

# STUDIO CLINICO E TASSONOMICO DEL GENERE BATTERICO YERSINIA MEDIANTE UNA NUOVA TECNICA: LA SPETTROMETRIA DI MASSA MALDI-TOF

D. Ravasi, R. Peduzzi, M. Dolina, A. Demarta, M. Tonolla

## Premessa

La Fondazione Dott. Pierluigi Crivelli ha promosso e finanziato parzialmente questo studio sui batteri del genere *Yersinia*. Ha beneficiato di questo credito il lavoro svolto dalla Dr.ssa Damiana Ravasi.

L'indagine è stata effettuata presso l'**Istituto cantonale di microbiologia di Bellinzona**. Istituto che da diversi anni si interessa a questo genere batterico considerato importante nella linea d'indagine sui germi emergenti. In particolare, promuovendo negli anni '90 anche una ricerca di dottorato sulla diffusione clinica e ambientale della *Yersinia* nel nostro territorio d'attività. Il lavoro condotto dalla Dr.ssa Marisa Dolina-Giudici fu svolto in collaborazione con il Centro di referenza delle *Yersiniae* dell'OMS con sede all'Istituto Pasteur di Parigi, "Unité d'écologie bactérienne"; inoltre aveva potuto analizzare ceppi di *Yersinia* provenienti dai maggiori Centri svizzeri di microbiologia: Zurigo, Ginevra, Losanna, San Gallo, Lucerna e Berna.

Disponendo attualmente di una tecnica analitica molto performante, risultava interessante comparare i risultati prodotti con sistemi classici con queste recenti metodologie. Lo scopo della recente indagine risiede appunto nell'esame del significato clinico e della posizione tassonomica soprattutto di *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica*.

## Presentazione concisa del genere *Yersinia* con particolare riferimento a: *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*

Il genere batterico *Yersinia* raggruppa sia specie patogene per l'uomo e gli animali che specie isolate dall'ambiente di solito non vengono considerate patogene.

Le tre specie patogene sono:

*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*

Le specie ambientali sono:

*Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. philomiragia*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. similis*

Si tratta di batteri Gram negativi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae ed attualmente il genere *Yersinia* conta 18 specie.



Figura 1: Coltura di *Yersinia* su Agar. Colonie caratteristiche a forma di "occhio di bue".

In particolare, ***Yersinia pseudotuberculosis*** è stata scoperta nel 1883-84 da Malassez e Vignal ed è stata isolata per la prima volta da una cavia sulla quale era stato inoculato un nodulo di un bambino morto di meningite tubercolare. Germe designato appunto come Bacillo di Malassez e Vignal fu inizialmente classificato tassonomicamente come *Bacterium pseudotuberculosis* e attribuito ai Corinebatteri.

Si tratta di un piccolo bacillo Gram negativo con forma di coccobacillo senza capsula e senza spore. Esistono delle relazioni antigeniche tra *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis*. Inoltre, le due specie hanno analoghe proprietà metaboliche e esigenze biologiche anche per quanto riguarda

la nicchia ecologica dove evolvono. Di conseguenza, in una competizione tra germi che hanno le stesse esigenze si può facilmente postulare che la diminuzione di frequenza della specie ad alta patogenicità (*Y. pestis*) possa aver favorito la proliferazione della specie di minor capacità patogena (*Y. pseudotuberculosis*).

Nell'uomo, provocate da *Y. pseudotuberculosis*, si riscontrano delle forme di malattie generalizzate, ad esempio setticemia oppure focolai localizzati per esempio polmonare, oculare e splenico o empiema pleurico.

Negli animali le specie più sensibili a questo germe sono le cavie, le lepri ed inoltre diversi roditori possono essere infettati. Si riscontrano con una certa frequenza infezioni nei gatti, negli uccelli e negli zoo presso i leoni, le scimmie, i canguri e i boa.

Questo ci permette di affermare che sono dei batteri a serbatoio animale.

***Yersinia enterocolitica*** è un battere ubiquitario reperito nell'acqua, nel suolo e in numerosi animali. I primi ceppi sono stati isolati negli Stati Uniti attorno al 1923. Responsabile soprattutto di gastroenteriti acute e della sindrome pseudo appendicolare osservata soprattutto nei bambini tra gli 8 e i 12 anni. Nell'uomo la contaminazione avviene per via orale. Le manifestazioni cliniche dell'infezione possono essere estremamente eterogenee. I sintomi tipici sono febbre, dolori addominali e diarrea, in alcuni casi l'infezione da *Y. enterocolitica* può causare setticemia ed empiema pleurico. I sintomi nell'uomo causati dalle due specie *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* sono spesso simili rendendo la diagnosi difficoltosa. La diagnosi di infezioni da specie patogene di *Yersinia* si basa sui sintomi clinici, test microbiologici (coltivazione vedi Fig. 1, colorazione di Gram vedi Fig. 2, aspetto al microscopio), test immunologici con anticorpi specie-specifici (serotipizzazione) e sequenziamento di geni specifici.

