



Impacto das novas tecnologias de identificação bacteriana no controle das IRAS

MALDI-TOF

Alberto Chebabo

Chefe do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias – HUCFF/UFRJ

Infectologista do DASA – RJ



Conflitos de Interesse

- ▶ Ministrei aulas para MSD, GSK, Abbott e Pfizer
- ▶ Participei de eventos nacionais e internacionais com apoio de MSD e Pfizer
- ▶ Consultoria para Pfizer, BioMérieux e ANVISA



MALDI-TOF

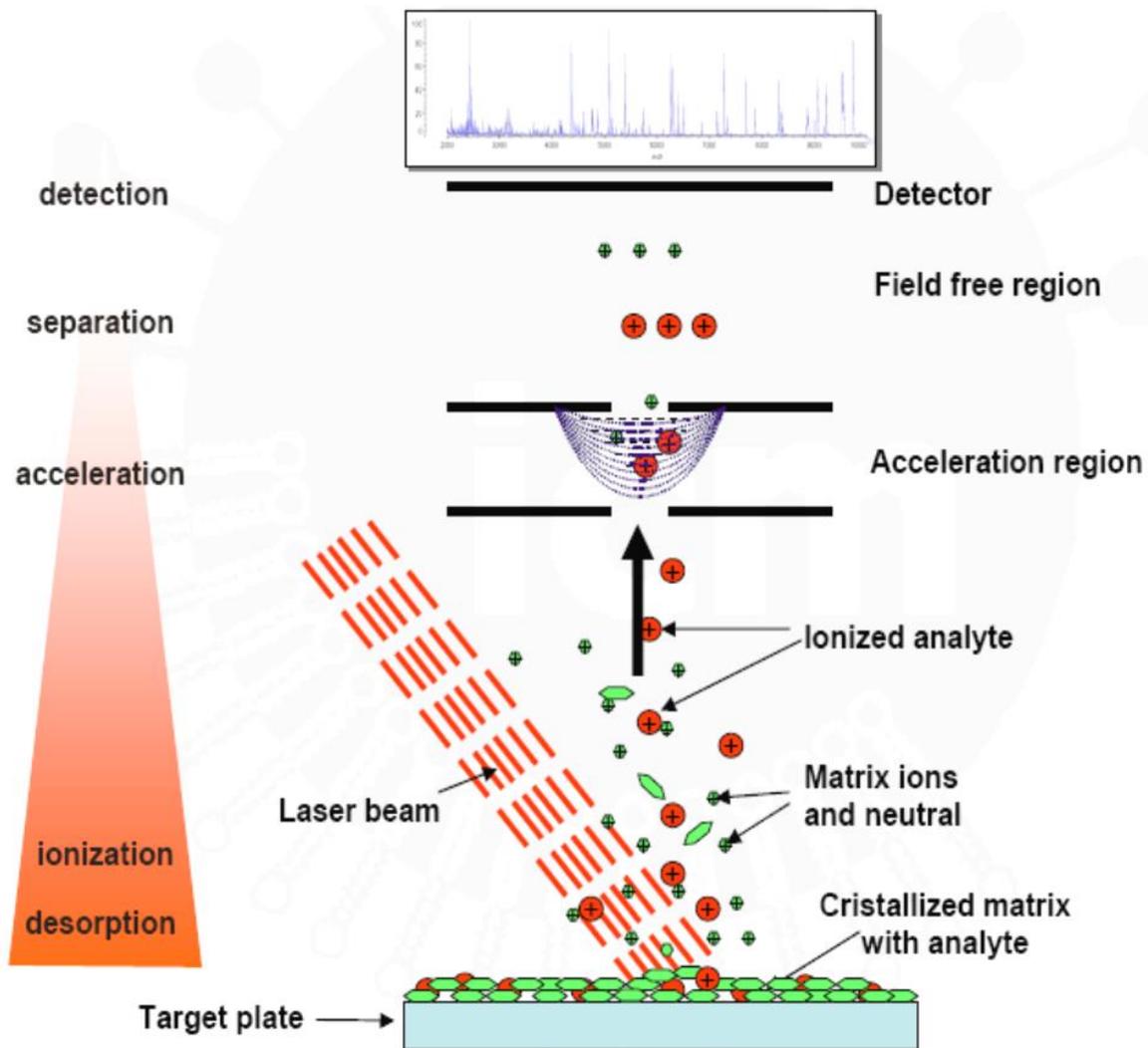
- ▶ Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight (MALDI-TOF)
- ▶ Aplicação em áreas da ciência desde final dos anos 80
- ▶ Desenvolvimento do WC- MS (whole cell mass spectrometry) com aplicação em microbiologia
- ▶ O princípio MS consiste em ionizar e desadsorver compostos químicos para gerar moléculas carregadas e medir sua relação massa-carga.



Como Funciona?

- ▶ A partir da ionização das proteínas do ribossomo, os íons são acelerados por campo elétrico
- ▶ Tempo da viagem até o detector é medido
- ▶ A velocidade do íon depende da relação massa–carga
- ▶ Íons de baixo peso viajam mais rápido do que íons mais pesados
- ▶ A detecção dos íons gera um espectro através de espectrometria de massa, que é comparado com um banco de dados, levando à identificação bacteriana

MALDI-TOF



Mass Spectrometry: the velocity of the ion depends on the mass-to-charge (m/z) ratio



