IZS PB 03/21 RC

Approccio proteomico nell'identificazione batterica: creazione di nuove librerie di riferimento e algoritmi di analisi per la differenziazione dei batteri appartenenti al *Bacillus cereus* group mediante spettrometria di massa MALDI-TOF

RESPONSABILE SCIENTIFICO: DR. DOMENICO GALANTE

La spettrometria di massa MALDI-TOF è attualmente sempre più utilizzata nei laboratori diagnostici come tecnica di routine economica, rapida e affidabile per l'identificazione e la tipizzazione dei microrganismi. Questa metodica analitica si basa sulla ionizzazione di macromolecole biologiche ad alto peso molecolare e sulla separazione degli ioni, in base al loro rapporto massa/carica (*m*/*z*). Gli spettri di massa ottenuti appaiono come un insieme di picchi ionici di diversa intensità, ciascuno corrispondente al valore massa/carica di uno ione molecolare. L'identificazione microbica è possibile perché ogni specie batterica è caratterizzata da uno specifico pattern proteico e quindi da un profilo spettrale caratteristico che ne costituisce l'"impronta digitale". Le proteine svolgono un ruolo importante nella diagnostica di laboratorio in quanto costituiscono circa il 50% del peso secco delle cellule batteriche vegetative e sono presenti in più copie al contrario del DNA; inoltre forniscono buoni segnali bypassando le fasi di estrazione o amplificazione. Un importante limite di questa metodica è che specie microbiche fenotipicamente, biochimicamente e/o geneticamente molto simili tra loro possono essere erroneamente identificate. A questo proposito, in questo studio, abbiamo utilizzato MALDI-TOF MS per analizzare una collezione di 200 ceppi appartenenti al gruppo *Bacillus cereus* (97 *Bacillus anthracis*, 49 *Bacillus cereus*, 1 *Bacillus mycoides*, 18 *Bacillus wiedmannii*, 27 *Bacillus thuringiensis*, 7 *Bacillus toyonensis* e 1 *Bacillus weihenstephanensis*) e per rilevare biomarcatori specifici che permettessero un'identificazione inequivocabile.

Gli spettri di massa sperimentali ottenuti sono stati aggiunti ad una libreria di riferimento interna, ampliando l'attuale libreria commerciale che non include gli spettri di massa di *B. toyonensis* e *B. wiedmannii*. Gli spettri di massa ottenuti sono stati confrontati statisticamente mediante Principal Component Analysis (PCA) che ha rivelato sette diversi cluster, così come atteso. Inoltre, ai fini dell'identificazione, sono stati generati algoritmi dedicati per la rilevazione rapida ed automatica dei picchi ionici caratteristici dopo l'acquisizione degli spettri di massa.

La presenza di biomarcatori specifici può essere utilizzata per differenziare i ceppi all'interno del gruppo *B. cereus* e per effettuare un'identificazione affidabile di *Bacillus anthracis*, agente eziologico dell'antrace, che è il batterio più patogeno e temuto del gruppo. Ciò potrebbe offrire un vantaggio temporale critico per la diagnosi e per la gestione clinica dell'antrace umano anche in caso di attacchi bioterroristici.