Queste tecniche sono laboriose e richiedono tempo e personale qualificato. Nel caso di *Y. enterocolitica* è importante poter discriminare i biotipi patogeni da quelli non patogeni presenti all'interno della stessa specie; la tipizzazione di *Y. enterocolitica* mediante esami biochimici è però laboriosa e non sempre affidabile. Nel trattamento antibiotico va considerato che i betalattamici sono costantemente inattivi.

***Yersinia pestis*** è l'agente causale della peste e infetta una grande varietà di roditori. La trasmissione all'uomo avviene principalmente attraverso i morsi delle pulci provenienti da roditori infetti.

Anche la differenziazione tra *Y. pseudotuberculosis* e *Y. pestis* è complessa, presumibilmente a causa delle differenze genetiche molto limitate fra le due specie. Si prospetta dunque un bisogno crescente di nuove tecniche diagnostiche che permettano l'identificazione rapida, oggettiva e accurata di questi microorganismi e che si integrino ai metodi tradizionali.

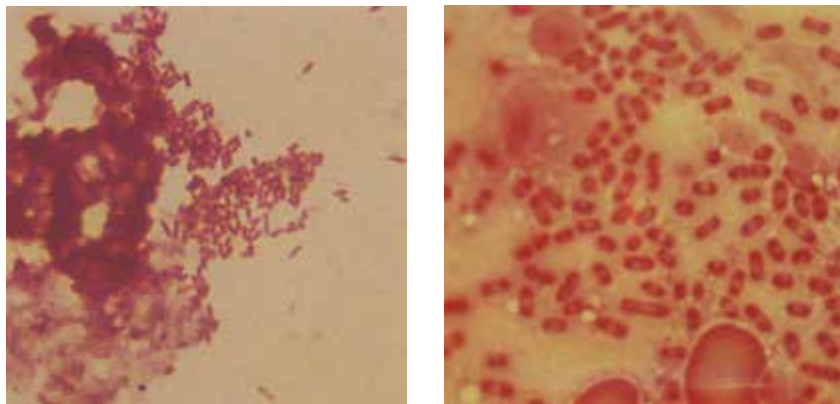


Figura 2: Aspetto microscopico, colorazione di Gram  
2a *Yersinia enterocolitica* e 2b *Yersinia pestis*.

### La tecnica utilizzata

L'evoluzione della tecnica "Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry (MS)" rende possibile l'identificazione rapida e accurata di microorganismi (Fenselau, 1994). Questa tecnica permette di rilevare i profili di massa delle proteine microbiche a partire da cellule intere di batteri o dai loro estratti (Box 1). Il metodo è rapido, di facile utilizzo e richiede quantità di materiale molto piccole (singole colonie batteriche). Le impronte caratteristiche di spettri di masse proteiche (ioni biomarcatori) ottenute possono in seguito essere paragonate a banche dati validate di spettri batterici di referenza (Keys *et al.*, 2004; Maier *et al.*, 2006). La conoscenza dell'identità dei biomarcatori non è richiesta, cosa che facilita la rapidità delle analisi di routine clinica. La spettrometria di massa MALDI-TOF può discriminare tassonomicamente batteri a livello di genere, di specie e, in alcuni casi, anche di sotto-specie.

### Box 1. Spettrometria di massa MALDI-TOF

Nella spettrometria di massa, frammenti di DNA o RNA sono fissati in una matrice di piccole molecole, vaporizzate e ionizzate in un vuoto da un impulso laser, e accelerate in un campo elettrico. A seconda della loro massa, le molecole viaggiano più piano o più veloce, risultando in differenti tempi di arrivo che sono registrati da un rilevatore. L'identificazione di microorganismi con la spettrometria di massa MALDI-TOF è basata sulla detezione di segnali da biomarcatori che sono specifici al livello di genere, specie o sotto-gruppo. Le proteine biomarcatori sono le molecole più caratteristiche e accessibili nell'analisi di cellule intere, perché forniscono dei buoni segnali senza dover passare da estrazione, separazione o amplificazione.

Tonolla *et al.*, 2009

Recentemente, la tecnica MALDI-TOF MS è stata applicata all'identificazione di *Yersinia enterocolitica* (Kraushaar *et al.*, 2011; Stephan *et al.*, 2011) *Yersinia pestis* (Ayydurai *et al.*, 2010; Wittwer *et al.*, 2011) e altre specie di *Yersinia* (Lasch *et al.*, 2010). Tuttavia, il sistema di identificazione e la banca dati usati da Lasch (*et al.*, 2010) sono diversi da quelli usati nel presente studio.