Time-Of-Flight to the detector is recorded



Ions are accelerated by an electric field of known strength



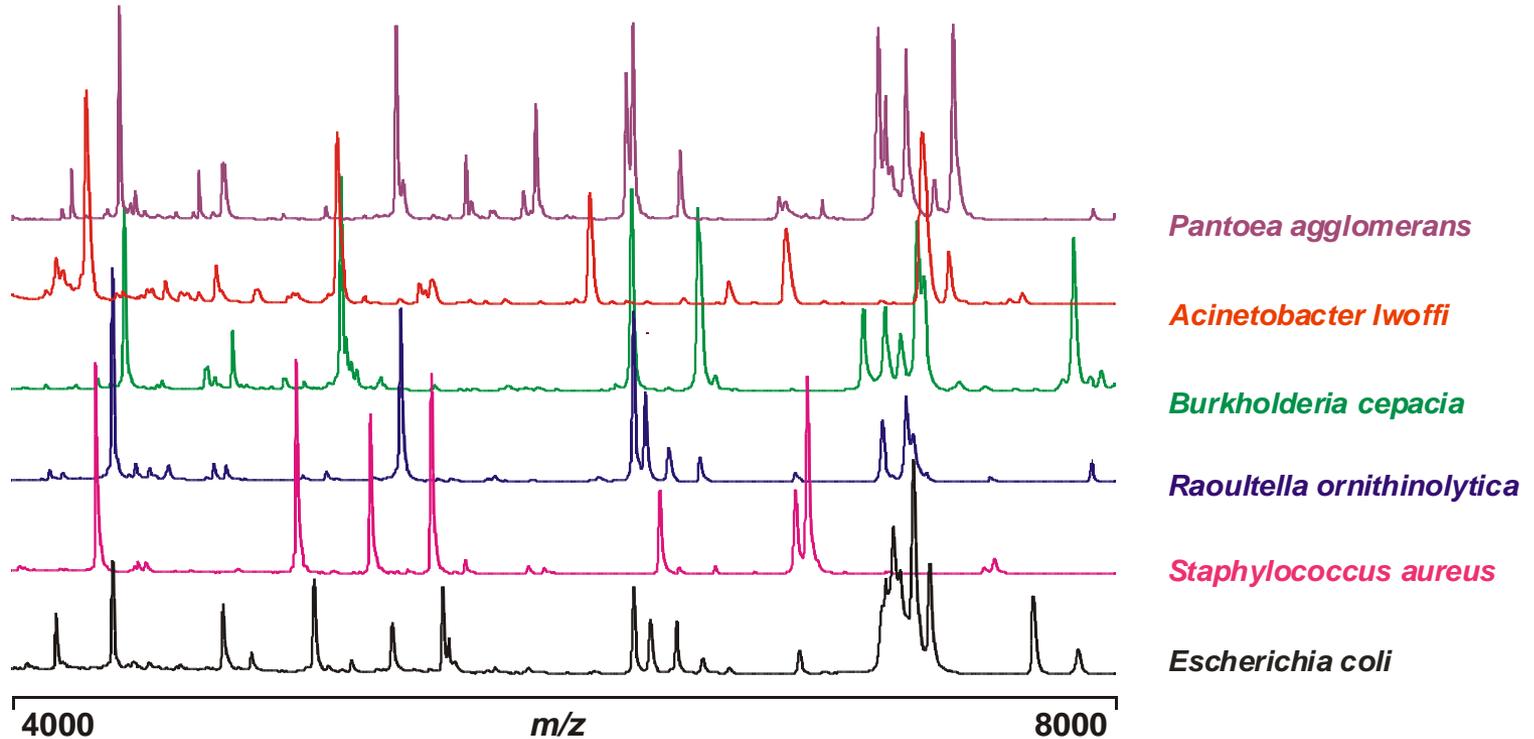
Laser Desorption/Ionization: matrix is ionized by the laser pulse and transfers part of its charge (+) to the molecules (proteins) to be analyzed



Matrix-Assisted: sample is embedded in a matrix* to protect the biomolecule from being destroyed by direct laser beam and to facilitate vaporization and ionization



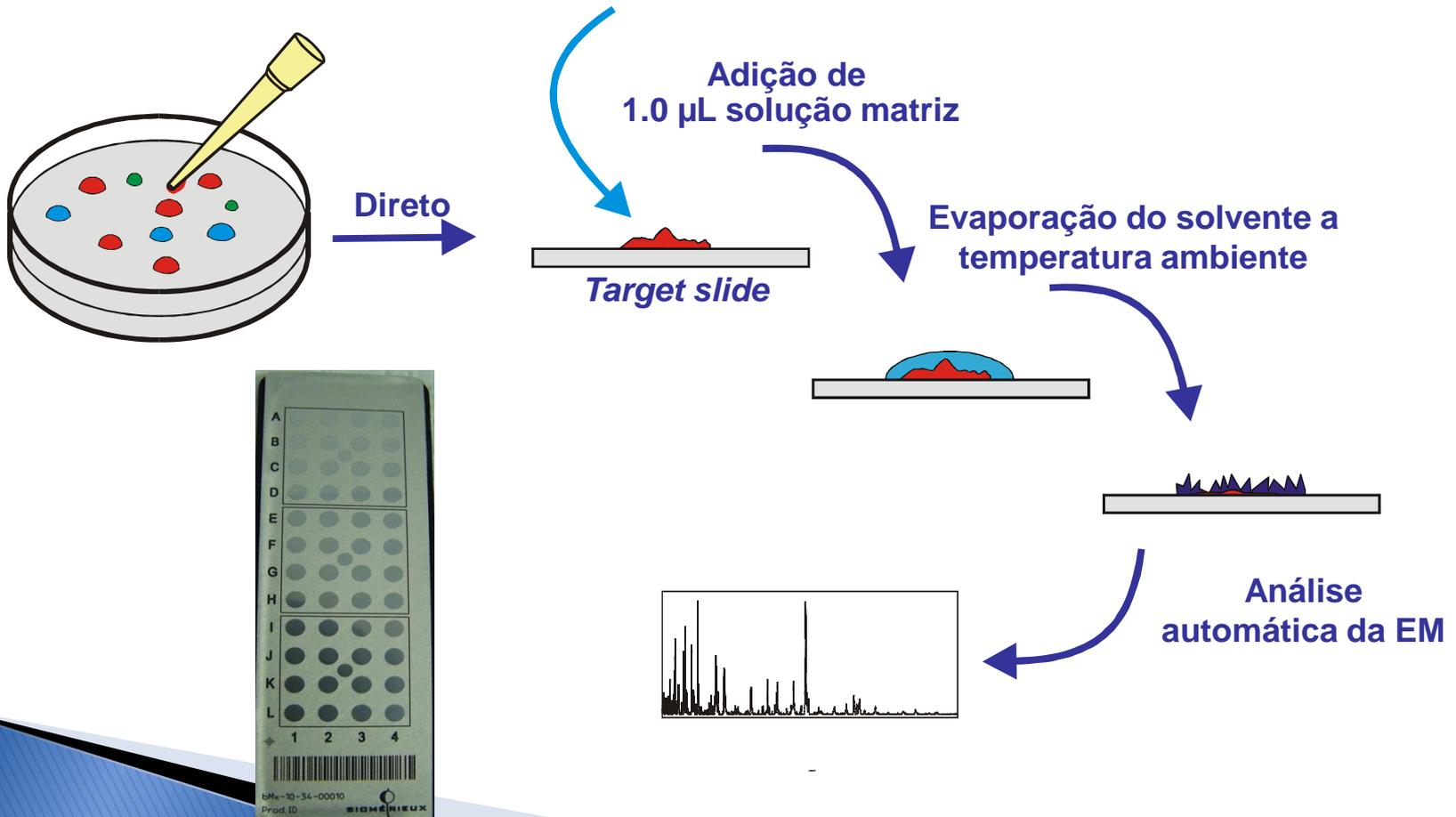
Padrões de Espectros de Bactérias Conhecidas





