

MALDI-TOF масс-спектрометрия для видовой идентификации микроорганизмов: обзор диагностической точности, клинической и экономической эффективности.

Времяпролетная масс-спектрометрия с матрично ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) используется в качестве приложения в клинической диагностике для классификации и идентификации микроорганизмов.

MALDI-TOF масс-спектрометрия определяет соотношение масса/заряд для отдельных частиц в биоаналите и позволяет получить бактериальный спектр в течение нескольких минут.

База данных используется для сравнения полученных масс-спектров неизвестных микроорганизмов со спектрами достоверно идентифицированных микроорганизмов из базы данных. В ходе сравнения на основе корреляции полученных пиков, их интенсивности высчитывается коэффициент соответствия.

Метод может быть использован для идентификации микроорганизмов различных родов, видов, также как для идентификации штаммов внутри вида.

Последние публикации на тему MALDI TOF масс-спектрометрии свидетельствуют о том, что данный метод является более эффективным методом идентификации бактерий и грибов, чем большинство биохимических тестов. Что довольно важно для улучшения качества ухода за больными и снижения расходов на здравоохранение, так как данная технология может серьезно увеличить скорость и точность идентификации болезнетворных микроорганизмов и, соответственно, лечения пациентов.

Цена масс-спектрометра может быть существенной от 150 000 до 850 000 долларов США, в зависимости от модели. Годовые расходы на техническое обслуживание прибора составляют около 10% от покупной цены.

В настоящем очерке в центре внимания находится совокупность данных о клинической эффективности, диагностической точности и экономической целесообразности использования MALDI-TOF технологии для идентификации видов бактерий по сравнению с классическими биохимическими тестами, с целью принятия обоснованных решений в отношении этой технологии.

Вопросы для исследования

- 1) Какова клиническая эффективность использования MALDI TOF масс-спектрометрии в видовой идентификации бактерий?
- 2) Какова диагностическая точность данного метода?
- 3) Какова экономическая эффективность использования данной методики.

В сравнение с классическими биохимическими тестами, используемыми в клинической микробиологической практике, MALDI TOF исследование может быть проведено гораздо быстрее, является более точным, позволяет более корректно проводить идентификацию широкого спектра микроорганизмов. Данные по клиническому применению MALDI TOF ограничены. Некоторые экономические исследования предполагают, что использование MALDI TOF технологии может быть более дешевым, чем классических биохимических методов.

Методы

Так как данное исследование представляет собой суммацию данных по использованию MALDI TOF технологии, то основным методом данной работы является поиск литературы на заданную тематику. Были использованы такие источники информации, как PubMed, EMBASE, библиотека Кокрановского Сотрудничества, базы данных Centre for Reviews and Dissemination (CRD) нью-йоркского университета, данные канадских и других крупных международных учреждений здравоохранения, также в исследование включены работы, найденные при помощи поиска в интернете.

Для ограничения области поиска оценок медицинских технологий, обзоров, данных мета-анализа, экономических исследований использовались методологические фильтры. Везде, где это было возможным, поиск ограничивался данными по человеческой популяции. Также поиск был ограничен документами, написанными на английском языке, опубликованными в промежутке между первым января 2006 года и 22 марта 2011 года.

Критерии отбора материалов для данной статьи приведены в таблице 1.

Таблица 1: Критерии отбора материала

Популяция	Образцы, собранные у взрослых и детей
Направление исследования	MALDI ToF масс-спектрометрия, использованная для идентификации бактерий и дрожжевых грибов
Методики для сравнения	Различные автоматические и ручные панели биохимических тестов для идентификации бактерий и дрожжевых грибов (образцы включают панели Vitek, Phoenix, API, но не ограничены ими)
Результаты	<ol style="list-style-type: none"> 1) Клинические результаты: скорость сбора данных, скорость колонизации, уровень инфицирования, сроки выполнения 2) Диагностические показатели: чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата, отрицательная прогностическая ценность 3) Экономические результаты

Тип исследования	Оценки медицинских технологий, обзоры, мета-анализ, рандомизированные контролируемые испытания, не рандомизированные исследования, экономической исследования
------------------	---

ВЫВОДЫ

После рассмотрения основных тезисов докладов, были отобраны доклады, предлагающие сравнительную оценку MALDI-TOF MS и других способов идентификации бактерий. Всего было отобрано тридцать шесть сравнительных исследований для дальнейшего изучения и окончательной выборки. Были исключены и перечислены в приложении следующие типы исследований: в которых рассматривались биохимические тесты, но о них сообщалось в абстрактной форме; исследования, в которых не четко была определена методика, использованная для сравнения; или исследования, которые не включали биохимические тесты для сравнения с MALDI TOF. В общей сложности девять исследований были включены в этот доклад.