Un ulteriore scopo di questo studio è di sviluppare una banca dati di spettri di referenza di *Yersinia* spp. mediante la spettrometria di massa MALDI-TOF e di integrarla alla banca dati SARAMIS™ (Spectral Archiving And Microbial Identification System, AnagnosTec GmbH, Postdam, Germania) attualmente utilizzata per le analisi cliniche di routine all'Istituto cantonale di microbiologia di Bellinzona (Tonolla *et al.*, 2009; Tonolla *et al.*, 2010). La banca dati SARAMIS™ è stata sviluppata per l'identificazione rapida di ceppi batterici e fornisce gli spettri di identificazione per la maggior parte delle specie patogene clinicamente importanti (Kallow *et al.*, 2010). I risultati ottenuti tramite SARAMIS™ sono paragonati con un metodo tradizionale di identificazione di *Yersinia* spp., l'analisi filogenetica delle sequenze del gene *gyrB*, in modo da confermare la robustezza dei raggruppamenti ottenuti con la spettrometria di massa MALDI-TOF.

Un'ulteriore applicazione della tecnica della spettrometria di massa, è la possibilità di tipizzare in seno alla specie *Y. enterocolitica* delle sotto-spe-

cie, in modo da potere discriminare rapidamente i biotipi patogeni da quelli non patogeni.

### **Obiettivi specifici**

1. Analisi dei ceppi di *Yersinia* spp. mediante spettrometria di massa MALDI-TOF e integrazione dei profili di massa delle proteine microbiche alla banca dati SARAMIS™. Costruzione di un dendrogramma di similarità dei ceppi.
2. Creazione di un superspettro genere-specifico per *Yersinia* e di superspettri specie-specifici per l'identificazione di *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. pseudotuberculosis*.
3. Validazione del metodo tramite l'esecuzione di un test in cieco utilizzando ceppi di *Yersinia* spp. isolati da casi clinici umani e dall'ambiente.
4. Analisi genetica dei ceppi di *Yersinia* spp. mediante sequenziamento del gene *gyrB* e costruzione di un albero filogenetico.
5. Paragone tra i risultati ottenuti mediante la spettrometria di massa MALDI-TOF e l'analisi genetica.

### **Metodi**

#### **Ceppi batterici analizzati**

Dei 157 ceppi di *Yersinia* spp. utilizzati in questo studio, 143 sono di origine ambientale, animale e umana (Tabella 1). Questi ceppi sono stati scelti in base ai gruppi di *Yersinia* evidenziati da Dolina e Peduzzi (1993) tramite analisi degli isoenzimi (MEE Multilocus Enzyme Electrophoresis) e rappresentano in modo il più diversificato possibile le diverse specie di *Yersinia*, l'origine dei ceppi, il tipo elettroforetico e il biotipo. Tutti i ceppi ambientali, sei ceppi animali e 57 ceppi umani, sono stati isolati in Svizzera. Gli altri nove ceppi umani sono stati ottenuti da Belgio, Danimarca, Francia, Grecia, Norvegia e Spagna. Un gruppo di cinque ceppi animali è stato isolato in Belgio. I ceppi sono stati identificati da Dolina e Peduzzi (1993) come appartenenti alle seguenti specie: *Y. bercovieri* (5 ceppi), *Y. enterocolitica* (73), *Y. frederiksenii* (13), *Y. intermedia* (38), *Y. kristensenii* (6) e *Y. pseudotuberculosis* (8). Per ogni specie e gruppo di *Yersinia* abbiamo inoltre analizzato lo specifico ceppo di riferimento.

**Tabella 1** Origine dei ceppi batterici di *Yersinia* spp. usati per la creazione e la validazione dei superspettri (SSP) e per l'analisi del gene *gyrB*.

Specie <sup>a</sup>	Ceppi di referenza <sup>b</sup>	Ceppi ambientali	Ceppi animali	Ceppi clinici	Totale ceppi
<i>Y. aldovae</i>	DSM 18303-T				1
<i>Y. aleksiciae</i>	DSM 14987-T				1
<i>Y. bercovieri</i>	DSM 18528-T			5	6
<i>Y. enterocolitica</i>	ATCC 23715	15	7	51	74
<i>Y. frederiksenii</i>	DSM 18490-T				
	ATCC 29912				
	ATCC 33644	10		3	16
<i>Y. intermedia</i>	DSM 18517-T	37		1	39
<i>Y. kristensenii</i>	DSM 18543-T	4		2	7
<i>Y. mollaretii</i>	DSM 18520-T				1
<i>Y. pseudotuberculosis</i>	La 2931		4	4	9
<i>Y. rohdei</i>	DSM 18270-T				1
<i>Y. ruckeri</i>	DSM 18506-T				1
<i>Y. similis</i>	DSM 18211-T				1
<b>Totale</b>	<b>14</b>	<b>66</b>	<b>11</b>	<b>66</b>	<b>157</b>

<sup>a</sup> Identificazione mediante tecniche biochimiche (Dolina e Peduzzi, 1993).

<sup>b</sup> T: ceppo tipo.