Utilização na Rotina

Fungo ou Micobactéria:
“Extração” no próprio slide com 25% de ácido fórmico





Tempo de Leitura

- ▶ Entre 30 a 1:30 segundos por isolado

Fluxo de trabalho	Tempo (min)		
	n = 5 isolados	n = 24 isolados	n = 96 isolados
Aplicação na placa	1	5	16
Aplicação da Matriz	1	3	10
Secagem	2	2	7
Leitura no sistema	5	12	43
Tempo para o resultado			
Total	9	22	76



Tempo e Custo

Identificação Convencional

Bacterium (<i>n</i> ^a)	Cost (US\$)		Turnaround time (h)	
	Avg per isolate	Total	Avg	Total
<i>E. coli</i> (216)	0.20	43	1	216
<i>S. aureus</i> (55)	1.50	83	1	55
Other (449)	10.00	4,490	24	10,776
Total (720)		4,616	15	

^a *n*, no. of isolates.

MALDI-TOF

Test (<i>n</i> ^a)	Cost (US\$)		Turnaround time (h)	
	Avg per isolate	Total	Avg	Total
High-confidence MALDI-TOF MS (636)	0.50	318	0.08	53
Ambiguous MALDI-TOF MS (84) ^b	10.50	882	24	2,016
Total (720)		1,200	3	

^a *n*, no. of isolates.

^b Cost and time of conventional identification added to isolates with ambiguous MALDI-TOF MS results are given.



Custo do Exame

**Custo total por Identificação
(slide + matriz):
Aprox R\$1.50**



Sistemas Disponíveis

Bruker



Microflex

Flight Tube 1,05m
Resolution 3500 (FWHM*)
Mass range: 1-300k Da
Accuracy 75 ppm (intrnl std)

**Shimadzu/Bio
Mérieux**



AXIMA Assurance

1,20m
5000
1-500k Da
30 ppm (intrnl std)

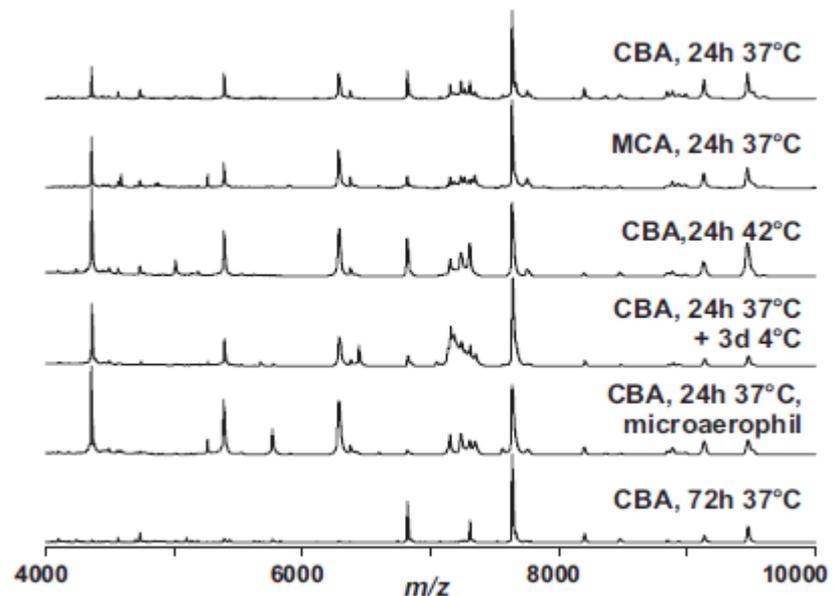
*Full Width of a peak at Half of its Maximum height = Δm
Resolution $r = m / \Delta m$



Acurácia e Reprodutibilidade

- ▶ Maior parte dos picos medidos são de proteínas ribossômicas
- ▶ Proporciona estabilidade na leitura, mesmo em bactérias em diferentes fases de crescimento ou semeadas em diferentes meios de cultura