В двух работах оценивалась скорость выполнения метода, в других двух экономические затраты на MALDI-TOF MS и в семи исследованиях была оценена сравнительная диагностическая точность масс-спектрометрии и биохимических тестов.

Клиническая эффективность

Единственным релевантным методом оценки клинической эффективности метода было время выполнения анализа, которое отображено в двух исследованиях.

Cherkaoui и др (2010) сравнил в своей работе время, затраченное на идентификацию с помощью MALDI TOF MS и при использовании биохимических методов идентификации (включая быстрые индольный, каталазный метод, метод латексной агглютинации Pastorex Staph-Plus, коагулазный метод, панели API, анализатор Vitek). В ходе исследования были проанализированы 720 изолятов: E.coli (n=216 изолятов), S. aureus (n=55 изолятов), и другие бактерии (n=449 изолятов). Штаммы были получены из бактериологической лаборатории больницы, которая получала свои образцы из стационаров и амбулаторий. В исследовании были использованы две модели MALDI TOF масс-спектрометров, Microflex фирмы Bruker Daltonik и Axima фирмы Shimadzu Biotech.

Специфическое определение временных затрат для каждого типа прибора не было проведено. При использовании классических биохимических методов временные затраты составляли 1 час, 1 час и 24 часа для кишечной палочки, золотистого стафилококка и других бактерий соответственно. При использовании метода MALDI-TOS MS среднее время достоверной (значение коэффициента совпадения Score > 1.7 в случае с прибором Microflex и значение > 70% для Axima) идентификации было 0,08 часа (для 636 изолятов). Для результатов с низким уровнем достоверности (значение коэффициента совпадения Score < 1.7 в случае с прибором Microflex и значение < 70% для Axima) время составляло 24 часа (для 84 изолятов)

Seng и др. сравнили временные задержки при идентификации 1660 изолятов бактерий с помощью API, Phoenix, Vitek и MALDI-TOF MS.

Модель MALDI-TOF MS прибора была Autoflex II производства Bruker Daltonik. Использовались изоляты из крови, цереброспинальной жидкости, гноя, биоптатов, дыхательных путей, ран и каловых масс. Задержка определялась как время между помещением бактерии на мишень масс-спектрометра оператором и временем, когда результат идентификации мог быть передан клиницисту. Время задержки для стандартных биохимических тестов не описано. Результаты определения времени задержки приведены в таблице 2.

Таблица 2. Временные задержки при идентификации с помощью MALDI TOF MS и биохимических методов.

<u>Метод</u>	<u>Время задержки (минуты)</u>
Система идентификации API	1080-2880
Система идентификации и определения чувствительности к антибиотикам Phoenix	300-1200
Система идентификации Vitek	300-480
Система идентификации и определения чувствительности к антибиотикам Vitek	300-480
MALDI-TOF	6-8.5

Диагностическая точность

В семи отобранных для данной статьи исследования предоставлены сравнительные результаты по определению диагностической точности MALDI-TOF MS и классических биохимических методов идентификации. В 6 из 7 случаев использовались приборы производства Bruker Daltonik и в одном случае прибор Shimadzu Biotech. В пяти исследованиях были использованы два сравнительных метода и в оставшихся двух исследованиях был использован один метод для сравнения. Методы сравнения включали в себя панель API, анализатор Phoenix, анализатор Vitek. Четыре исследования анализировали микроорганизмы определенного рода, а три исследования включали в себя бактерии нескольких родов. Результаты исследования приведены в таблице 3.

Таблица 3. Работы, отобранные для сравнения диагностической точности MALDI TOF MS и биохимических методов идентификации микроорганизмов

<u>Автор (год)</u>	<u>Модель MALDI-TOF MS</u>	<u>Методики для сравнения</u>	<u>Бактерии</u>
Benagli et al.(2011)	Shimadzu Biotech, Axima	API, Phoenix	1019 изолятов, более чем 13 родов
Bessède et al.(2010)	Bruker Daltonik Ultraflex III TOF/TOF	API, Phoenix	1013 изолятов, более чем 30 родов, полученные из дыхательных путей, уха, носа, глотки, мочи, биоптатов, крови, гноя, кала, урогенитального тракта, и другие образцы, полученные