Una prima serie di 64 ceppi è stata usata per la creazione di superspettri specie-specifici per le specie *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. pseudotuberculosis*. Una seconda serie di 86 ceppi è stata usata per la validazione dei superspettri, in altre parole per saggiarne il rendimento, in un test cieco. Infine sono state analizzate le sequenze del gene *gyrB* di 81 ceppi. Di questi ceppi, 52 sono stati sequenziati nel presente studio, mentre 10 ceppi erano già stati sequenziati da Demarta (*et al.*, 2004) e 19 sequenze derivano da dati pubblicati e sono stati ottenuti da NCBI GenBank. Il gene *gyrB* codifica la subunità B della DNA-girasi (un enzima che permette la replicazione del DNA) e permette una buona risoluzione nella classificazione filogenetica del genere *Yersinia* (Demarta *et al.*, 2004).

## Estrazione del DNA e analisi genetiche

Abbiamo ottenuto biomassa batterica a partire dai ceppi conservati a -80°C coltivandoli per 24 h a 37°C sul terreno di coltura Columbia agar contenente sangue di montone al 5% (Becton Dickinson), in condizioni

aerobiche standard. Per ogni ceppo, una colonia è stata isolata e messa di nuovo in coltura alle stesse condizioni.

Dopo l'estrazione del DNA genomico, il gene *gyrB* viene in seguito amplificato tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR). La tecnica applicata è descritta in una precedente pubblicazione (Demarta *et al.*, 2004).

### **Analisi delle sequenze**

Le sequenze parziali del gene *gyrB* sono state dapprima analizzate utilizzando il software BioNumerics v.6.01 (Applied Maths). Allineamenti multipli ClustalW delle sequenze sono stati effettuati tramite il software MEGA v.4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007). L'algoritmo Neighbor joining, incluso nello stesso software, è stato utilizzato per la costruzione degli alberi filogenetici.

### **MALDI-TOF MS**

Un piccolo quantitativo (circa 0.5 µg) di materiale è stato preso dalle colture fresche (vedi sopra) e trasferito mediante un'ansa monouso in un pozzetto di una lama d'acciaio FlexiMass™ da 48 pozzetti. Le cellule sono state quindi ricoperte da 0.5 µl di matrice alfa-ciano-4-idrossicinnamico e lasciate asciugare all'aria a 24-27°C per 1-2 min. Abbiamo analizzato ogni ceppo di riferimento e ogni ceppo utilizzato per la creazione di superspettri in quadruplo, distribuendo una colonia in quattro pozzetti diversi.

Ogni ceppo utilizzato per la validazione dei superspettri è stato analizzato in doppio. Tutti i campioni sono stati analizzati con uno spettrometro di massa MALDI-TOF Axima Confidence™ (Shimadzu Biotech) in modalità lineare positiva in una gamma di rapporto massa-carica (*m/z*) di 2000-20,000. Il ceppo di riferimento *Escherichia coli* K12 (genotipo GM48) è stato impiegato come standard per la calibrazione esterna.

Per la calibrazione interna sono state usate tre masse specifiche per il genere *Yersinia*, come proposto da Lasch (*et al.*, 2010). Per ogni replicato sono stati presi in considerazione unicamente i 120 picchi di intensità di massa più elevati. Poi per ogni ceppo sono state prese le masse che sono uguali in almeno 2 dei 4 replicati analizzati per ottenere una media del 50%. Gli spettri sono stati esportati come liste di picchi con valori *m/z* per ogni picco e intensità di segnale nel formato ASCII.

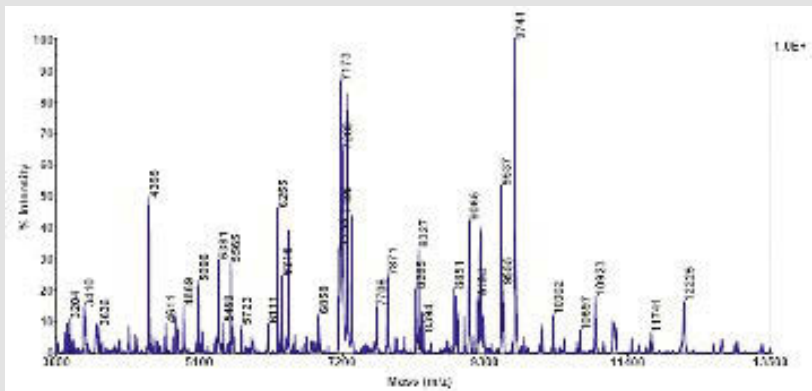


## Analisi degli spettri

Le liste di picchi di massa di ogni ceppo sono state esportate nel software SARAMIS™ (Spectral Archive and Microbial Identification System, AnagnosTec). I superspettri sono stati calcolati per il genere *Yersinia* e per sei specie di *Yersinia* (*Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. pseudotuberculosis*) mediante lo strumento SARAMIS™ Superspectrum (Stephan *et al.*, 2011).

