ACADEMIA DE CIÊNCIA & TECNOLOGIA

ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA CLÍNICA

VANTAGENS E DESVANTAGENS DE MALDI-TOF MS EM RELAÇÃO AOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS TRADICIONAIS

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

MARCELO PIRES BARBOSA

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SÃO PAULO, BRASIL

2015

Vantagens e Desvantagens de MALDI-TOF MS em Relação aos Métodos Microbiológicos Tradicionais

Com a mudança na taxonomia de micro-organismos resultante do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e o aumento de infecções oportunistas causadas por micro-organismos anteriormente considerados não patogênicos, a microbiologia tradicional, baseada em aspectos fenotípicos, tem se tornado cada vez mais complexa. A necessidade de provas adicionais encarece e torna mais demorada a identificação de novas espécies, bem como das espécies já conhecidas. Ao mesmo tempo, as técnicas de biologia molecular, ótimas para pesquisa, não tem a mesma utilidade em laboratórios clínicos, devido, principalmente, ao alto custo.

Assim, era esperado que uma técnica rápida, sensível e relativamente barata como *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) tivesse tão rápida aceitação no mundo da microbiologia.

Espectrometria de massa é uma técnica na qual os analitos são separados e detectados de acordo com sua relação massa/carga. Para isso, é necessário que as moléculas sejam primeiramente ionizadas e depois detectadas. Diversas técnicas de ionização foram desenvolvidas ao longo dos anos, mas a maioria cauda a fragmentação de grandes moléculas em íons menores. Apenas após o desenvolvimento das chamadas técnicas de ionização branda, como MALDI-TOF e ESI (Electrospray Ionization), foi possível usar espectrometria de massa para a análise de proteínas, já que essas técnicas são capazes de ionizar grandes moléculas, mantendo-as intactas. Da mesma forma, existem várias formas de detecção desses íons. Sendo assim, no termo MALDI-TOF, “MALDI” se refere à forma de ionização da amostra e “TOF” se refere à forma de detecção [1,2,3].

Na metodologia de ionização MALDI, a amostra é depositada em uma placa junto com uma matriz. Após a cristalização dessa mistura, a placa é bombardeada com um laser, e a energia é absorvida pela matriz, o que leva à

ionização da amostra. Em microbiologia, geralmente se coloca uma colônia do micro-organismo a ser identificado e se usa ácido α-ciano-4-hidroxicinamico como matriz. Essa metodologia leva a geração de íons predominantemente monovalentes. Após a ionização, os íons são acelerados por meio de um campo eletrostático através de um tubo submetido a vácuo, até colidirem com um detector no fim do tubo. O tempo necessário até a colisão é chamado "tempo de voo", ou *Time of Flight* (TOF), e depende da relação massa/carga dos íons. Íons. Após a detecção, o equipamento gera um gráfico com a relação massa/carga em um eixo e a quantidade de cada íon em outro. Como a maioria dos íons gerados tem a mesma carga, o gráfico representa a distribuição das proteínas do micro-organismo de acordo com sua massa, que é comumente chamado de espetro. O espectro da amostra é então comparado com espectros de amostras de referência em um banco de dados e uma lista das espécies mais relacionadas é gerada, cada uma com um valor indicando o grau de confiabilidade da identificação. Dependendo do grau de confiabilidade, a amostra é identificada até o nível de gênero ou espécie [2,3].

Dentre as principais vantagens dessa metodologia sobre os métodos tradicionais estão o menor tempo necessário para identificação tanto de bactérias quanto de fungos [4,5,6], a alta sensibilidade e especificidade [7,8,9,10,11] dessa identificação, a menor geração de resíduos [12] e o menor custo por análise [4,6,12]. Entre as desvantagens, estão o alto custo de aquisição e manutenção [3,6], e a dificuldade de identificação de certas espécies[2,7,13].

Estudos comparando MALDI-TOF com métodos fenotípicos automatizados demonstram que MALDI-TOF tem especificidade no mínimo tão alta e até maior que os métodos tradicionais, com taxas de identificação correta, geralmente superiores a 95%[2,7,10]. Essa alta especificidade pode ser explicada pelo fato de que a maioria das moléculas detectadas pela metodologia MALDI-TOF MS são proteínas ribossomais[2,13], que são altamente conservadas e pouco suscetíveis a alterações decorrentes de variação das condições ambientais. Contudo, MALDI-TOF apresenta dificuldade de identificação de espécies que possuem perfis de proteínas muito parecidos, como *Escherichia coli* e *Shigella sp* ou *Streptococcus pneumoniae* e alguns *Streptocuccus viridans*[2,7], por exemplo. *E. coli* pode ser facilmente diferenciada

de *Shigella sp* por um teste rápido de indol. Já *S. pneumoniae* e *viridans* tem diferenciação problemática por outras metodologias também. Assim, ainda que MALDI-TOF não deva ser utilizada como única técnica para a identificação dessas espécies, isso não representa uma desvantagem muito significativa.

Além disso, MALDI-TOF demonstrou ser mais rápida e mais barata que os métodos tradicionais de identificação[4,6,12]. Apesar de a identificação tradicional poder ser mais rápida no caso de micro-organismos para os quais estão disponíveis testes rápidos, como *S. aureus* e *C. albicans*, por exemplo, a maioria dos micro-organismos são identificados pelo menos 1 dia antes por MALDI-TOF[4]. E essa diferença pode ser ainda maior no caso de micro-organismos fastidiosos, bioquimicamente inertes ou de crescimento lento[4]. Além disso, a possibilidade de realizar a análise direto de garrafas de hemocultura positivas pode reduzir ainda mais o tempo necessário para a identificação[14,15].