			из клинической бактериологической лаборатории
Dupont et al.(2010)	Bruker Daltonik Autoflex	Phoenix, Vitek	234 коагулазонегативных стафилококка, 20 различных видов, полученные из клинической баклаборатории
Martiny et al (2010)	Bruker Daltonik Microflex LT	API	1689 изолятов рода <i>Campylobacter</i> , в основном гастроинтестинальные патогены, полученные из клинических лабораторий
van Veen et al.(2010)	Bruker Daltonik Microflex	Vitek, API	980 изолятов 42 родов, 92 видов (включая <i>Enterobacteriaceae</i> , неферментирующие грам отрицательные бактерии, грам положительные кокки и другие микроорганизмы), полученные из крови, мочи, гноя, биоптатов, мазков, цереброспинальной жидкости, дыхательных путей, раны, взятые из клинической лаборатории
Nagy et al. (2009)	Bruker Daltonik Microflex LT или Ultraflex TOF/TOF	API Rapid ID 32A, API20	277 изолятов рода <i>Bacteroides</i> , полученные в клинических условиях
Friedrichs et al.(2007)	Bruker Daltonik Autoflex	API Rapid ID 32 STREP	99 изолятов <i>Viridans streptococci</i> , полученных из крови, абсцессов, ран, катетеров, цереброспинальной жидкости

Результаты всех семи исследований использовались для определения диагностической точности методик видовой идентификации микроорганизмов.

В одном исследовании была отражена сравнительная чувствительность, специфичность, положительное прогностическое значение, отрицательное прогностическое значение. Для каждого из 11 исследованных видов (705 изолятов) чувствительность и отрицательное прогностическое значение (negative predictive values, NPVs) в случае использования MALDI TOF были одинаковыми или выше, чем значения полученные для Phoenix или API. Наименьшие значения чувствительности были отмечены для *Enterobacter cloacae*, а наибольшие для *Pseudomonas aeruginosa*, при использовании обоих способов идентификации. Специфичность и положительное прогностическое значение были 100% при использовании обеих методик. Результаты по чувствительности и значению NPV двух сравниваемых диагностических инструментов при идентификации этих 11 видов бактерий приведены в таблице 4.

Таблица 4. Сравнение чувствительности MALDI TOF MS и биохимических методов идентификации микроорганизмов.

Видовая принадлежность микроорганизма	MALDI TOF MS		API/Phoenix	
	Чувствительность (в %)	NPV (%)	Чувствительность (в %)	NPV (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	87.50	99.8	81.25	99.7
<i>Enterobacter aerogenes</i>	93.75	99.9	93.75	99.9
<i>Enterobacter cloacae</i>	69.44	98.9	30.56	97.5
<i>Escherichia coli</i>	95.58	98.2	90.82	96.4
<i>Klebsiella oxytoca</i>	79.17	99.5	62.50	99.1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	90.57	99.5	58.49	97.8
<i>Morganella morganii</i>	93.33	99.9	93.33	99.9
<i>Proteus mirabilis</i>	98.67	99.9	96.0	99.7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99.17	99.9	97.50	99.7
<i>Serratia marcescens</i>	95.65	99.9	86.96	99.7
<i>Stenotrophomonas malophilia</i>	96.97	99.9	93.94	99.8

Отдельный анализ четырех видов стафилококков показал гораздо более высокую чувствительность в случае использования MALDI-TOF MS, чем в случае использования API или Phoenix в случае трех из четырех видов и более высокую специфичность для MALDI-TOF для всех четырех видов.

Оставшиеся шесть работ докладывают о сравнении уровней идентификации. Ни одна из работ не предоставила значения идентификации, полученные при использовании биохимических тестов. Три работы определяли идентификацию до уровня вида с использованием Bruker MALDI-TOF MS при значении коэффициента >2.0. Пять работ показали более высокий уровень идентификации

для MALDI-TOF MS, и только одна работа указала на 100% уровень идентификации как для MALDI-TOF MS, так и для API. Большинство авторов пришли к выводу, что MALDI-TOF MS является более приемлемым способом идентификации. Результаты работ, докладывающих о диагностической точности, показаны в таблице 5.

Таблица 5. Сравнение уровней идентификации с помощью MALDI TOF и биохимических тестов.