Enterobacter aerogenes





Acurácia e Reprodutibilidade

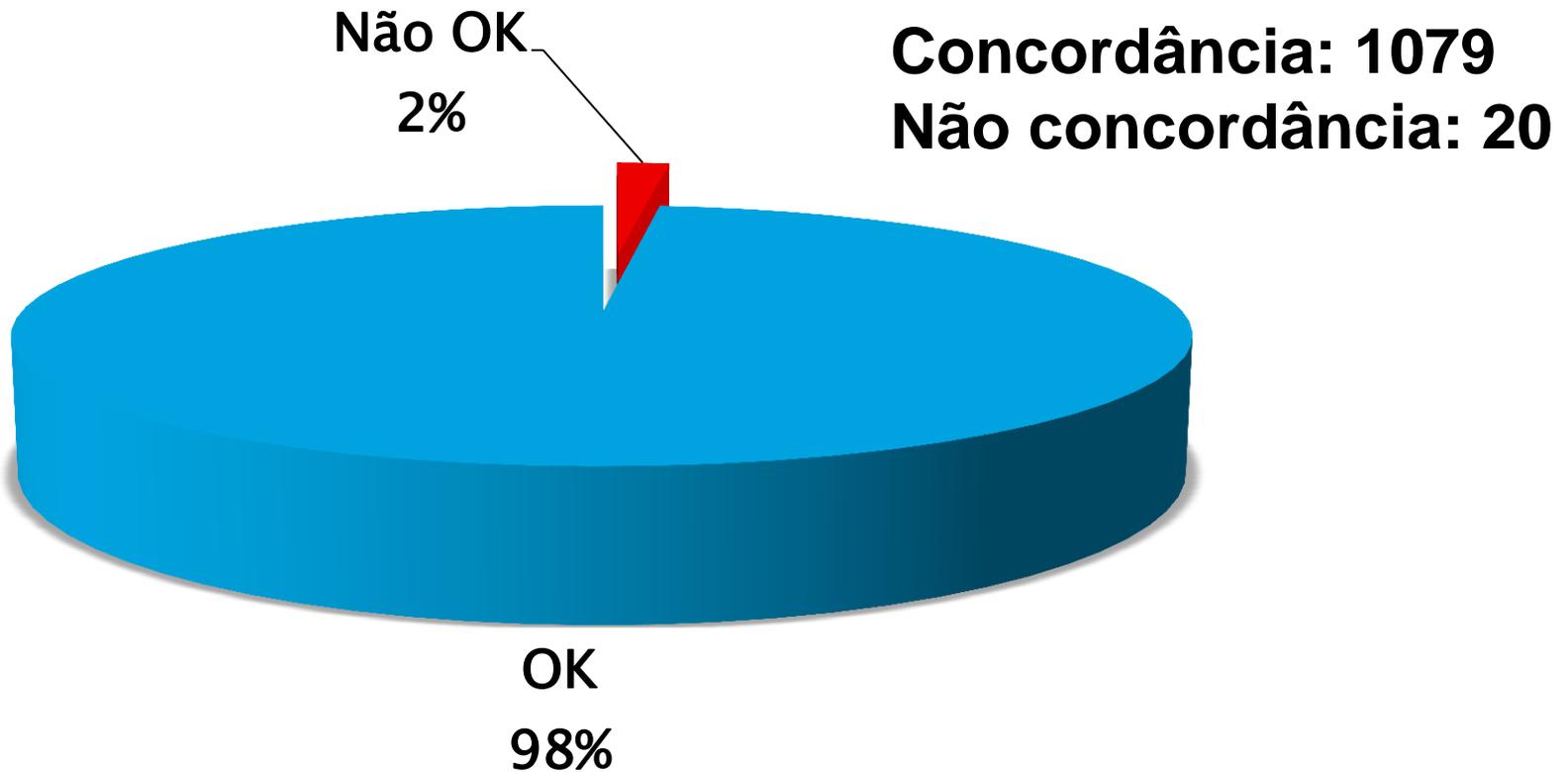
- ▶ Comparação com métodos moleculares permitiram reconhecimento dos espectros lidos e a formação do banco de dados.
- ▶ Estudos mostram correlação de 98 - 99% em comparação com identificação fenotípica e biologia molecular

Welker M, Moore ERB. Syst Applied Microbiol. 2011;34:2-11
Emonet S et al. Clin Microbiol Infect.2010;16:1604-13



Validação DASA

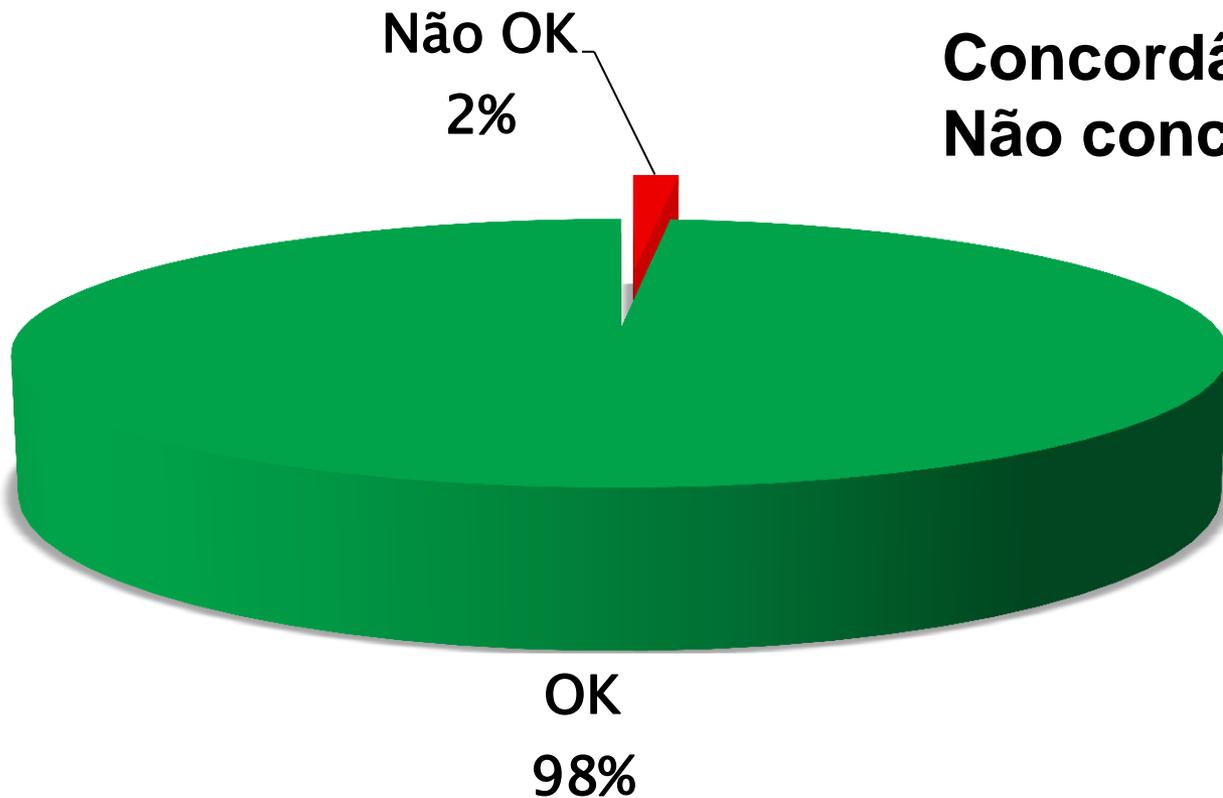
- ▶ Testados 1099 microrganismos





Validação DASA

- ▶ Gram Negativos = 649



Concordância: 639
Não concordância: 10



Discrepâncias – Gram Negativos

ID Convencional	Método Convencional	Maldi-TOF
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Vitek	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Vitek	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	API	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Providencia stuartii</i>	Vitek	<i>Morganella morganii</i>
<i>Raoultella planticola</i>	Vitek	<i>Enterobacter amnigenus</i>
<i>Serratia fonticola</i>	Vitek	<i>Escherichia coli</i>
<i>Shigella boydii</i>	Vitek	<i>Escherichia coli</i>
<i>Shigella flexneri</i>	Vitek	<i>Escherichia coli</i>
<i>Shigella group</i>	Vitek	<i>Escherichia coli</i>
<i>Shigella sonnei</i>	Vitek	<i>Escherichia coli</i>