Ventidue masse per il genere e 31-41 masse per le diverse specie sono state pesate e utilizzate come superspettri per l'identificazione automatizzata del genere *Yersinia* e delle specie descritte. Per la costruzione del dendrogramma di similarità dei ceppi, i gruppi di masse proteiche generati sono stati analizzati in SARAMIS™ (Stephan *et al.*, 2011).

Superspettro: è uno spettro di massa consenso tra molteplici spettri di massa di ceppi di referenza individuali. La banca dati SARAMIS™ usa dei superspettri per l'identificazione di campioni. I superspettri contengono unicamente picchi che sono informativi del gruppo rispettivo di microrganismi. Picchi non informativi sono eliminati durante la creazione dei superspettri (Kallow *et al.*, 2010).



**Figura 3:** Esempio di profilo (o spettro) di masse ottenuto per *Escherichia coli*. Lo spettro contiene segnali specifici per i livelli di famiglia, genere, specie e sotto-specie.

La sensibilità e specificità stimate del metodo di identificazione e gli intervalli di confidenza (IC) al 95% sono stati calcolati rispetto a uno standard perfetto costruito (FDA, 2007), corrispondente all'identificazione tramite sequenze del gene *gyrB*. Abbiamo calcolato la sensibilità e specificità stimate per le sei specie *Y. bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. pseudotuberculosis*, definendo un'identificazione tramite spettrometria di massa MALDI-TOF positiva quando la confidenza di identificazione era  $\geq 90\%$ . Il coefficiente Kappa di Cohen è pure stato computato (Attermann, 2003).

## Risultati

### Creazione e validazione dei superspettri

A partire dall'analisi di 64 ceppi tramite spettrometria di massa MALDI-TOF e susseguentemente SARAMIS™, abbiamo creato un superspettro per l'identificazione del genere *Yersinia* e sette superspettri per l'identificazione delle specie *Yersinia bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. pseudotuberculosis*. Per la specie *Y. frederiksenii* sono stati creati superspettri per due delle tre genospecie precedentemente identificate (Demarta *et al.*, 2004). Per la terza genospecie il numero di ceppi a disposizione era insufficiente per la creazione di un superspettro. I rapporti massa-carica selezionati variano da 3079.0 *m/z* a 13,347.6 *m/z* (errore 0.08%), con una media di  $34.38 \pm 5.78$  (SD) rapporti massa-carica diversi utilizzati per la creazione di ogni superspettro. La robustezza dei nuovi superspettri è stata testata sottoponendo 86 ceppi alla procedura standard automatizzata di identificazione usata normalmente per isolati clinici. Di questi 86 ceppi, 79 sono stati identificati correttamente mediante i superspettri specie-specifici. Sui 79 ceppi identificati correttamente, l'8.86% (7/79 ceppi) dei ceppi è stato identificato correttamente con un livello di confidenza del 99.9%, il 53.17% (42/79) con un livello di confidenza tra 99.8% e 90%, e 37.98% (30/79) con un livello di confidenza inferiore al 90%.

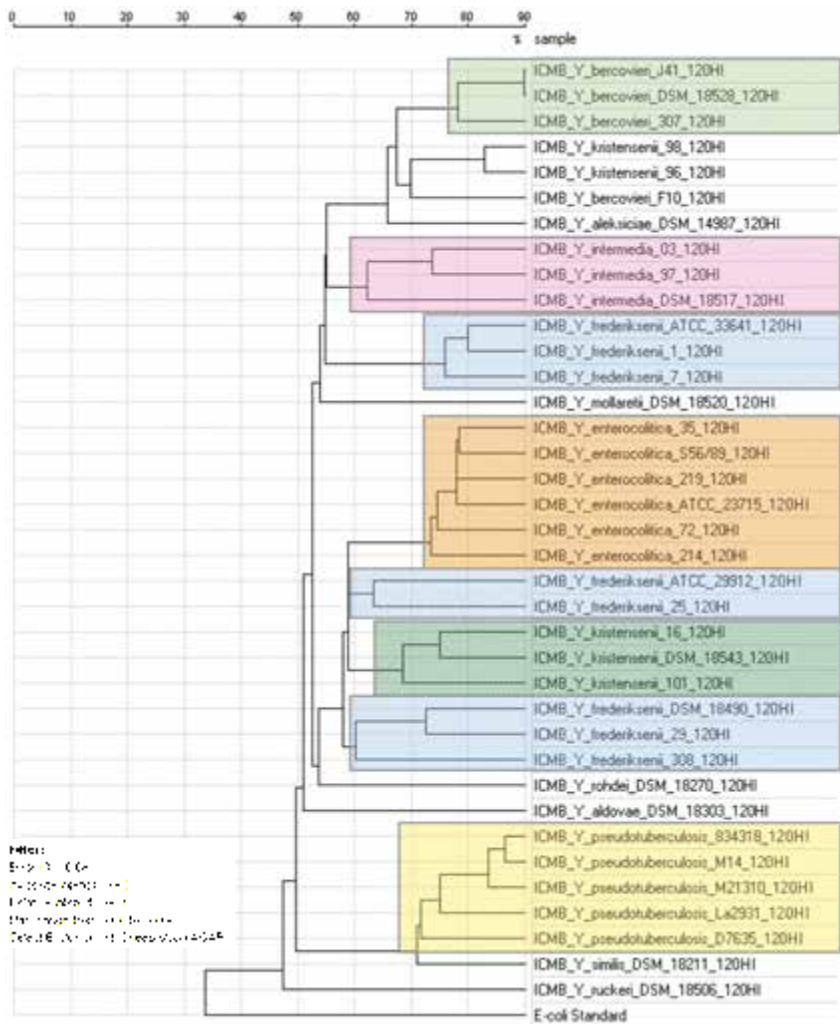
Due ceppi (*Y. frederiksenii* 177 e *Y. intermedia* 246) sono stati identificati come appartenenti al genere *Citrobacter*. Anche con l'analisi del gene *gyrB* i due ceppi sono risultati non appartenere al genere *Yersinia*. Per il ceppo *Y. frederiksenii* 177 lo stesso risultato era già stato ottenuto da Demarta *et al.* (2004). Tra le spiegazioni possibili una contaminazione dei ceppi originali non è esclusa. Per questa ragione i due ceppi sono stati esclusi da ulteriori analisi. I ceppi *Y. kristensenii* 96 e 98 sono stati