Figura 1. Flusso di lavoro per analisi MALDI-TOF MS

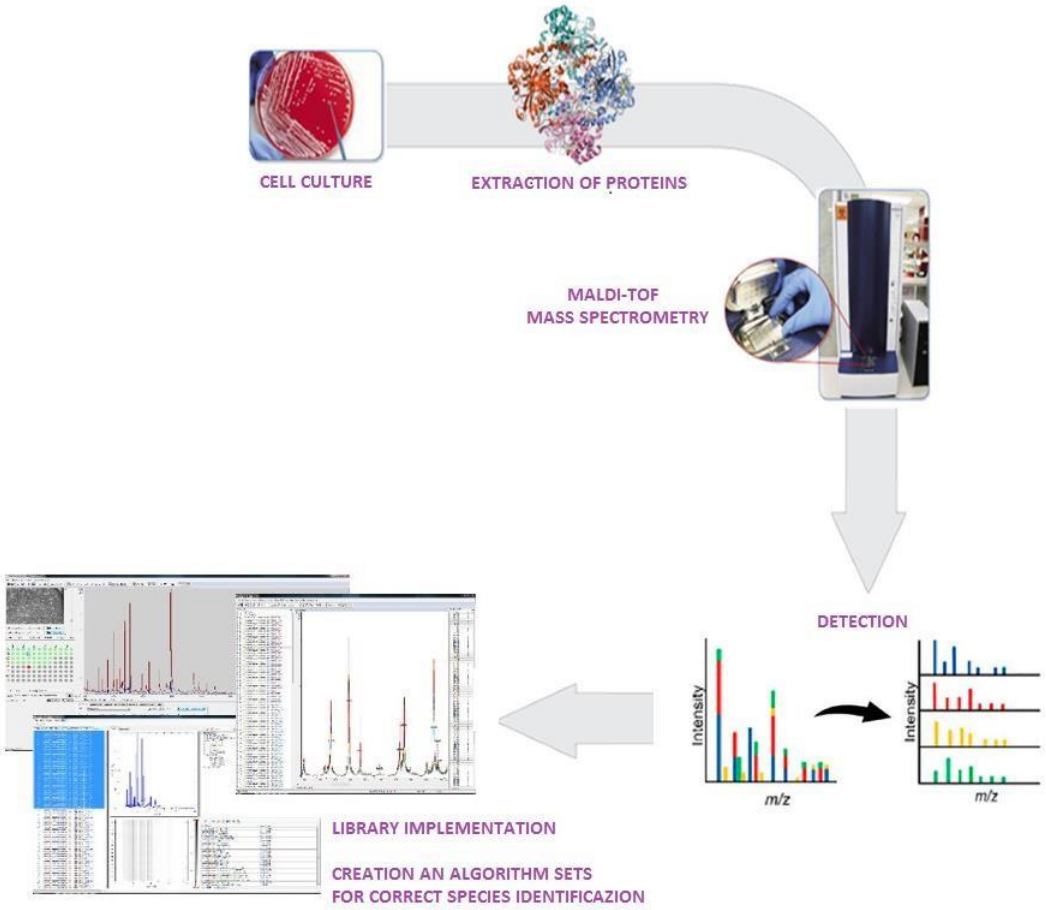


Figura 2. Spettri di massa delle sette diverse specie del gruppo *B.cereus* analizzate in questo studio nell'intervallo di massa da 2 a 20 kDa: *B. anthracis* (A), *B. cereus* (B), *B. mycoides* (C), *B. thuringiensis* (D), *B. toyonensis* (E), *B. weihenstephanensis* (F) e *B. wiedmannii* (G). Gli spettri di massa sono stati ottenuti utilizzando il software FlexAnalysis (v.3.4, Bruker Daltonik GmbH, Brema, Germania), normalizzandoli ed eliminando il rumore di fondo.