Apesar disso, ainda não está claro o impacto dessa rápida identificação para o paciente. Isso por que, apesar de a identificação da espécie causadora da infecção poder auxiliar na escolha de um tratamento inicial, o tratamento definitivo geralmente depende do resultado do antibiograma, que segue sendo feito da mesma forma. Alguns estudos indicam que é possível detectar β-lactamases e carbapenemases através da mudança na massa do antibiótico após a hidrólise por essas enzimas, porém esses testes não são capazes de detectar outras formas de resistência e nem resistência a outros antibióticos[16,17].

Já quanto à redução de custos, parece não haver dúvidas das vantagens de MALDI-TOF, para laboratórios de grande porte. Embora tenha um alto custo de aquisição e manutenção, e economia com meios de cultura e reativos é significativa[4,6,12]. Isso se deve ao fato de MALDI-TOF utilizar os mesmos reagentes para a identificação de todos os micro-organismos, ao contrário de metodologias tradicionais, que necessitam de uma ampla gama de meios de cultura e reagentes para a identificação. Em um estudo nos EUA, o custo de reagentes por identificação foi de U$3,59 para as metodologias tradicionais e U$0,43 para MALDI-TOF. Quando foram incluídos os custos de

manutenção e mão de obra, os custos foram U$6,50 e U$3,14 respectivamente, representando uma economia de 51% ao longo de 1 ano[6]. Em outro estudo similar, a economia foi de 56%[4].Outro estudo, na França, resultou em economia de 89% em 1 ano[12]. Além dos fatores já mencionados, este estudo levou em consideração a redução de custos com sequenciamento de DNA para espécies incomuns e custos decorrentes da menor geração de resíduos. Outra possível fonte de economia, não avaliada em nenhum dos estudos analisados, é a menor necessidade de controle de qualidade, já que uma menor variedade de meios é utilizada. Deve-se levar em conta que esses estudos foram realizados em outros países, e os custos no Brasil podem ser diferentes. Além disso, essa metodologia ainda é financeiramente inviável para laboratórios de pequeno porte, já que a economia com reagentes seria insuficiente para cobrir os altos custos de aquisição e manutenção.

Em suma, MALDI-TOF é uma tecnologia muito adequada para uso em laboratórios de microbiologia clínica. Sua capacidade de fornecer resultados precisos em pouco tempo, aliada a menor utilização de reagentes e ao consequente menor custo por análise, a torna muito atrativa para laboratórios que podem arcar com o alto custo de aquisição.

Referências

1. **Burtis, C. A.; Ashwood, E. R.; Burns, D. E**. - Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5° ed. Philadelphia: Saunders Company, 2011, 2256p.
2. **Croxatto, A.; Prod'hom G.; Greub G.** 2011. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* **36:**380-407.
3. **Patel R.** 2013. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clinical Infectious Deseases* **57:**564-72.
4. **Tan, K. E.; Ellis, B.C.; Lee, R.; Stamper, P.D.; Zhang, S. X.; Carroll, K. C.** 2012. Prospective evaluation of a matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in a hospital clinical

microbiology laboratory for identification of bacteria and yeasts: a bench-by-bench study for assessing the impact on time to identification and cost-effectiveness. *Journal of Clinical Microbiology* **50:**3301-3308.

5. **Dixon, P.**; **Davies, P.; Hollingworth, W.; Stoddart, M.; MacGown, A.** 2015. A systematic review of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry compared to routine microbiological methods for the time taken to identify microbial organisms from positive blood cultures. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Deseases*. **34:**863-876.
6. **Tran, A.; Alby, K.; Kerr, A.; Jones, M.; Gilligan, P. H.** 2015. Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **53:**2473-2479.
7. **Van Veen, S. Q.; Claas, E.C. J.; Kuijper, E. J.** 2010. High throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* **48:**900-907.
8. **Jamal, W. Y.; Shahin, M.; Rotimi, V. O**. 2013. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **62:**540-544.
9. **Brader, O. et al.** 2011. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* **17:**1359-1365.
10. **Benagli, C.; Rossi, V.; Dolina, M.; Tonolla M.; Petrini, O.** 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One* **6:**e16424.
11. **Bizzini, A.; Durussel, C.; Bille, J.; Greub, G.; Prod'hom, G.** 2010. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **48:**1549-1554.

12. **Gaillot, O. et al.** 2011. Cost-effectiveness of switch to matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine bacterial identification. *Journal of Clinical Microbiology* **49:**4412.
13. **De Carolis, E.; Vella, A.; Vaccaro, L.; Torelli, R.; Spanu, T.; Fiori, B.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M.** 2014. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *The Journal of Infection in Developing Countries* **8:**1081-1088.
14. **Egli, A.; Osthoff, M.; Goldenberger, D.; Halter, J.; Schaub, S.; Steiger, J.; Weisser, M.; Frei, R.** 2015. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF) directly from positive blood culture flasks allows rapid identification of bloodstream infections in immunosuppressed hosts. *Transplant Infectious Disease* **17:**481-487.
15. **Morgenthaler, N. G.; Kostrzewa, M.** 2015. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: Review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper kit. *International Journal of Microbiology*, 2015.
16. **Kostrzewa, M.; Sparbier, K.; Maier, T.; Schubert S.** 2013. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics – Clinical Applications* **7:**767-778.
17. **Papagiannitsis, C. C.; Študentová, V.; Izdebski, R.; Oikonomou, O.; Pfeifer, I.; Petinaki, E.; Hrabák J.** 2015. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH4HCO3, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *Journal of Clinical Microbiology* **53:**1731-1735.