<u>Автор (год)</u>	<u>Диагностическая точность</u>	<u>Заключение авторов</u>
Benagli et al. (2011)	<p>Уровень идентификации с помощью MALDI-TOF для 1019 изолятов >98%. Точность при анализе 705 изолятов 11 видов (10 родов):</p> <p>(MALDI-TOF/API или Phoenix) Чувствительность: 69.4%-99.2%/30.6%-97.5% Специфичность: 100% для всех видов обоими методами PPV: 100% для всех видов обоими методами NPV: 98.2% -99.9%/96.4% -99.8% Чувствительность и NPV примерно одинаковые или выше для MALDI-TOF для всех 11 видов Отдельный анализ 4-х видов стафилококков показал более высокую чувствительность для MALDI-TOF, чем для API или Phoenix для 3 из 4 видов и более высокую специфичность для MALDI-TOF для всех 4-х видов. Более низкая чувствительность была показана для Enterobacter Cloacae при использовании обоих методов.</p>	<p>MALDI-TOF MS представляет собой быструю надежную и экономную технологию идентификации клинически значимых бактерий.</p>
Bessède et al (2010)	<p>(MALDI-TOF/ Phoenix или API) Идентификация (до вида): 97.3%/93.2% Идентификация (до рода): 99%/98% Авторы отмечают, что некоторые бактерии не были идентифицированы с помощью MALDI TOF, потому что они не присутствовали в базе данных или присутствовали в незначительном кол-ве. Также MALDI TOF в значительном кол-ве случаев не справлялся с идентификации анаэробных микроорганизмов</p>	<p>Использование MALDI-TOF MS технологии довольно убедительно показывает ее быстроту, эффективность. Эта технология является довольно важным инструментом для бактериологической идентификации в рутинной микробиологической практике.</p>
Dupont et al	<p>(MALDI-TOF/Phoenix/Vitek) Вся идентификация проведена до видового уровня Идентификация: 93.2%/75.6%/75.2%</p>	<p>Данное исследование демонстрирует простоту исполнения, высокую чувствительность методики</p>

	<p>Ошибочная идентификация: 1.7%/23.1%/13.7%</p> <p>Отсутствие результата: 5.1%/1.3%/0.9%</p> <p>Низкий уровень достоверности результата: 10.3% только для Vitek</p> <p>После исключения из исследования микроорганизмов, которые не содержатся хотя бы в одной базе данных: Идентификация: 97.4%/79.0%/78.6%</p> <p>Ошибочная идентификация: .3%/21.0%/10.3%</p> <p>Отсутствие результата: 1.3%/0.0%/0.9%</p> <p>Низкий уровень достоверности результата: 10.2% только для Vitek</p>	<p>идентификации микроорганизмов с использованием MALDI-TOF технологии</p>
Martiny et al (2010)	<p>(MALDI-TOF/API Campy/Vitek)</p> <p>Идентификация: Campylobacter jejuni ssp. jejuni: 100%/94.4%/89.6%</p> <p>Campylobacter coli:100%/73.8%/87.7%</p> <p>Другие Epsilobacteria:90.9%/47.7%/0%</p>	<p>Среди трех сравниваемых коммерческих систем MALDI- TOF MS является методом выбора для идентификации Campylobacter и подобных микроорганизмов.</p>
van Veen et al.(2010)	<p>(MALDI-TOF/Vitek or API)</p> <p>Идентификация (род): 98.8%/98.0%</p> <p>Идентификация (вид): 92.0%/83.1%</p> <p>Максимальная ошибка : 0.1%/1.6%</p> <p>Минимальная ошибка:: 1.6%/1.4%</p> <p>Отсутствие идентификации: 0.8%/0.5%</p> <p>MALDI-TOF показала значительно более высокий уровень идентификации среди грамм положительных кокков (94.3% vs. 63.2%, p<0.01) и значительно меньшее значение ошибки при идентификации Viridans streptococci (57.1% vs. 0%, p<0.01).</p>	<p>MALDI-TOF MS это быстрая, простая, недорогая и высокопроизводительная технология идентификации бактерий. Она, в основном, показывает такие же, а зачастую, гораздо лучшие результаты, чем классические биохимические методы. И показатели могут быть существенно улучшены в случае добавления в базу данных большего кол-ва микроорганизмов.</p>
Nagy et al.(2009)	<p>Идентификация (до вида):</p> <p>MALDI-TOF: 270/277: 97.5%</p> <p>API: 23 из 270 изолятов корректно определенных с помощью MALDI- TOF, были определены неверно</p> <p>Авторы не указывают результат для не идентифицированных 7 изолятов с помощью API</p>	<p>Метод MALDI-TOF MS позволяет проводить точную и быструю видовую идентификацию наиболее часто встречающихся аэробных микроорганизмов - патогенов человека, с очень хорошей дискриминационной способностью для близкородственных видов. Расширение базы данных с</p>