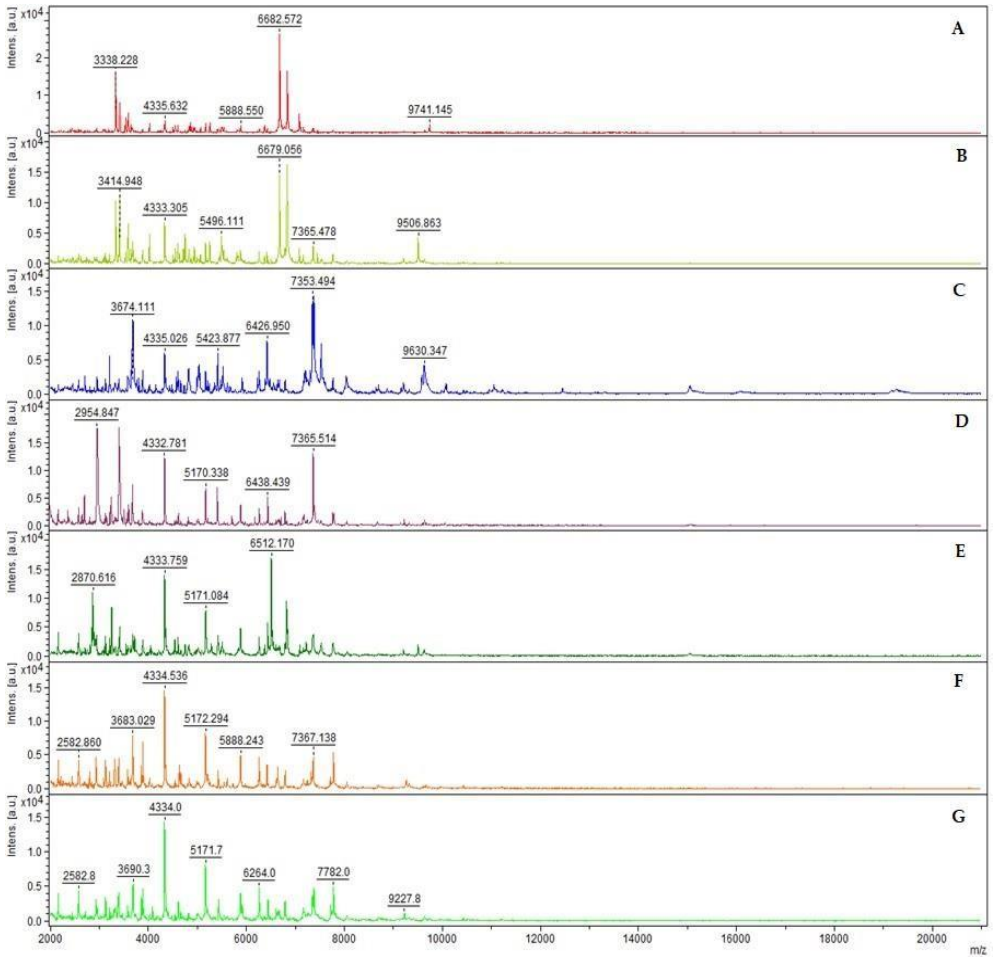
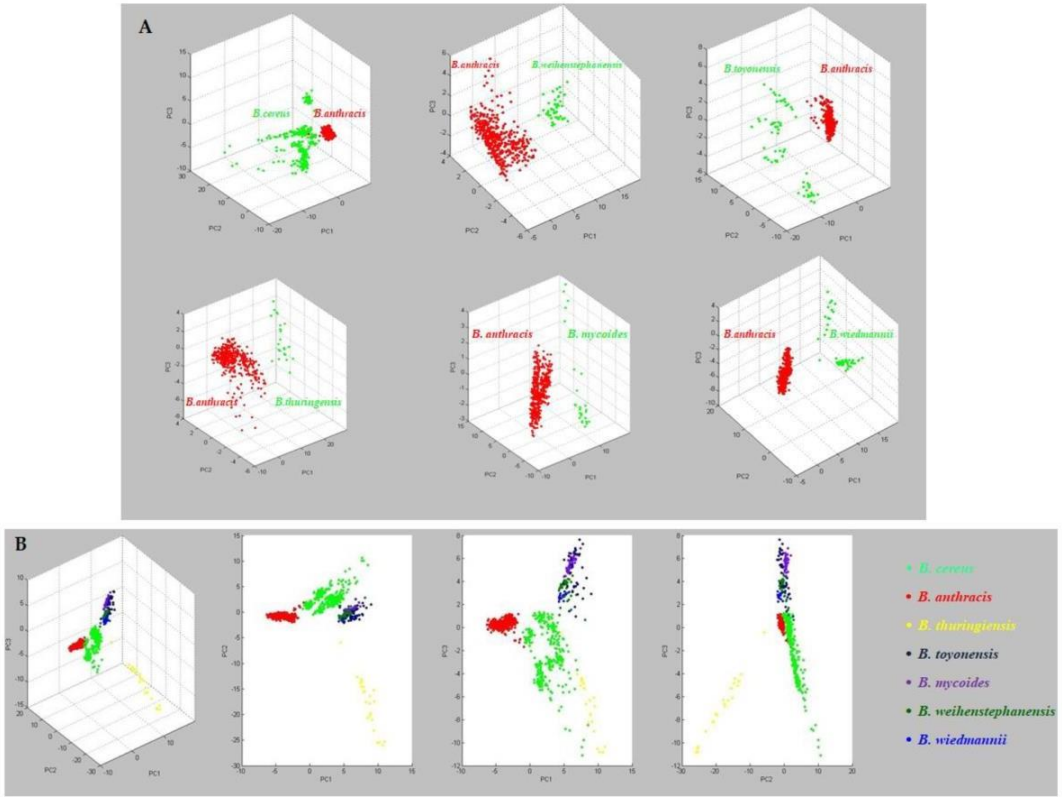


Figura 3. (A) Confronto statistico mediante analisi delle componenti principali (PCA) tra spettri di massa di *B. anthracis* e di altre specie appartenenti al gruppo *B. cereus* utilizzando il software ClinProTools (v.3.0, Bruker Daltonik GmbH, Brema, Germania). (B) La PCA ha raggruppato gli isolati analizzati in 7 diversi cluster, corrispondenti alle sette diverse specie analizzate.



Bibliografia di riferimento essenziale

- **Bazinet A.L.** Pan-genome and phylogeny of *Bacillus cereus* sensu lato. *BMC Evol. Biol.* 2017; 17:176.
- **Lasch P., et al.** Identification of *Bacillus anthracis* by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and artificial neural networks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75:7229–7242.
- **Pauker, V.I. et al.** Improved Discrimination of *Bacillus anthracis* from Closely Related Species in the *Bacillus cereus* Sensu Lato Group Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.*2018;56(5): e01900-17.