Validação DASA

▶ CGP= 348





Discrepâncias – *Enterococcus* e *Streptococcus*

ID Convencional	Método Convencional	Maldi-TOF
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Vitek	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	Vitek	<i>Enterococcus hirae</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CPS + Latex Ag	<i>Streptococcus gallolyticus ssp gallolyticus</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	CPS + Latex Ag	<i>Enterococcus faecalis</i>



Discrepâncias – *Staphylococcus*

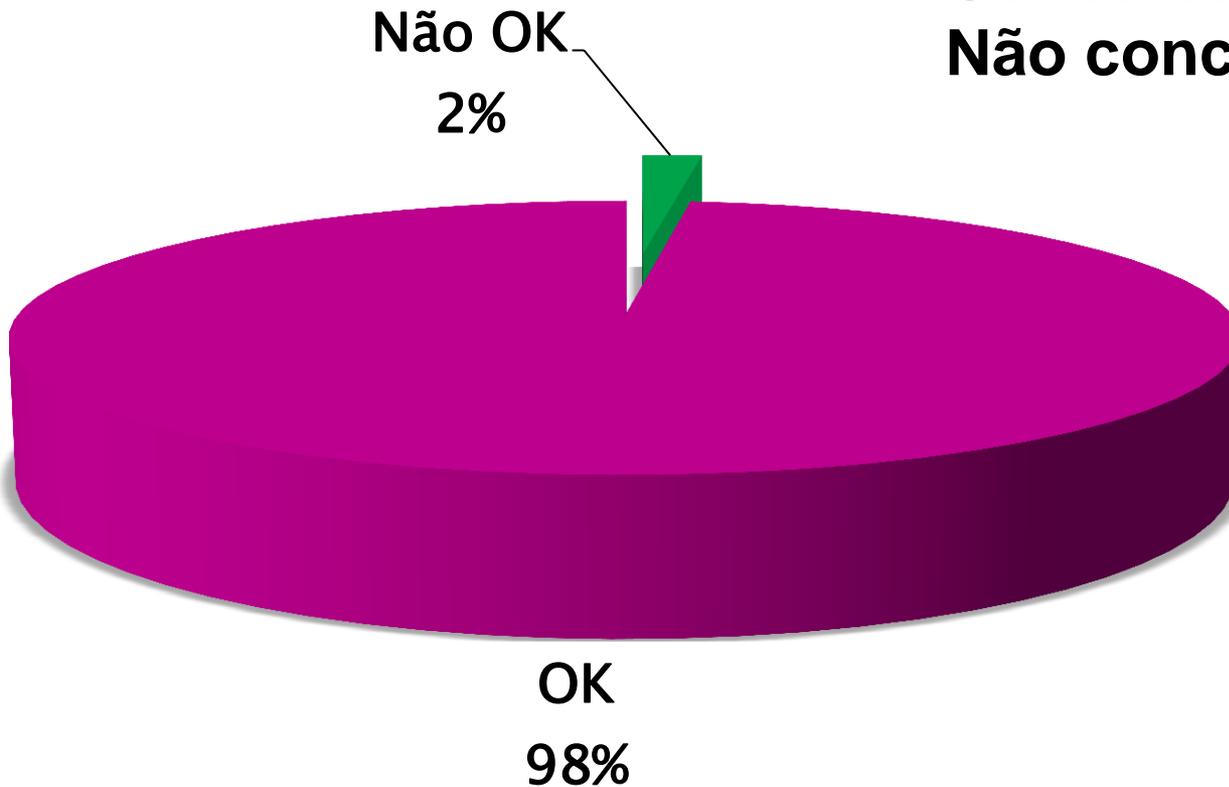
ID Convencional	Método Convencional	Vitek	Maldi-TOF
<i>Staphylococcus aureus</i>	CPS + Latex Ag	<i>S. hominis</i> ssp <i>hominis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	CPS + Latex Ag	<i>S. hominis</i> ssp <i>hominis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	CPS + Latex Ag	<i>S. cohnii</i> ssp <i>cohnii</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
<i>Staphylococcus warneri</i>	Vitek		<i>Staphylococcus haemolyticus</i>



Validação DASA

▶ Leveduras = 102

Concordância: 100
Não concordância: 2





Discrepâncias – Leveduras

ID Convencional	Método Convencional	Maldi-TOF
<i>Candida parapsilosis</i>	Chromoagar + API	não identificado
<i>Candida parapsilosis</i>	Chromoagar + API	não identificado



Vantagens

- ▶ **Rapidez na identificação**
 - Redução de 24 – 48 h na liberação da identificação em culturas
- ▶ **Baixo custo de insumos**
 - Utiliza slide com 96 ou 48 alvos + Matriz
 - Avaliar custo do equipamento
 - $\frac{1}{4}$ do custo em relação aos métodos automatizados
- ▶ **Acurácia na identificação de bactérias**
 - 98 – 99% de correlação com métodos padrão
- ▶ **Proporciona melhor escolha e/ou descalonamento precoce do esquema antibiótico**



Limitações

- ▶ Identificação rápida, mas TSA com tempo convencional
 - Sem informação rápida de resistência
 - Descalonamento apenas para espécie (ie, ATB para CGP)
 - Aguardar tempo convencional para resistência para modificação do esquema ATB
- ▶ Limitações na identificação de fungos e micobactérias
 - Dificuldades com fungos filamentosos
 - Espectro de proteínas diferente para cada condição de crescimento, poucas informações nos bancos de dados