		включением анаэробных клинически значимых микроорганизмов увеличит ценность этой методики в рутинной практике микробиологической лаборатории
Friedrichs et al. (2007)	Идентификация до уровня вида: 100% для MALDI-TOF и API	MALDI-TOF - быстрый и надежный метод идентификации видов <i>Viridans streptococci</i> из клинических образцов

Экономическая эффективность

Cherkaoui и др. в своей работе провели сравнение стоимости MALDI-TOF MS анализа с классическими биохимическими методами. Затраты были описаны как стандартные затраты для лаборатории, но без уточнения деталей. При использовании классических методов стоимость идентификации одной кишечной палочки составила 20 USD\$; USD\$1.50 – для идентификации золотистого стафилококка и порядка USD\$10.00 для идентификации изолятов различных микроорганизмов. Достоверная идентификация с помощью MALDI-TOF MS стоила USD\$0.50 для одного изолята. В случае с недостаточно достоверной идентификацией затраты составляли \$10.50 для одного изолята.

Seng и др. в своем докладе подсчитали стоимость идентификации одного изолята. Стоимость включала в себя стоимость расходных материалов, затраты на заработную плату, амортизацию прибора. 20 000 изолятов были идентифицированы в течение года. Полные затраты составили 2008 евро. Стоимость идентификации с помощью MALDI-TOF MS была значительно ниже, чем в случае с другими методами. Результаты этого исследования приведены в таблице 6

Таблица 6. Сравнительные значения экономических затрат на идентификацию с помощью MALDI TOF MS и биохимических методов идентификации.

<u>Метод</u>	<u>Стоимость идентификации 1 изолята, евро</u>
Система идентификации API	4.6-6.0
Система идентификации и определения чувствительности Phoenix	12.65
Система идентификации Vitek	5.9-8.23
Система идентификации и определения чувствительности Vitek	10.38-12.71
MALDI-TOF	1.43

Seng также отмечает в своей работе, что при использовании биохимических методов идентификации требуется средний уровень подготовки персонала, в то время как для работы с методикой MALDI-TOF MS требуются минимальный уровень подготовки персонала и меньшее кол-во трудовых затрат на проведение анализа. В этой работе также не указываются детали того,

каким образом авторы устанавливали необходимый уровень подготовки персонала и кол-во трудовых затрат.

Ограничения

- 1) Кол-во информации по поводу клинической эффективности MALDI-TOF MS ограничено.
- 2) Одно исследование обращает внимание на существенный недостаток в базе данных анаэробных и грам положительных аэробных организмов.
- 3) Одна статья сообщает, что уровень идентификации увеличился, когда изоляты, которые не были включены в базу данных ни одной из методик, были удалены из эксперимента. Отсутствие микроорганизмов в базе данных оказывает огромное влияние на результаты идентификации в некоторых случаях.
- 4) Один производитель выпустил дополнение базы данных по бактериям, представляющим биотеррористическую угрозу, и которые не были включены в изначальную базу данных, что вело к неверной идентификации этих микроорганизмов в ходе исследований.
- 5) Некоторые авторы заключили, что MALDI-TOF MS является значительно более быстрым и недорогим методом. Однако эти выводы не были основаны на конкретных данных и должны быть интерпретированы с осторожностью.
- 6) Одна экономическая оценка, как оказалось, не принимала во внимание стоимость оборудования.

Выводы и последующие решения

Два исследования, представленные в этой статье, сообщают о том, что анализ с помощью MALDI-TOF MS требует меньше временных затрат, чем классические биохимические тесты.

Исследования, использовавшие широкий диапазон бактериальных видов продемонстрировали большую диагностическую точность MALDI-TOF MS по сравнению с классическими методами, однако эти исследования имели установленные границы.

Дальнейшее увеличение уровня идентификации с помощью MALDI-TOF MS связано с расширением базы данных и внесением в нее большего кол-ва микроорганизмов, что увеличит применимость методики. Данные двух экономических работ, в ходе которых были оценены затраты на пробоподготовку для MALDI-TOF анализа, позволяют предположить, что MALDI-TOF является более дешевой методикой, чем стандартные методы. Однако дальнейший экономический анализ, в частности анализ соотношения затрат с полученными результатами, все еще необходим.