identificati correttamente come appartenenti al genere *Yersinia*, ma non come specie *kristensenii*. Lo stesso risultato si è presentato con l'analisi del gene *gyrB* (Fig. 4 e 5). I ceppi apparivano già in un gruppo separato nell'esame tramite MEE (Dolina e Peduzzi, 1993). Il ceppo *Y. frederiksenii* 55 è stato identificato dalla spettrometria di massa come non appartenente al genere *Yersinia*. Nell'analisi genetica figura invece come *Yersinia sp.*, ma più vicino al gruppo *Y. intermedia* che al gruppo *Y. frederiksenii* (Fig. 5). Un risultato molto simile era già stato ottenuto da Demarta *et al.* (2004). Due ceppi (*Y. bercovieri* F10 e *Y. enterocolitica* 28) non sono stati identificati correttamente al livello di specie dalla spettrometria di massa, mentre l'analisi genetica ha fornito dei risultati corretti (Fig. 4 e 5).

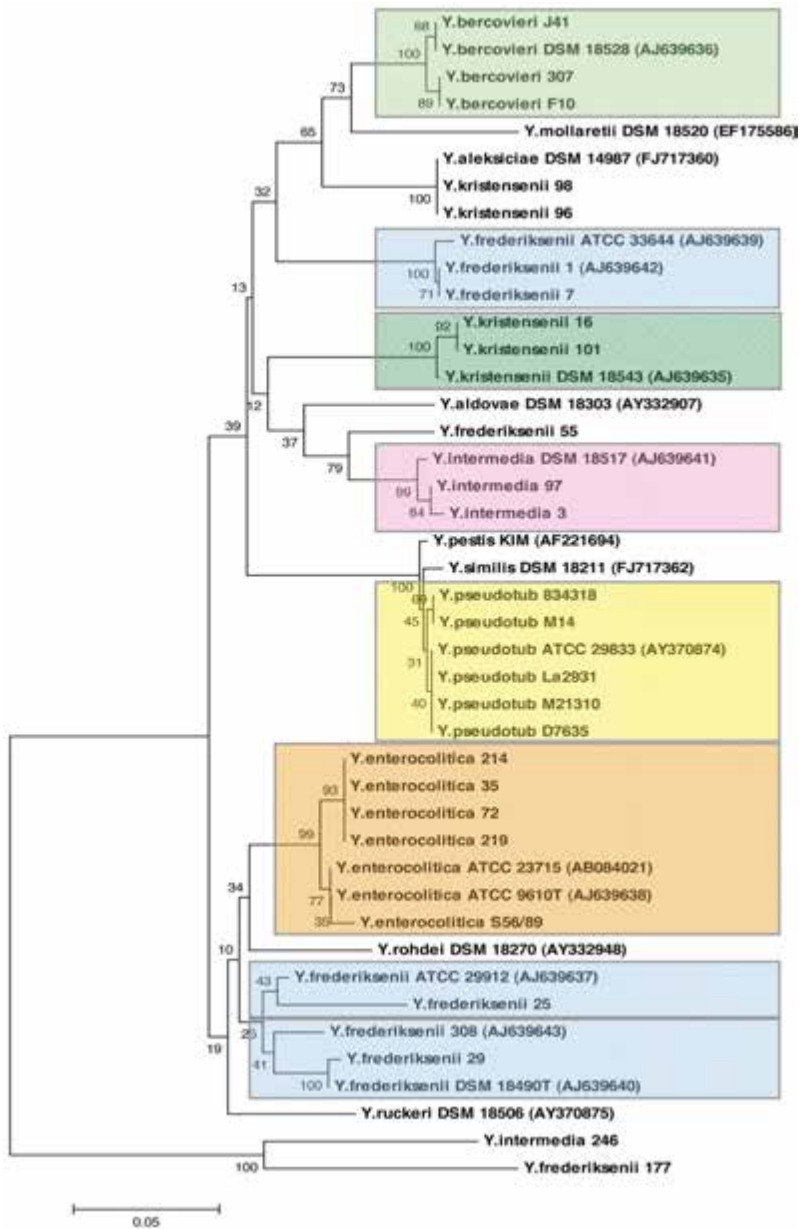
### **Paragone tra analisi MALDI-TOF MS e analisi genetiche**