Limitações

- ▶ Necessita isolamento da colônia para identificação
 - Aguardar crescimento da colônia em placa
- ▶ Não consegue resultados adequados em culturas mistas

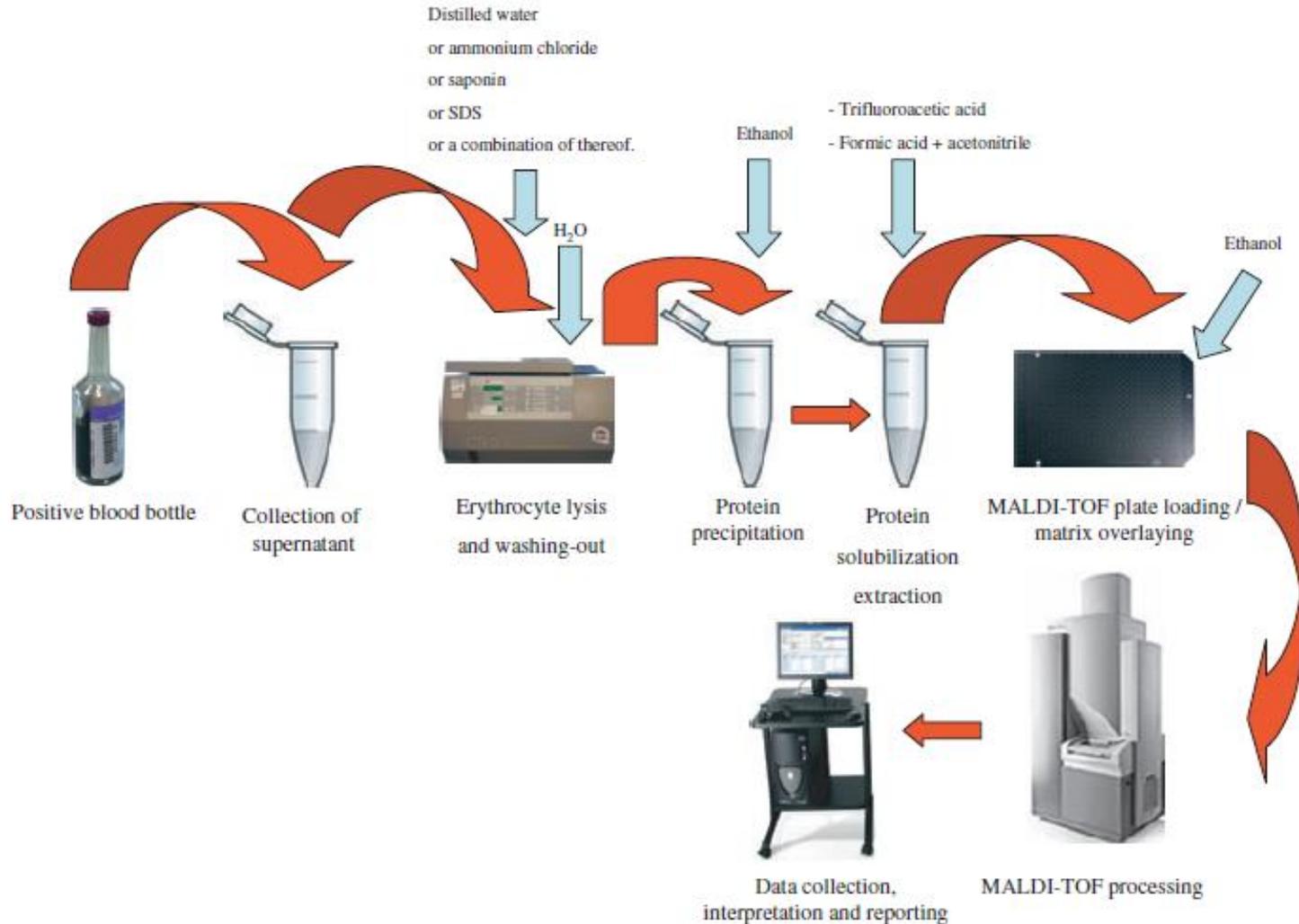


Aplicações Futuras

- ▶ Identificação direta do material clínico
 - Hemoculturas, urina e líquidos corpóreos, sem necessidade de semeadura primária
 - Metodologia em validação
 - Necessidade de eliminar hemácias e hemoglobina
 - Protocolos utilizam centrifugação e filtração do material
 - Estudos com identificação de 66 – 76 % de culturas monomicrobianas a partir de hemoculturas
 - Dificuldade maior na identificação de CGP, principalmente *Streptococcus* spp.
 - Redução de até 30 h na liberação da identificação
 - Limitações para materiais com cultura mista (secreções respiratórias)



