-MS/MS mass spectrometry (2006) *Journal of the American Society of Mass Spectrometry* 17(4):490-499.
178. Zhou J, Ens W, Standing KG, Verentchikov A. Kinetic energy measurements of molecular ions ejected into an electric field by matrix-assisted laser desorption (1992) *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 6(11):671-678.
179. Zoppi F. Aspetti diagnostici ed epidemiologici di batteri gram-negativi multiresistenti e produttori di carbapenemasi isolati nell'area fiorentina (2012).

PUBBLICAZIONI *IN EXTENSO* PRODOTTE NEL CORSO DEL DOTTORATO DI RICERCA.

1. Adriana Calderaro, Chiara Gorrini, Giovanna Piccolo, Sara Montecchini, Mirko Buttrini, Sabina Rossi, **Maddalena Piergianni**, Maria Cristina Arcangeletti, Flora De Conto, Carlo Chezzi, Maria Cristina Medici (2014) Identification of *Borrelia* Species After Creation of an In-house MALDI-TOF MS Database. *Plos One* 9(2): e88895. Impact Factor: 3.73.
2. Adriana Calderaro, Giovanna Piccolo, Chiara Gorrini, Sara Montecchini, Mirko Buttrini, Sabina Rossi, **Maddalena Piergianni**, Flora De Conto, Maria Cristina Arcangeletti, Carlo Chezzi, Maria Cristina Medici (2014) *Leptospira* species and serovars identified by MALDI-TOF MS after database implementation. *BMC Research Notes* 7: 330.
3. Adriana Calderaro, Federica Motta, Sara Montecchini, Chiara Gorrini, Giovanna Piccolo, **Maddalena Piergianni**, Mirko Buttrini, Maria Cristina Medici, Maria Cristina Arcangeletti, Carlo Chezzi, Flora De Conto (2014) Identification of Dermatophyte Species After Implementation of the In-house MALDI-TOF MS Database. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 16012-16024. Impact Factor: 2.246.
4. Adriana Calderaro, **Maddalena Piergianni**, Mirko Buttrini, Sara Montecchini, Giovanna Piccolo, Chiara Gorrini, Sabina Rossi, Carlo Chezzi, Maria Cristina Arcangeletti, Maria Cristina Medici, Flora De Conto (2015) MALDI-TOF mass spectrometry for the investigation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *Plos One* 10(4): e0122448. Impact Factor: 3.73.
5. Adriana Calderaro, Mirko Buttrini, **Maddalena Piergianni**, Sara Montecchini, Monica Martinelli, Silvia Covan, Giovanna Piccolo, Maria Cristina Medici, Maria Cristina Arcangeletti, Carlo Chezzi, Flora De Conto. A new algorithm including a modified meropenem hydrolysis assay evaluated on a large cohort of clinically relevant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. IN CORSO DI SECONDA REVISIONE SU RIVISTA INTERNAZIONALE.
6. Adriana Calderaro, **Maddalena Piergianni**, Sara Montecchini, Mirko Buttrini, Giovanna Piccolo, Sabina Rossi, Maria Cristina Arcangeletti, Maria Cristina Medici, Carlo Chezzi, Flora De Conto. MALDI-TOF mass spectrometry as a potential tool for *Trichomonas vaginalis* identification. INVIATO A RIVISTA INTERNAZIONALE.