La sensibilità stimata della tecnica spettrometria di massa MALDI-TOF per l'identificazione delle specie di *Yersinia* di cui sono state create i super-spettri è 0.97 (intervallo di confidenza IC, 95%: 0.89-0.99); la specificità stimata è 1.00. L'efficienza di identificazione è 0.97 (IC 95%: 0.89-0.99). Sia nel dendrogramma basato sugli spettri di massa (Fig. 4) che nell'albero filogenetico ottenuto con le sequenze del gene *gyrB* (Fig. 5), i ceppi appartenenti alla medesima specie di *Yersinia* si riuniscono nello stesso gruppo, salvo per le eccezioni già descritte (ceppi *Y. frederiksenii* 177e 55, *Y. intermedia* 246, e *Y. kristensenii* 96 e 98). Per la specie *Y. frederiksenii* è inoltre possibile distinguere anche nel dendrogramma basato sugli spettri di massa gli stessi tre sotto-gruppi già identificati da Demarta *et al.* (2004), in cui ogni gruppo (o genospecie) è identificato dal rispettivo ceppo di referenza.

La concordanza tra i risultati ottenuti mediante spettrometria di massa MALDI-TOF e analisi del gene *gyrB* è stata misurata tramite il coefficiente Kappa di Cohen ed ha un valore di 0.82 (IC 95%: 0.57-1.06).



**Figura 4** Dendrogramma di similarità semplificato dei ceppi di *Yersinia* spp. ottenuto mediante la spettrometria di massa MALDI-TOF e SARAMIS™.



**Figura 5** Albero filogenetico semplificato ottenuto mediante analisi delle sequenze del gene *gyrB* di *Yersinia* spp.

## Discussione

Mediante la spettrometria di massa MALDI-TOF e SARAMIS™ abbiamo potuto creare superspettri per il genere *Yersinia* e per le specie *Yersinia bercovieri*, *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii* e *Y. pseudotuberculosis*. La specie *Y. frederiksenii* comprende tre genospecie, indistinguibili sulla base dei caratteri fenotipici, che sono state caratterizzate attraverso analisi degli isoenzimi (multilocus enzyme electrophoresis), ribotipizzazione e sequenziamento (Demarta *et al.*, 2004). Anche l'analisi proteica ha saputo differenziare i tre genotipi e ha permesso la creazione di superspettri per due di essi. Per il terzo genotipo di *Y. frederiksenii*, non è stato possibile creare il superspettro, in quanto il numero di ceppi a disposizione non era sufficiente per garantire una costruzione secondo gli standards.

La sensibilità stimata nell'identificazione delle specie di *Yersinia* di cui sono stati creati i superspettri è 0.97, mentre la specificità stimata è 1. L'efficienza complessiva dell'identificazione proteomica è elevata (97%). Possiamo dunque concludere che la spettrometria di massa MALDI-TOF può essere usata per l'identificazione affidabile di specie batteriche appartenenti al genere *Yersinia* e permette il riconoscimento delle specie con significato clinico quali *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*.

Per la terza specie di rilievo per la salute di uomini e animali, *Y. pestis*, non è stato possibile ottenere un numero sufficiente di ceppi per la costruzione di un superspettro. La difficoltà nel reperimento e nell'ottenimento di ceppi di *Y. pestis* è dovuta all'elevata patogenicità della specie. Il gene *gyrB* è stato scelto come standard costruito per il calcolo di sensibilità, specificità, efficienza stimate e concordanza. Uno studio precedente ha dimostrato che il gene *gyrB* usato come marcatore filogenetico consente una classificazione del genere *Yersinia* paragonabile ai risultati ottenuti con metodi più laboriosi (Demarta *et al.*, 2004). Il coefficiente Kappa di Cohen (0.82) indica una concordanza quasi perfetta tra la spettrometria di massa MALDI-TOF e il sequenziamento del gene *gyrB* nell'identificazione di una specie.