Técnica de Isolamento Direto de Hemoculturas



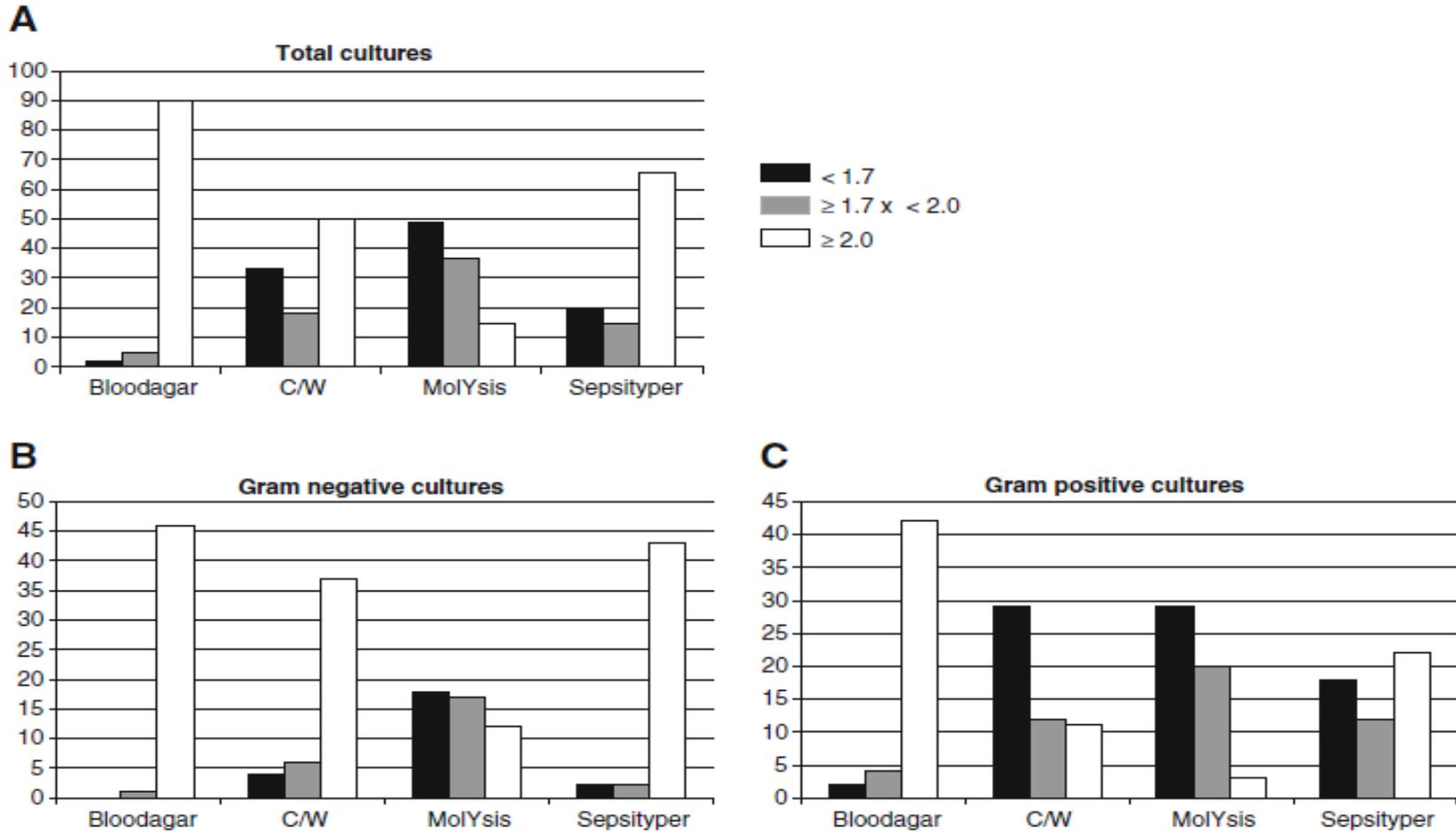


Avaliação de Metodologias para Identificação Direta de HCT

- ▶ 101 hemoculturas BacT/Alert
- ▶ Identificação inadequada
 - Método de centrifugação/lavagem: 35%
 - MolYsis Basic 5: 49,5%
 - Sepsityper: 22%
- ▶ Gram positivo
 - Identificação correta em 33/52 (64%)
- ▶ Gram negativos
 - Identificação correta em 45/47 (96%)



Avaliação de Metodologias para Identificação Direta de HCT





Apropriação da Terapia

- ▶ Apesar de 31,2% de erro na identificação direta da hemocultura
 - Aumento de 11,3% na proporção de pacientes em uso de antibiótico apropriado após 24 h de posituação da hemocultura

Table 1. Number of correct and incorrect direct MALDI-TOF MS identification in 77 monomicrobial episodes.

	Gram positive cocci	Gram positive bacilli	Gram negative bacilli	Total
Correct identification score ≥ 2.0	6 (11.8%)	-	14 (60.9%)	20 (26.0%)
Correct identification $1.7 \leq \text{score} < 2.0$	21 (41.2%)	2 (66.7%)	6 (26.1%)	29 (37.7%)
No reliable identification	21 (41.2%)	1 (33.3%)	2 (8.7%)	24 (31.2%)
No MALDI-TOF MS	3 (5.9%)		1 (4.3%)	4 (5.2%)
Total	51 (100%)	3 (100%)	23 (100%)	77 (100%)



Apropriação da Terapia x MALDI-TOF

Table 4. Effect of direct MALDI-TOF MS on proportion of appropriate treatment.

	Direct MALDI-TOF MS	Standard care
% (n) of episodes with appropriate therapy < 24 h after positive BC ^a	75.3% (67)*	64.0% (105)*
% (n) of episodes with inappropriate therapy < 24 h after positive BC ^a	4.5% (4)*	14.6% (24)*
% (n) of episodes without antibiotic therapy < 24 h after positive BC ^a	20.2% (18) (6.7% (6) other interventions ^b , 13.5% (12) contaminated BC)	21.4% (35) (4.3% (7) other interventions ^b , 11.0% (18) contaminated BC, 6.1% (10) not applicable ^c)

^ablood culture, ^bremoval of intravenous catheters, ^cpalliative care or patient died shortly after blood culture was positive.

*p value 0.01.

doi:10.1371/journal.pone.0032589.t004

Vlek A *et al.* Plos One.2012;7(3):e32589



Identificação Direta por Maldi-Tof MS e Impacto na Terapia

- ▶ 243 pacientes com hemocultura positiva e 277 identificações diretas
- ▶ 61,01% de identificação confiável (169/277)
- ▶ 71,12% (197/277) das identificações transmitidas para o médico assistente
- ▶ 88,32% (174/197) das hemoculturas transmitidas tiveram resultado confirmados com identificação convencional
- ▶ Houve modificação do regime de tratamento em 13,38% dos adultos e 2,5% das crianças



Identificação de Mecanismos de Resistência

- ▶ Incorporação no banco de dados de proteínas como betalactamases ou alterações proteicas que conferem resistência mediadas pelo gen *mecA*
- ▶ Mecanismos de resistência induzíveis podem ser mais difíceis de serem detectados ou interpretados
 - Presença da enzima sem expressão de atividade



Identificação de Mecanismos de Resistência e Virulência

- ▶ Identificação de proteínas de virulência
 - Aparecimento do pico 4448 de relação massa/carga em *S. aureus* relacionado à presença de PVL (sensibilidade: 100%, especificidade: 90,6%)
- ▶ Identificação de *A. baumannii* R à imipenem após incubação de 4 h em meio com imipenem
 - Desaparecimento do pico correspondente ao imipenem e aparecimento do pico do metabólito natural.



Detecção de Mecanismos de Resistência

- ▶ Detecção de Carbapenemases NDM, VIM, KPC e Oxa-48 por Maldi-tof
 - 108 Enterobactérias produtoras de carbapenemase
 - 2 *A. baumannii* produtores de NDM
 - 35 Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos mas não produtoras de carbapenemase
- ▶ Suspensão em solução com 0,1 mM de meropenem por 2 horas à 35° C
- ▶ Centrifugação e coleta de 1 µL do sobrenadante
- ▶ Identificação no Maldi-Tof



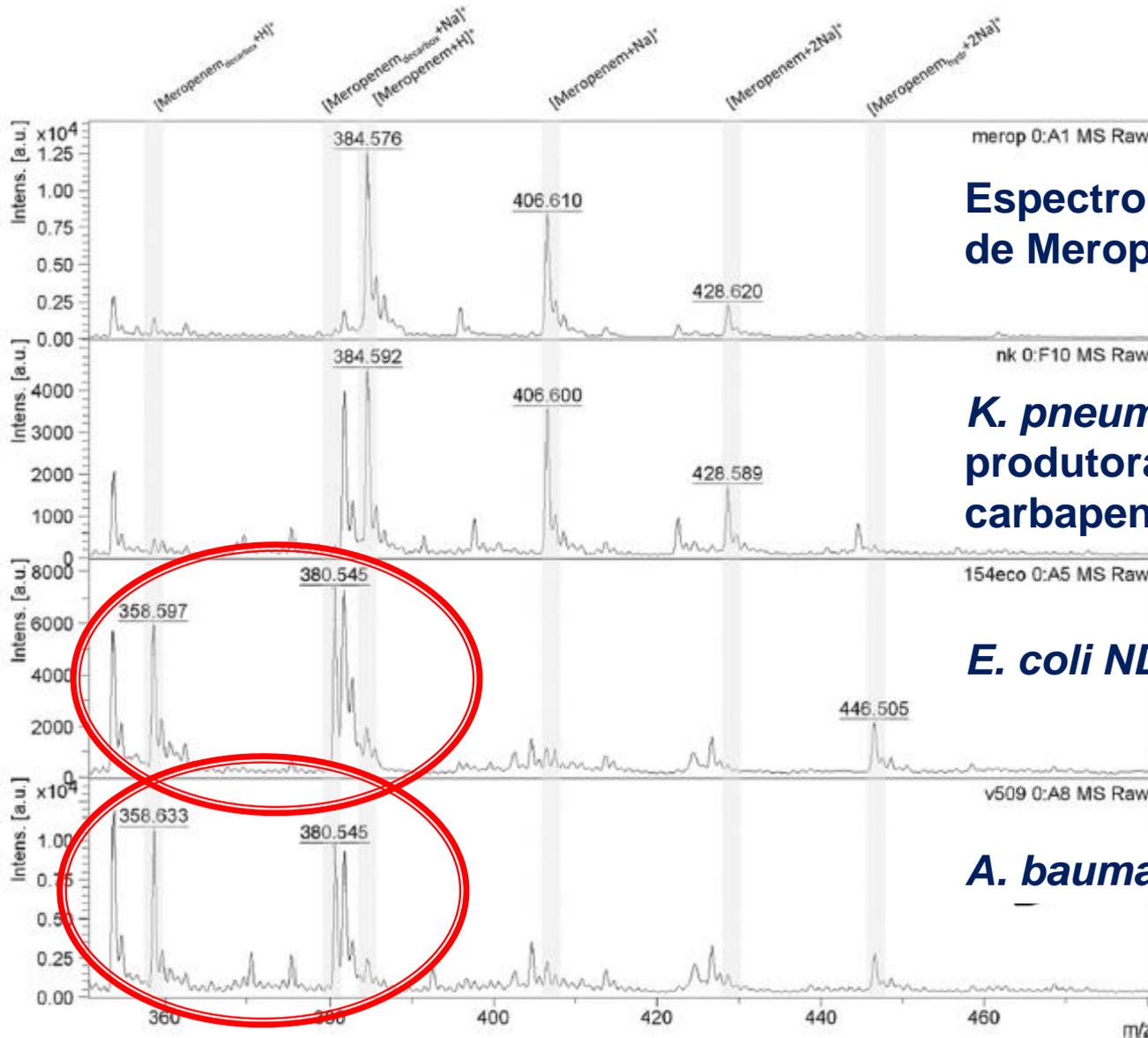
Detecção de Mecanismos de Resistência

TABLE 2 Interpretation criteria based on presence/absence of peaks

Criterion	Peak [<i>m/z</i>] (product) meeting criterion for:	
	Carbapenemase-producing isolate	Non-carbapenemase-producing isolate
Presence of at least one peak	358.5 (decarboxylated product)	384.5 (meropenem)
	380.5 (sodium salt of decarboxylated product)	406.5 (meropenem sodium salt)
Absence of all peaks	384.5 (meropenem)	358.5 (decarboxylated product)
	406.5 (meropenem sodium salt)	380.5 (sodium salt of decarboxylated product)



Detecção de Mecanismos de Resistência



Espectro da solução de Meropenem

***K. pneumoniae* não produtora de carbapenemase**

***E. coli* NDM**

***A. baumannii* NDM**



Conclusões

- ▶ MALDI-TOF é uma nova tecnologia que está revolucionando a microbiologia clínica
- ▶ No momento permite reduzir o tempo de liberação de identificação de microrganismos a partir de isolados bacterianos em cultura com baixo custo
- ▶ Aplicabilidade em identificação de fungos e micobactérias em futuro próximo



Conclusões

- ▶ Possibilidade de identificação de mecanismos de resistência como MRSA e betalactamases, incluindo carbapenemases
- ▶ Possibilidade de identificação de microrganismos diretamente de materiais clínicos normalmente estéreis
- ▶ Resultados mais rápidos melhoram a otimização da antibioticoterapia, podendo reduzir a mortalidade em infecções graves

achebabo@gmail.com



CIDADE OLÍMPICA

RIO DE JANEIRO | BRASIL