Nonostante un solo ceppo sia stato analizzato per la specie *Y. ruckeri* (il ceppo di riferimento DSM18506), esso sembra separarsi da tutti gli altri ceppi di *Yersinia* sp. nel dendrogramma di similarità dei ceppi basato sulla spettrometria di massa (Fig. 4). Nell'albero filogenetico il ceppo appare invece legato alla specie *Y. enterocolitica*. Lo status tassonomico di *Y. ruckeri* rimane oggetto di discussioni (Sulakvelidze, 2000; Kotetishvili *et al.*, 2005). Sia con l'analisi proteomica che con l'analisi

genetica le specie *Y. pseudotuberculosis* e *Y. similis* presentano un legame stretto con la specie *Y. pestis* (Lasch *et al.*, 2010). In conclusione, la spettrometria di massa MALDI-TOF, appaiata all'uso di superspettri costruiti usando la banca dati SARAMIS™, rappresenta un mezzo rapido per l'identificazione affidabile di specie di *Yersinia* sia ambientali che clinicamente rilevanti. La tecnica permette di eseguire un'analisi completa a partire da una singola colonia batterica in pochi minuti, fornendo dunque un esame diagnostico rapido e conveniente di un numero elevato di colonie in un tempo limitato.

### Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento alla Fondazione Dottor Pierluigi Crivelli per il finanziamento del progetto. Si ringraziano Dominik Ziegler, Dr. Valentin Pflüger e Dr. Guido Vogel (Mabritec, Basilea) per l'aiuto sempre rapido e accurato riguardo le analisi allo spettrometro di massa MALDI-TOF; un ringraziamento in questo senso va anche a Dr. Cinzia Benagli e Dr. Sophie De Respinois. Un grazie ad Annapaola Caminada per il prezioso aiuto nelle tecniche di laboratorio.

### Referenze

Attermann J (2003) On the agreement between two diagnostic methods with binary outcomes. *Scand J Clin Lab Invest* 63, 525-528.

Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M (2010) Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiology* 10, 285.

Demarta A, De Respinois S, Dolina M, Peduzzi R (2004) Molecular typing of *Yersinia frederiksenii* strains by means of 16s rDNA and *gyrB* genes sequence analyses. *FEMS Microbiol Lett* 238, 423-428.

Dolina M, Peduzzi R (1993) Population genetics of human, animal, and environmental *Yersinia* strains. *Appl Environ Microb* 59, 442-450.

FDA (2007) Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests.

Fenselau C (1994) Mass Spectrometry for Characterization of Microorganisms: an Overview. In: Fenselau C (ed) *Mass Spectrometry for the Characterization of Microorganisms*. AC Symposium Series, 541, American Chemical Society; Washington, DC, pp. 1-7.

Kallow W, Erhard M, Shah HN, Raptakis E, Welker M (2010) MALDI-TOF MS for microbial identification: years of experimental development to an established protocol. In: Shah HN, Gharbia SE (eds) *Mass Spectrometry for Microbial Proteomics*. Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 255-277.

Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, McDowall M, Shah HN (2004) Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* 4, 221-242.

Kotetishvili M, Kreger A, Wauters G, Morris JG Jr, Sulakvelidze A, Stine OC (2005) Multilocus sequence typing for studying genetic relationships among *Yersinia* species. *J Clin Microbiol* 43, 2674-2684.

Kraushaar B, Dieckmann R, Wittwer M, Knabner D, Konietzny A, Mäde D, Strauch E (2011) Characterization of a *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strain harbouring an ail gene. *J Appl Microbiol* 111, 997-1005.

Lasch P, Drevinek M, Nattermann H, Grunow R, Stämmler M, Dieckmann R, Schwecke T, Naumann D (2010) Characterization of *Yersinia* using MALDI-TOF mass spectrometry and chemometrics. *Anal Chem* 82, 8464-8475.

Maier T, Klepel S, Renner U, Kostrzewa M (2006) Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Nature Methods: application note*, DOI: 10.1038/NMETH870.

Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pflüger V, Tonolla M, Ravasi D, Fredriksson-Ahoma M, Hächler H (2011) Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF Mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 87, 150-153.

Sulakvelidze A (2000) *Yersiniae* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect* 2, 497-513.

Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.

Tonolla M, Benagli C, De Respini S, Gaia V, Petrini O (2009) Mass spectrometry in the diagnostic laboratory. *Pipette* 3, 20-25.

Tonolla M, Benagli C, Rossi V, Fragoso C, Petrini O (2010) MALDI-TOF MS: a new laboratory option for the diagnosis of clinical infections. *Pipette* 3, 5-10.

Wittwer M, Heim J, Schär M, Dewarrat G, Schürch N (2011) Tapping the potential of intact cell mass spectrometry with a combined data analytical approach applied to *Yersinia* spp.: Detection, differentiation and identification of *Y. pestis*. *Syst Appl Microbiol* 34, 12-19.

### **Glossario e definizioni**

Tassonomia: metodo e sistema di descrizione e classificazione degli organismi (tassonomico: inerente la classificazione).

Similarità: di ciò che è simile, cioè simile, omogeneo, della stessa natura (dendrogramma o albero di similarità).

### **Indirizzo degli autori:**

Istituto Cantonale di Microbiologia, Via Mirasole 22A, 6501 Bellinzona